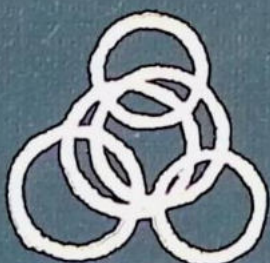


Л.К.ЭРНСТ
Н.И.СЕРГЕЕВ

ТРАНСПЛАНТАЦИЯ ЭМБРИОНОВ СЕЛЬСКО- ХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ



УЧЕБНЫЕ ПОСОБИЯ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ КВАЛИФИКАЦИИ СПЕЦИАЛИСТОВ

Л.К.ЭРНСТ
академик ВАСХНИЛ,
Н.И.СЕРГЕЕВ
профессор

ТРАНСПЛАНТАЦИЯ ЭМБРИОНОВ СЕЛЬСКО- ХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

Допущено Управлением высшего и среднего специального образования ~~Российской Федерации~~ в качестве учебного пособия для слушателей системы повышения квалификации



Москва
ВО · Агропромиздат ·
1989

ББК 45.3

Э81

УДК 636.082:612.6.089.67(075.8)

Редактор В. М. Балакин

Рецензент профессор В. А. Яблонский

Эрнст Л. К., Сергеев Н. И.

Э81 Трансплантация эмбрионов сельскохозяйственных жи-
вотных — М.: Агропромиздат, 1989. — 302 с.: ил. — (Учеб.
для повышения квалификации специалистов).
10—000737—0

Содержание написано в соответствии с утвержденным пла-
ном. В нем рассмотрены важнейшие проблемы биотехно-
логии методы генной и клеточной инженерии сельскохо-
зяйственных животных. Подробно изложены вопросы и методы полу-
чения ранних эмбрионов сельскохозяйственных жи-
вотных, их консервации, транспортировки на дальние расстояния.
Содержание предназначено для повышения квалификации.

Э 3705010000—056 237—89
035(01)—89

Библиотека

Са

ИН

ББК 45.3

ISBN 5—10—000737—0

© ВО «Агропромиздат», 1989

В результате достижений в генетике и в технологии искусственного осеменения животноводы получили мощное средство совершенствования животных, расширились возможности отбора быков с высоким генетическим потенциалом продуктивности, ускорились темпы генетического улучшения целых популяций. В процессе совершенствования поголовья резко возросла роль производителей, а влияние маток осталось незначительным из-за малого числа производимого ими потомства. Так, число потомков от одной коровы за всю ее жизнь составляет от 3 до 6 голов. Потомство же генетически ценных быков при искусственном осеменении может насчитывать до нескольких десятков тысяч голов. Между тем биологические возможности воспроизводства маток велики, яичники новорожденных телочек содержат свыше 75 тыс. потенциальных яйцеклеток. Для более полного использования этого огромного генетического потенциала проведены исследования, направленные на реализацию возможности трансплантации ранних эмбрионов от выдающихся матерей в матку коров с нормальным воспроизводительным циклом, но с низкой генетической ценностью.

Накоплен огромный объем научной информации об основных процессах, управляющих половыми функциями коров, а также о яйцеклетках и эмбрионах, поэтому трансплантацию можно уже несколько лет считать на практике осуществимым биотехнологическим мероприятием.

Трансплантация (пересадка, трансфер) эмбрионов — биотехнологический метод воспроизводства, который заключается в получении эмбриона или нескольких эмбрионов из полового аппарата матки-донора и пересадке их в половой аппарат одной или нескольких коров (реципиентов). В рогах матки коров-реципиентов эмбрионы развиваются до самого рождения. Возможность вызова суперовуляции у коровы-донора позволяет при помощи коров-реципиентов вырастить большое число генетически ценных потомков.

Трансплантация эмбрионов открывает огромные возможности в разведении и воспроизводстве крупного рогатого скота как с точки зрения повышения эффективности племенной работы, так и увеличения воспроизводства мясного скота.

В области селекции крупного рогатого скота трансплантация обеспечивает более интенсивное размножение животных с высокой генетической ценностью и животных малочисленных пород, сокращает генерационный интервал, дает возможность более строгой селекции матерей быков, улучшает возможности контроля за наследственностью матерей племенных быков. В направлении пользовательных животных трансплантация может дать возможность повышения процента близнецов, производства телят мясных пород в стадах молочных коров. Трансплантация создает более благоприятные условия для использования мировых генетических ресурсов: транспортировка глубоко охлажденных эмбрионов вместо животных, устранение ветеринарных препятствий в международной торговле, исключение необходимости адаптации импортированных животных к новым условиям среды. Создаются также условия для исследований, разработок и внедрения в области биотехнологии животноводства: оплодотворение яйцеклеток *in vitro*, определение пола эмбрионов, производство идентичных близнецов, производство химер, передача генов, создание банков эмбрионов для сохранения редких ценных пород или отделений генотипов и др.

Биотехнологические методы, к которым относится трансплантация эмбрионов, играют важную роль, особенно в производстве промышленного типа, и их значение будет постоянно возрастать, так как они позволяют лучше использовать биологические резервы для повышения производства продуктов животноводства.

Проблему успешной пересадки эмбриона начали разрабатывать давно. Так, еще в 1890 г. английский исследователь Walter Heare из Кембриджского университета информировал о том, что ему удалось трансплантировать оплодотворенную яйцеклетку от крольчихи-донора крольчихе-реципиенту другой породы, которая затем родила детеныша, генетически, несомненно, принадлежащего к породе донора.

После других многочисленных опытов (прежде всего с лабораторными животными) в 50-е годы интенсивно работали уже над проблемой трансплантации эмбрионов у овец, а к концу 60-х годов — и у крупного рогатого скота (в Англии, Канаде и США).

Исследования по трансплантации эмбрионов проводились и в нашей стране. Результатом интенсивных исследований в этой области было множество успешных трансплантаций эмбрионов крупного рогатого скота в научно-исследовательских центрах. С этого времени метод трансплантации претерпел много изменений и усовершенствований и в настоящее время широко применяется в практике разведения крупного рогатого скота во многих странах.

СОВРЕМЕННЫЙ УРОВЕНЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ЭМБРИОНОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Метод трансплантации достаточно хорошо разработан, и накоплен большой производственный опыт его использования во многих странах. Уже к началу 70-х годов были разработаны основные разделы методики трансплантации и началось применение ее в животноводстве, и прежде всего в скотоводстве.

К числу стран, освоивших метод трансплантации, относится и ЧССР, где трансплантация как хирургическим, так нехирургическим способами успешно применяется в производственных условиях сельскохозяйственных предприятий. Например, в Южно-Моравской области практикуют пересадку эмбрионов амбулаторным методом, а число производственных трансплантаций составляет уже несколько тысяч. Только в сельскохозяйственном кооперативе Слушовице, например, после трансплантации эмбрионов родилось 30 телят-одинцов и 13 пар близнецов.

В ГДР исследования по трансплантации эмбрионов крупного рогатого скота сконцентрированы в Научно-исследовательском центре животноводства Думмерсторф-Росток. Успешны работы по вызову суперовуляции, хирургическому и нехирургическому извлечению эмбрионов, культивированию их *in vitro*, определению пола эмбриона на стадии развития 9—14 дней, определению уровня прогестерона в кровяной плазме в целях отбора реципиентов, созданию передвижных лабораторий для экспериментального проведения трансплантации эмбрионов на местах. Внедрены в практику методика нехирургического извлечения эмбрионов и хирургическая трансплантация их в матку реципиентов. При этом уровень стельности составляет 50—60%.

В ПНР пересадка эмбрионов осуществляется акушерской клиникой Ветеринарного института и используется для племенных целей.

В последние годы трансплантация эмбрионов крупного рогатого скота получила широкое распространение и в нашей стране. В ближайшем будущем этот метод будет служить в качестве важного мероприятия в селекции крупного рогатого скота. Первые телята после хирургической пересадки в стране родились в 1977 г. в совхозах «Неделинский» и «Новосельский» Калужской области. В 1979 г. в опытном хозяйстве «Каменка» Московской области произведено свыше 200 трансплантаций нехирургическим путем. В 1980 г. родились первые близнецы после трансплантации эмбрионов, долговременно (2 мес) хранившихся в жидком азоте (при температуре -196°C) в банке эмбрионов при Всесоюзном научно-исследовательском институте животноводства.

Созданы центры по извлечению эмбрионов от выдающихся коров в избранных племенных хозяйствах, и разработана система быстрого развития этого биотехнологического метода.

Наибольшего размаха трансплантация эмбрионов крупного рогатого скота достигла в странах Северной Америки. В США и Канаде еще в 1976 г. функционировало 20 фирм по трансплантации. В 1978 г. их было уже 50. К настоящему времени произведено десятки тысяч успешных трансплантаций, преимущественно хирургическим методом.

В 1980 г. в США было получено 25 тыс. телят в результате трансплантации эмбрионов, а в 1985 г. — уже 100 тыс. Если будут решены вопросы замораживания эмбрионов и деления их по полу (*splitting*), то, по предположению, в 1990 г. будет получено около 500 тыс. таких телят.

За 1975—1980 гг. из Канады было экспортировано 748 эмбрионов голштинского скота, замороженных или уже трансплантационных реципиентам. Эти работы получили большое распространение.

В последнее время в США занимаются пересадкой эмбрионов с целью ускорения генетического совершенствования животных.

В Австралии уже в 1976 г. существовали три, а в Новой Зеландии шесть фирм, на коммерческих основах занимающихся трансплантацией эмбрионов крупного рогатого скота.

В европейских государствах интерес к трансплантации эмбрионов крупного рогатого скота особенно проявляется в Великобритании и Ирландии. Наибольшего размаха трансплантация в этих странах достигла в 1974—1975 гг., когда в Великобритании работали восемь, а в Ирландии — две специализированные фирмы. В настоящее время в Великобритании работают только одна торговая организация и одна новая фирма, которая предлагает нехирургическое извлечение эмбрионов с глубоким их замораживанием. Глубокое замораживание эмбрионов в Великобритании стало коммерчески приемлемым способом их консервирования. А в 1981 г. в этой стране родились первые идентичные близнецы из искусственно разделенного эмбриона.

Во Франции работы по трансплантации координирует Центр станций искусственного осеменения (UNCEA). За 1979 г. при трансплантации эмбрионов цервикальным методом рождаемость составила около 35%, хирургическим методом — 60%. На 1980 г. было проведено около 2500 трансплантаций. С 1980 г. в нескольких научно-исследовательских учреждениях Франции в тесном сотрудничестве с племенными организациями осуществляется обширная государственная программа, в которой предусмотрены все аспекты трансплантации эмбрионов крупного рогатого скота, в том числе и экономические. Цель программы — широкое внедрение трансплантации эмбрионов в производственных условиях.

Большое значение трансплантации эмбрионов крупного рогатого скота придают в ФРГ. В коммерческих целях ее производят (нехирургическим методом) с конца 1976 г. Начиная с 1978 г. все чаще появляются сообщения об успешных трансплантациях и о рождении здоровых телят. В Нижней Баварии, а также в северной части ФРГ трансплантация эмбрионов широко применяется для получения потенциальных племенных бычков от выдающихся коров в племенных заводских стадах. Нижнебаварский союз по искусственному осеменению располагает постоянным поголовьем (свыше 200) коров-реципиентов на одном объекте. Уже в 1978 и 1979 гг. этот Союз экспортировал свежие эмбрионы в Южную Африку и в 1980 г. глубокомороженые — в Марокко. Первый теленок после трансплантации глубокомороженного эмбриона в ФРГ родился в 1978 г. В настоящее время пересадка эмбрионов осуществляется уже в производственных условиях в нескольких центрах по несколько тысяч в год. В 1982—1983 гг. внимание западногерманских

864

специалистов было обращено на разработку метода деления эмбрионов и на их трансплантацию. В середине 1983 г. родились первые идентичные близнецы из искусственно разделенных эмбрионов. В том же году ученые в ФРГ произвели разделение 111 эмбрионов и пересадку их частей. В семи случаях развились обе половинки разделенного эмбриона.

Первой европейской страной, занимающейся трансплантацией эмбрионов крупного рогатого скота на торговой основе, стала Дания. Работы проводятся при ветеринарной клинике «Трансбова». В этой же клинике в 1974 г. родился первый теленок после хирургической трансплантации эмбриона, выделенного от донора нехирургическим путем. В 1975 г. здесь же родился теленок после цервикальной (нехирургической) трансплантации. В конце 70-х годов создана еще одна организация, работающая только нехирургическим методом, — станция искусственного осеменения в кооперации с Ветеринарным институтом в Копенгагене.

В 1982 г. в Дании трансплантация эмбрионов уже несколько лет стала неотъемлемой частью племенных программ по разведению крупного рогатого скота. В том же году был разработан метод глубокого замораживания эмбрионов.

Выживаемость эмбрионов после замораживания и размораживания составляла 85—90%, а оплодотворяемость — 50—60%, то есть такая же, как и при трансплантации свежих эмбрионов.

В Швейцарии вопросами трансплантации эмбрионов крупного рогатого скота занимаются ветеринарные факультеты университетов в Берне и Цюрихе и Политехнический институт в Цюрихе. Первые пересадки были осуществлены в 1980 г., и первый теленок из трансплантированного эмбриона родился в 1980 г. До конца 1982 г. было запланировано проведение трансплантации эмбрионов в производственных условиях. Широкое применение трансплантации в племенной работе повышает генетический прогресс по сравнению с предшествующим периодом на 20—25%.

В Бельгии первые телята после трансплантации глубокомороженных эмбрионов родились в 1978 г. Трансплантация используется главным образом для ускоренного размножения животных разводимых в стране пород крупного рогатого скота.

В Италии к пересадкам эмбрионов крупного рогатого скота в экспериментальном порядке приступили в 1976 г. (23 успешных трансплантации), и в производственных условиях ее стали применять в 1977 г. в Ломбардии, и главным образом для размножения самых выдающихся производителей голштинского скота, ввезенного из США.

В Испании пересадка эмбрионов была осуществлена в 1980 г.

В 1982 г. в Париже представители научно-исследовательских институтов и фирм из Испании, Франции, Италии, ФРГ, Швейцарии, Бельгии, Великобритании, Дании и Голландии договорились об учреждении Европейского объединения по трансплантации эмбрионов. Главное назначение этого объединения: обмен научными и технологическими данными для поддержки и развития трансплантации эмбрионов в странах Европы; участие во всех научных или технических международных встречах в рамках этой научной области; информировать соответствующие европейские или международные организации о зоотехнических, санитарно-ветеринарных и технологических вопросах.

ЗНАЧЕНИЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ В СЕЛЕКЦИИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Система крупномасштабной селекции в скотоводстве основана на принципах точной генетической оценки животных и широкого использования (через искусственное осеменение) генетически ценных быков-производителей. Наиболее точный метод оценки генотипа быков — оценка их по качеству потомства. Однако удельный вес выявленных быков-улучшателей, особенно с ярко выраженным улучшающим эффектом, — относительно невысокий. Ближайшие предки быка (М, МО, ММ) оказывают мощное влияние на его генотип. Поэтому очень важен отбор быков перед постановкой на генетическую проверку. Первым этапом всей сложной системы отбора и оценки быка являются отбор и оценка матерей быков. Уровень генетического потенциала матерей быков в значительной степени определяет и удельный вес быков-улучшателей и степень их улучшающего эффекта. При традиционных методах разведения и воспроизводства крупного рогатого скота в среднем от каждой коровы за период ее использования получают 4—6 телят (2—3 бычка, 2—3 телочки). Таким образом, возможности размножения маток с ценным генотипом в скотоводстве весьма ограничены.

Методы гормональной стимуляции генетически ценных маток и трансплантации эмбрионов позволяют получать от них более многочисленное потомство и тем самым ускорить повышение качества стада, давать достоверную генетическую оценку женской особи по потомству. До разработки и внедрения метода трансплантации, когда от коровы получали 2—3 женских потомка, рожденных в разные годы, такая оценка матки была практически исключена. Поэтому матерей быков отбирали только по фенотипу (удой, % жира в молоке и т. д.) и по аналогичным показателям других женских предков.

Сыновья высокопродуктивной коровы могут быть оценены (кроме оценки по происхождению) по показателям полных сестер (сибсы) уже к 3-летнему возрасту вместо 5-летнего при оценке по их потомству. Высокая точность оценки генотипа по

сисбсам и полусисбсам позволяет раньше выявлять и использовать быков-улучшателей. Кроме того, оценка по сисбсам в дополнение к оценке по потомству в значительной степени увеличивает точность оценки генотипа быка. Оцененным 3-летним быкам назначают число доз спермы, которую необходимо запасти от данного производителя.

Метод трансплантации значительно увеличивает роль семейств в селекционно-племенной работе. Даже при традиционных методах разведения скота селекционеры придавали большое значение маточным семействам.

В силу особенностей воспроизводства крупного рогатого скота семейства всегда были немногочисленными группами животных. Но даже и они играли большую роль в структуре пород. С развитием методов трансплантации значение этих структурных единиц в породе возрастает, представляется возможным, используя методы популяционной генетики, давать более полную и объективную генетическую оценку семейств. Создаются условия для более полного взаимодействия семейств и линий в селекционно-племенной работе.

Особое значение метод трансплантации ранних эмбрионов приобретает при выведении новых линий, типов и пород животных. Он позволяет более быстрыми темпами создавать ядро новой популяции, играет все возрастающую роль и в использовании мировых генетических ресурсов.

Разработаны не только надежные методы стимуляции воспроизводительных функций животных и получения ранних эмбрионов, но и способы их длительного хранения. Все это дает возможности для экономически выгодной транспортировки генетического материала. В перспективе использование мировых генетических ресурсов будет все в большей степени базироваться на импорте-экспорте спермы и ранних эмбрионов. Это позволит в больших масштабах и более оперативно использовать генетические ресурсы для совершенствования существующих и выведения новых линий, типов и пород сельскохозяйственных животных, и в первую очередь крупного рогатого скота.

Наиболее эффективно применение трансплантации при недостаточных генетических ресурсах. Так в стране реализуется крупномасштабная селекционная программа совершенствования молочного скота с использованием генотипа голштинов. Внутренние генетические ресурсы этой популяции черно-пестрого скота в нашей стране недостаточны. Следовательно, главной задачей должно стать воспроизводство племенных голштинских быков, быстро решить которую можно путем трансплантации эмбрионов. Это относится и к ускоренному развитию мясного скотоводства, где относительно небольшие генетические ресурсы.

В заключение следует подчеркнуть, что трансплантация эмбрионов у крупного рогатого скота — перспективный биотехнологический метод, позволяющий быстро распространить и размножить ценный генетический материал, повысить производство говядины (за счет получения двоен).

Наиболее эффективны нехирургическое извлечение эмбрионов и хирургическая их пересадка. Трансплантация незаменима при выведении новых пород вместо импорта племенных животных, при повышении эффективности селекции матерей племенных быков.

В связи с быстрым развитием и большим прогрессом метода трансплантации эмбрионов широкое его внедрение связано не столько с биологией, сколько с экономикой.

У метода еще имеются некоторые недостатки, которые в ближайшем будущем будут устранены. В оптимальном варианте нехирургическую пересадку эмбрионов могут осуществлять техники-осеменаторы при устойчивых удовлетворительных результатах. Упрощение метода, надежность получаемых результатов — решающие факторы повышения экономической эффективности трансплантации.

Широкое внедрение метода потребует повышения уровня управления разведением крупного рогатого скота и в целом всех процессов в животноводстве. Трансплантация эмбрионов в системе крупномасштабной селекции по мере ее внедрения станет все заметнее оказывать влияние на повышение генетического потенциала продуктивности — основы интенсификации животноводства.

В нашей стране проблема трансплантации эмбрионов в теоретическом и экспериментальном плане разрабатывалась еще в 50-е годы (А. В. Квасницкий, А. И. Лопырин и др.). В последние годы исследования проводились на крупном рогатом скоте и овцах. Первые телята после хирургической трансплантации родились в 1977 г. Эти работы были проведены Всесоюзным НИИ физиологии, биохимии и питания сельскохозяйственных животных, затем во Всесоюзном НИИ животноводства и Всесоюзном НИИ разведения и генетики животных. При этом во Всесоюзном НИИ животноводства отрабатывались вопросы стимуляции овуляции, техники вымывания и трансплантации эмбрионов, оценки их качества, глубокого охлаждения, организации процессов трансплантации.

Во Всесоюзном НИИ разведения и генетики животных исследования были сосредоточены на проблеме извлечения ооцитов из яичника, их созревания и оплодотворения и раннего развития *in vitro*. Затем исследовательские работы начались в НИИ животноводства Лесостепи и Полесья УССР, Украинском НИИ разведения и искусственного осеменения крупного рогатого скота, Эстонском НИИ животноводства и ветеринарии и

ряде других научных учреждений зооинженерного профиля. Уже в 1980 г. родились первые телята после пересадки эмбрионов, хранившихся в течение двух месяцев в жидком азоте.

С 1983 г. началась организация центров по трансплантации эмбрионов. В настоящее время уже функционирует 20 центров. Большинство из них входят в состав научно-исследовательских учреждений, где обеспечивается тесная связь исследовательских лабораторий с подразделениями, занимающимися практической реализацией метода трансплантации. В большинстве этих институтов действуют и селекционные центры, координирующие работу центров по трансплантации.

Центры по трансплантации начали организовываться и в условиях непосредственного производства. Так, центр по трансплантации работает в племзаводе «Заря коммунизма» Московской области, в колхозе имени В. И. Ленина Тульской области, в ГПЗ «Червоный велетень» Харьковской области и в ряде других хозяйств.

При головном селекционном центре Научно-производственного объединения по племенному делу организованы курсы для подготовки специалистов по трансплантации. По мере накопления опыта, подготовки кадров и обеспечения приборами и оборудованием центры по трансплантации будут организовываться в племенных хозяйствах, на племпредприятиях, станциях искусственного осеменения. При некоторых центрах по трансплантации организованы банки эмбрионов, где будут сосредоточены генетические резервы.

Развитие работ по трансплантации проводится в тесном сотрудничестве с соответствующими зарубежными организациями. Проводятся совместные эксперименты, осуществляется экспорт — импорт эмбрионов. Например, тесные контакты поддерживаются с исследователями и специалистами НРБ, ГДР, ЧССР, ФРГ, Канады и других стран.

Одновременно с реализацией разработанных методов в практику продолжают исследования и разработки по совершенствованию методов гормональной стимуляции самок, вымывания и трансплантации эмбрионов. Разрабатываются методы клеточной и генной инженерии применительно к сельскохозяйственным животным.

В ближайшей перспективе метод трансплантации найдет широкое применение в селекционно-племенной работе, будет новым мощным фактором интенсификации животноводства.

В настоящее время в результате успехов фундаментальных наук возникла возможность развития принципиально новых эффективных методов влияния на организм животных, на наследственность.

Главные разделы биотехнологии — генная и клеточная инженерия. Методы генной инженерии наиболее детально разработаны на микроорганизмах. Можно направленно изменять их генотип. В отличие от спонтанных мутаций эти изменения можно заранее планировать. Так, в микроорганизмы совершенно определенно встраивают гены, ответственные за синтез интерферона, соматотропина, некоторых незаменимых аминокислот. Возможности дальнейшего развития этого направления огромны. Широким фронтом ведутся исследования и разработки по выделению и клонированию определенных генов, их внедрению в геном. Если генная инженерия в микробиологии стала реальностью и приобретает все большее практическое значение, то у животных применение этих методов только начинается, однако установлено, что в принципе можно выделить определенные гены из генома животных и встроить их в геном другой особи. Ген соматотропина (гормона роста) крысы встроен в геном мыши. В результате у некоторых трансгенных животных увеличилась скорость роста реципиента и конечная живая масса. Можно себе представить, какое огромное практическое значение будет иметь использование этого приема на сельскохозяйственных животных. Представляется возможным по заранее намеченному плану реконструировать геном домашних животных, придать ему заранее заданные свойства. Для достижения таких результатов традиционными методами потребовалась бы работа в течение многих поколений.

Возникает перспективная задача — использовать домашних животных как живые реакторы, ферментеры для производства ценнейших биологически активных веществ. Например, встроив ген интерферона с необходимыми регуляторными элементами в геном коровы, можно рассчитывать, что этот гормон будет экспрессироваться и в молочной железе. А поскольку активность молочной железы высокая, то можно получать данное вещество с молоком в значительных количествах и, вероятно, при высо-

кой экономической эффективности. Это же в принципе относится и к другим биологически активным веществам. В данном случае молочный скот — оптимальный объект для создания таких живых реакторов. Ни одно другое сельскохозяйственное животное не имеет такого интенсивного синтеза самых разнообразных продуктов и выведения их из организма. Однако существующие методы введения в геном животных инородного генетического материала еще недостаточно совершенны и степень вероятности встраивания чужеродных генов и их экспрессии невелика и исчисляется несколькими процентами и менее. Поэтому необходимо наличие большого числа яйцеклеток для успеха генно-инженерных манипуляций. Установлено, что оптимальной фазой введения инородного генетического материала является стадия зиготы до слияния пронуклеусов. Именно при введении генов в пронуклеус обеспечивается наибольшая вероятность успеха. Следовательно, необходимо иметь большое число яйцеклеток, и уметь их оплодотворять, чтобы уже на фазе зиготы подвергнуть генно-инженерным манипуляциям. В принципе зиготы можно получать от предварительно стимулированных и оплодотворенных животных оперативным путем. Но это очень сложный и трудоемкий способ, связанный с операциями на животных. Поэтому особое значение для развития генно-инженерных работ в животноводстве приобретает отработка методов извлечения из яичников, культивирования, оплодотворения созревших овоцитов *in vitro* и последующего их раннего развития и трансплантации. Сочетание этих двух методов создает оптимальные условия для широкого внедрения генной инженерии в практику селекционно-племенной работы в животноводстве. По всей вероятности, в ближайшей перспективе методами генной инженерии будут созданы новые формы сельскохозяйственных животных.

КЛЕТОЧНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

Наряду с развитием методов генной инженерии в животноводстве перспективны способы клеточной инженерии. В растениеводстве в селекции эти методы уже получили значительное развитие. Культивирование клеток растений *in vitro* обеспечивает возможность применять системы интенсивного отбора клеток, культивированных в строго контролируемых селективных условиях.

Присущие растительным клеткам свойства тотипотентности (свойство отдельных клеток развиваться в целостный организм) дают возможность плюс-варианты регенерировать в целые растения и использовать в процессе селекционной работы.

Методы клеточной инженерии перспективны и в животноводстве. Уже накоплен большой опыт культивирования соматиче-

ских клеток животных *in vitro*, разработаны оптимальные среды и режимы культивирования, отработаны способы длительного хранения клеток при низких температурах. Как уже было сказано, активные исследования проводятся и по культивированию генеративных клеток. Разработка этих методов создает прочную основу для развертывания теоретических и прикладных работ по клеточной инженерии сельскохозяйственных животных, которые будут иметь все возрастающее народнохозяйственное значение.

На первое место следует поставить уже достаточно хорошо разработанный метод деления ранних эмбрионов. С развитием трансплантации в руках исследователей появилось достаточное количество ранних эмбрионов, что дало мощный импульс работам по манипуляции с этими объектами. Первый успешный опыт по разделению эмбрионов на стадии 2—8 бластомеров был осуществлен Виллардом (Кембридж, Великобритания). Однако получение такого материала связано с большими трудностями и может быть осуществлено в научно-исследовательских учреждениях.

В результате исследователи начали манипулировать с эмбрионами в более поздних стадиях развития (морула, бластоциста). Сущность метода заключается в том, что предварительно вскрывается прозрачная зона (*pellucida*), эмбрион разделяется на две части. При этом одна половина остается в прежней зоне, а другую переносят в заранее подготовленную зону и производят обычную трансплантацию. Во многих опытах приживляемость разделенных эмбрионов достигает 50—60%. Прикладной аспект этой методики заключается в увеличении числа телят, полученных от каждого донора. По данным американских исследователей, половинки эмбрионов, инкубировавшиеся без прозрачной оболочки, сохраняли жизнеспособность в культуре только в 15% случаев, а при наличии зоны пеллюцида — в 35% случаев. Наилучшие результаты были получены при нехирургическом введении половинок эмбрионов — каждая в отдельной прозрачной оболочке в разные рога матки одного и того же реципиента (55% стельности).

В другом опыте были достигнуты еще лучшие результаты при хирургическом введении каждой половинки эмбриона в рог матки на той стороне, где локализовалось желтое тело (65% стельности). Стало очевидным, что деление эмбрионов — эффективный метод увеличения потомства коров-доноров.

В настоящее время эта методика начинает внедряться в практику племенного дела. Уже получены животные от трансплантации половинок эмбрионов свиней (США, Р. У. Роунтри). По данным ряда исследователей, число потомков может быть увеличено на 30—35%. Однако этим не ограничивается значение клеточно-инженерной операции. Возможность массового полу-

664

чения идентичных двоен (генетических копий) очень важна. Эти животные имеют большую ценность для исследователей, занимающихся проблемой взаимодействия генотипа и среды. Использование идентичных двоен позволяет повысить точность исследований и достичь достоверных результатов при меньшем числе подопытных животных. Кроме того, наличие идентичных близнецов позволяет на одном из них проводить изучение признаков, требующих убоя животного (например, мясные качества), и переносить эти данные на близнеца, что является методически вполне обоснованным. Все это позволяет более точно и всесторонне оценить данный генотип. Кроме того, при трудоемкой и длительной работе по оценке быков по качеству потомства эту работу можно проводить только с одним из двойневых идентичных быков. Оценка одного животного будет соответствовать оценке и другого идентичного животного. Имеется информация о том, что уже получено потомство при разделении бластоцисты на 4 части. Это еще в значительной мере увеличивает значение данного метода клеточной инженерии для повышения эффективности селекционно-племенной работы и исследований в области генетики сельскохозяйственных животных.

Метод агрегации ранних эмбрионов

Соединение двух целых эмбрионов или двух половинок эмбрионов от разных родителей позволяет получить животных, несущих качества сразу четырех родителей. Такие животные получили название химер. Получены межвидовые (овца — коза) и межпородные химеры. В частности, Брем (ФРГ) и другие получили химер от крупного рогатого скота разных пород, агрегируя эмбрионы из двух половинок эмбрионов, полученных от животных разных пород. Половинки эмбрионов разных пород скота агрегатировали в прозрачную зону. Один теленок был химерным. Это выявилось по масти, которая представляла собой смесь окрасок, характерных для обеих пород. Цитологическая оценка подтвердила этот факт. Однако иммунологический анализ крови показал набор факторов, свойственных только родителям голштинской породы. Химер получали и путем инъектирования клеток из бластоцисты одного эмбриона другому. Такой опыт был проведен в США (Дж. Е. Батлер) на овцах пород рамбулье и финский ландрас. Всего было получено 15 ягнят. Признаки химеризма определяли по антигенам эритроцитов, гемоглобина и трансферринов крови, 5 ягнят были химерами по этим признакам, у 3 ягнят проявились иммунологические характеристики, свойственные животным, от эмбриона которых инъектированы клетки. Один ягненок не был химерным по группам крови, но его химеризм был определен по другим морфологическим признакам. Химерные животные — интересные и много-

обещающие объекты для изучения проблем эмбриологии, иммунологии и иммуногенетики. В процессе получения химер не происходит гибридизации клеток. При этом соотношении клеточных линий одного и другого эмбрионов в различных органах и тканях химеры сильно варьируют. Химеры дают потомство или одной породы, или обеих пород. В этом их принципиальное отличие от гибридов и помесей, генотип которых несет признаки обоих родителей. Изучение химер дает возможность более подробно выявить процессы дифференцировки тканей и механизмы развития животного, начиная от раннего эмбриона до взрослой особи. Имеются и некоторые прикладные аспекты использования химер.

Определение пола эмбрионов

К крупным достижениям цитогенетики относится и разработка метода определения пола. Разработан метод идентификации половых хромосом в клетках, полученных путем биопсии раннего эмбриона. Метод состоит из ряда последовательных операций: микробиопсия трофобласта эмбриона; приготовление препаратов хромосом; микроскопирование препаратов; кратковременное хранение эмбриона после микробиопсии до трансплантации. Существует и еще более совершенный и менее трудоемкий метод определения пола, основанный на использовании *H-Y*-антитела. Для этого готовят антисыворотку, которая реагирует только с клетками или их продуктами эмбрионов мужского пола. Этот метод уже используется на крупном рогатом скоте. Внедрение его в практику трансплантации позволит решать и ряд практических вопросов. Например, трансплантация двух эмбрионов заведомо одного пола дает возможность избежать бесплодия телок из разнополох двоен (фримартинизм). Представляется возможным создание банка эмбрионов с заранее определенным полом, что позволит более рационально использовать генетические ресурсы.

Указанные выше методы клеточной инженерии уже в достаточной степени отработаны, и их применение в животноводстве постоянно возрастает. Между тем исследования в области клеточной инженерии расширяются быстрыми темпами и разрабатываются все новые методы.

Сводка основных методов определения пола приводится в работе Г. Б. Андерсона.

К важнейшим проблемам животноводства относится разработка методов регулирования пола сельскохозяйственных животных. Непредсказуемость пола рождаемых животных может приобретать значительную важность, если экономическое значение животных одного пола существенно выше экономического значения животных другого пола. Пока достигнут лишь незна-

264

чительный прогресс в решении проблемы контролирования соотношения полов и в разработке методов его регуляции. Идеальным методом контролирования соотношения полов могло бы стать разделение спермиев, несущих X- и Y-хромосомы. Очевидно, именно в этом направлении должны интенсивно развиваться исследования. Другим подходом для воздействия на соотношение полов является определение пола у ранних эмбрионов после извлечения из репродуктивного тракта самки и перед их трансплантацией.

Один из аспектов идентификации пола эмбрионов — цитологический, с помощью которого определяют их тип (XX или XY) путем исследования половых хромосом или хроматина. Кроме того, иммуногенетические методы, используемые для идентификации специфичных по полу антигенов эмбрионов, могут быть перспективны для разделения мужских и женских эмбрионов. Количественные различия в метаболической активности мужских и женских эмбрионов могут быть также использованы в качестве принципа для разделения эмбрионов по полу. Имеется сообщение, что с помощью колориметрического теста по определению активности глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы можно идентифицировать пол. Перспективны методы, основанные на гибридизации ДНК для идентификации мужских эмбрионов. Каждый из указанных способов весьма перспективен. Однако в настоящее время наиболее разработаны и эффективны цитологический и иммунологический методы.

Идентификация инактивированной X-хромосомы. Впервые об использовании цитологических методов для идентификации пола у живого эмбриона сообщили Гарднер и Эдвардс. Несколько сотен клеток были получены из 5,5-суточных зародышевых пузырей кролика и подготовлены для использования в методике определения телец Барра в женских клетках. Однако при высокой точности данной методики только относительно малую часть эмбрионов можно было разделить по половым признакам. Инактивация X-хромосомы — несовершенный метод для эмбрионов млекопитающих на ранней стадии их развития, так как для анализов требуется получать относительно большое число клеток. К сожалению этот метод, вероятно, не может быть использован на эмбрионах домашних животных из-за гранулированной природы цитоплазмы их яйцеклетки и зиготы, скрывающей ядерное вещество.

Биопсия трофобластов из бластоцист. Описан способ, в соответствии с которым трофобластные клетки бластоцист получали из 14—15-суточных эмбрионов крупного рогатого скота и исследовали их на половые хромосомы. Установлено, что около $\frac{2}{3}$ эмбрионов могут быть достоверно разделены по полу. Однако 14-суточные эмбрионы приблизительно на неделю старше чем те, которые обычно трансплантируются. Их нельзя хранить

более нескольких часов, и после пересадки реципиентам примерно только третья часть эмбрионов вызывает беременность, то есть приживляемость их гораздо ниже. В связи с этим возможности его применения пока неясны.

Биопсия клеток из морулы. Усовершенствование метода получения клеток из эмбриона на стадии бластоцисты заключается в выделении относительно небольшого числа клеток из морулы. Преимущество использования эмбрионов на этой стадии развития — их более высокая приживляемость при трансплантации, а также их способность к криоконсервации. Так, при выделении 8—10 клеток из морулы крупного рогатого скота хромосомы в метафазе были получены у 75% эмбрионов. У 63% эмбрионов пол был точно идентифицирован. На основе подобных методических приемов при выделении 15—17 клеток из одного эмбриона смогли идентифицировать пол приблизительно только у трети исследованных эмбрионов. В целом для идентификации пола эмбрионов с помощью анализа половых хромосом на небольшом числе клеток требуются более высокий митотический индекс по сравнению с индексом, существующим в нормальных условиях у эмбрионов млекопитающих на ранних стадиях развития, продолжительное культивирование клеток (взятых при биопсии) для увеличения числа клеток, пригодных для исследования, или усовершенствованный метод для идентификации половых хромосом. Решение этих вопросов — задача большой значимости.

Использование половинок эмбрионов. При пересадке половинок эмбрионов процент вызванных ими беременностей лишь незначительно ниже, чем при пересадке нормальных эмбрионов. Половинки эмбрионов можно криоконсервировать и пересаживать крупному рогатому скоту. Использование половинок эмбриона для идентификации его пола является модификацией методических подходов предыдущего метода. Однако, вследствие того что выделяется большее число клеток, можно получить хромосомы в метафазе от значительно большего числа эмбрионов. Установлено, что пол можно идентифицировать приблизительно у 60% половинок эмбрионов крупного рогатого скота после их культивирования.

Идентификация антигенов, специфичных по полу. О существовании специфичного мужского антигена впервые сделали предположение Эйчвальд и Силсмер, они установили, что у самки мыши из высокоимбредной линии отторгается кожный лоскут от самцов той же линии. Все другие комбинации полов не проявляли данного эффекта: самец к самцу, самка к самке и самка к самцу. Была выдвинута гипотеза о существовании специфичного мужского антигена трансплантации. В дальнейшем этому антигену было дано название *H-Y*-антигена, так как его гены, вероятно, локализируются в *Y*-хромосоме. Предполагают,

что *H-Y*-антиген представляет тестикулярный фактор, ответственный за дифференциацию индифферентной половой железы в семенники. Большое число исследований было проведено в отношении выражения действия и роли *H-Y*-антигена в половой дифференциации, и имеются обзоры литературы по этому вопросу.

Имеются данные, что *H-Y*-антиген определяется у мышинных эмбрионов уже на стадии восьми клеток. Данное выражение мужского аллеля подтверждает, что эмбриональный геном постепенно активируется с развитием эмбриона. Точность метода такова: 92% 8-клеточных эмбрионов, которые продолжали развиваться после инкубации в антисыворотке к *H-Y*-антигену, были отнесены к женским особям. Это очень высокая разрешающая возможность метода.

В последние годы изучалось проявление *H-Y*-антигена у эмбрионов разных видов животных и исследовались возможности использования такого подхода для идентификации пола эмбрионов. Антисыворотку к *H-Y*-антигену получали введением клеток селезенки от самцов мышей линии C57/BI самкам этой же линии. В первом эксперименте 2000 мышинных эмбрионов на стадии 8 клеток инкубировали или в среде, содержащей антисыворотку и сыворотку морской свинки в качестве источника комплемента, или в различных контрольных средах. Эмбрионы, продолжавшие развиваться в культурной среде, были классифицированы как не поврежденные культивированием в антисыворотке и комплементе и предположительно отнесены к женским особям. Эмбрионы с очевидным цитолизом в индивидуальных бластомерах или неспособные развиваться до стадии бластоцисты были классифицированы как пораженные культивированием и отнесены к мужским особям. Неповрежденные эмбрионы пересаживали в репродуктивные органы самок. Из общего числа пересаженных эмбрионов, предположительно отнесенных к женским особям, 86% родились мыши самки; приблизительно 50% мышат, развившихся из эмбрионов, культивированных в контрольных средах, были самками.

Был разработан и метод разделения по полу по реакции иммунофлуоресценции.

Аналогичные эксперименты проведены и для выявления того, на какой стадии развития эмбриона крупного рогатого скота может быть определен *H-Y*-антиген и на какой стадии развития — точно идентифицирован пол. Эмбрионы крупного рогатого скота на стадии развития от 4 клеток до бластоцисты исследовали для выявления действия *H-Y*-антигена. Как уже говорилось, для мышинных эмбрионов *H-Y*-антиген определяли на 8-клеточной стадии развития. Более того, *H-Y*-антиген определяли приблизительно у половины эмбрионов на стадии от 8 клеток до бластоциста, что находится в соответствии с ожи-

даемой вероятностью, если бы эмбрионы были разделены по половому признаку. Кариотипы готовили из эмбрионов для того, чтобы определить точность, с которой эмбриональный пол идентифицируется с помощью выявления *H-Y*-антигена: 89% нефлуоресцировавших эмбрионов были отнесены к женским особям и 80% флуоресцировавших эмбрионов — к мужским. В итоге точность составила 84%.

Работы в этом направлении проводились и с эмбрионами свиньи. Определенные результаты получены и по разделению эмбрионов овец с помощью непрямой иммунофлуоресценции с использованием *H-Y*-антисыворотки. После разделения по полу эмбрионов или пересаживали в репродуктивные органы овец с синхронизированной половой охотой, или подготавливали для анализа половых хромосом. Из 68 эмбрионов, из которых или развивались ягнята, или получили четкие кариотипы, 58% (85) были точно разделены по полу. Данные, полученные на овечьих эмбрионах, сходны с данными на мышинных эмбрионах.

Эмбрионы других видов животных. Сведения об эмбрионах других видов животных ограничены. Утциуми с соавт. сообщают, что, используя цитолитический тест и крысиную *H-Y*-антисыворотку, они получили 97% крысят женского пола, развившихся из неповрежденных эмбрионов, и 80% крысят мужского пола, развившихся из поврежденных эмбрионов. Было сообщено также, что приблизительно половина козьих эмбрионов, инкубированных при их цитолитическом исследовании, задерживались в развитии и были классифицированы как *H-Y*-положительные. Ограниченное число лошадиных эмбрионов было подвергнуто исследованию в реакции непрямой иммунофлуоресценции; приблизительно половина была классифицирована как *H-Y*-положительная, а другая часть — как *H-Y*-отрицательная. В соответствии с предыдущими наблюдениями по *H-Y*-антигену действительно определяют пол у эмбрионов различных видов домашних животных.

Следовательно, указанный выше антиген определен у мужских преимплантационных эмбрионов млекопитающих различных видов, и он может представлять основу для определения пола эмбрионов. Реакция непрямой иммунофлуоресценции может быть использована в качестве щадящего метода для идентификации пола эмбрионов, хотя в данное время этот метод еще требует совершенствования.

Таким образом, проблема определения пола у животных (на ранних эмбрионах) принципиально решена, хотя разработанные методы еще недостаточно точны и сложны для применения в практике. Наиболее перспективно решение такой проблемы — разработка методов разделения спермиев по полу. Работы в этом направлении проводятся во всем мире.

Микроманипуляции с ядром

На лабораторных животных разработан метод по удалению одного или обоих пронуклеусов, что обеспечивает возможность различных манипуляций с клеткой. Наиболее перспективна разработка метода удаления женского пронуклеуса и введения в ооцит спермия. В результате этой операции эмбрионы несут гены только отца. Это позволит в максимальной степени передавать его качества потомству. При традиционных методах разведения такой эффект частично достигается путем применения тесного инбридинга. Однако степень монозиготности при андрогенезе значительно выше, что дает возможность в значительной степени расширить и усилить влияние выдающихся по генотипу быков-улучшателей, проверенных по качеству потомства. Создается прочная основа для истинно линейного разведения. Это особенно важно в настоящее время, когда в стадах преобладают беспорядочные кроссы и сохранение качеств выдающихся производителей становится практически невозможным. Использование андрогенетических потомков можно практически неопределенно долгое время поддерживать однопородность и высокий продуктивный потенциал линии.

Перспективный метод — пересадка клеточных ядер. Гёрдон и другими осуществлена такая пересадка ядер соматических клеток в энуклеированную зиготу у лягушек, и было получено потомство. Работы по пересадке ядер успешно развиваются. Так, Дж. М. Робломом и другими проведена пересадка ядра от 8-клеточного эмбриона мыши 2-клеточному. Из обоих бластомеров клеточного эмбриона были извлечены ядра, в один бластомер инъецировано ядро из бластомера другого двухклеточного эмбриона, а в другой — из бластомера восьмиклеточного эмбриона. После микрооперации эмбрионы развивались до образования бластоцисты. Эти исследования имеют большое теоретическое и практическое значение для развития клеточной инженерии.

Межвидовая трансплантация

Осуществлена межвидовая трансплантация (Б. Л. Дроммер и др., США) эмбрионов от антилопы бонго (редкий вид) антилопе канна. Успешны были межвидовые трансплантации у крупного рогатого скота и овец, пересадки эмбрионов у крупнопигмейских и барбадосских коз (безоаровая коза — исчезающий вид). Развитие этих работ имеет большое теоретическое значение для изучения проблемы влияния материнского организма на эмбриональное развитие. Кроме того, межвидовая трансплантация может быть использована для ускоренного размножения некоторых исчезающих видов животных.

1. Ожидаемые и фактические результаты испытаний на партеногенетическое развитие с учетом типа спаривания

Год	Тип спаривания	Ожидаемое потомство по генотипу, %	Число апробированных потомков	Число позитивных потомков	Ожидаемый приплод, %	Фактический приплод, %
1965	Aa × Aa	25 AA (—) 20 AA (—) 25 aa (+)	229	66	25	28,8
1966	Aa × aa	50 Aa (—) 50 aa (+)	223	110	500	47,2

Партеногенез

Партеногенетическое развитие (без оплодотворения) — явление, довольно широко распространенное в животном мире, особенно у беспозвоночных, и даже у некоторых позвоночных (пресмыкающиеся, птицы). У млекопитающих партеногенез не встречается, хотя довольно часто партеногенетическое развитие происходит до определенных стадий эмбрионального развития. Так, у определенных линий мышей до 50% яйцеклеток развивается партеногенетически, но эмбрионы погибают.

Различные формы партеногенеза присущи многим видам. Так, у севрюги был описан спонтанный зачаточный партеногенез, медленно идущий до стадии морулы. Аналогичное явление отмечено у осетров и белуги. У налима из 5000 икринок на 60-е сутки вылупились и продолжали развиваться около 10%. Облигатная форма партеногенеза обнаружена у некоторых видов скальной ящерицы (*Lacerta saxiola* Eversmann) в северных районах Армянской ССР. При этом популяции названных видов представлены только самками. У птиц партеногенез впервые был обнаружен сначала у кур, затем — у голубей и индеек. Некоторые авторы высказали предположение о возможности существования различных форм партеногенеза.

При изучении партеногенетического развития у тутового шелкопряда уже в 1935 г. показана возможность его стимуляции. В 1940 г. было высказано предположение о генетической обусловленности партеногенеза. Кроме того, было показано, что предрасположенность сельскохозяйственной птицы к партеногенезу передается как рецессивный признак, который контролируется единственным аутосомным геном (табл. 1) с несколькими модификаторами, определяющими процент развивающихся яиц.

У индеек за 8 лет работы с ними предрасположенность к партеногенетическому развитию была увеличена с 16,7 до 41,5%. Особое место в науке и практике занимает разработка методов стимуляции яиц к партеногенетическому развитию. В качестве

2. Активизация партеногенетического развития у позвоночных с использованием различных факторов (Л. К. Эрнст и др., 1980)

Используемый фактор	Вид животного	Активированных яйцеклеток, %	Развивающихся яйцеклеток, %	Стадия, до которой доходит развитие
Иглоукалывание	Лягушка	—	2,3	Претерпели метаморфоз
Электрический ток	Мышь	До 75	До 93	До стадии 8 сомитов
Температурный шок				
холодовый	Крыса	До 100	—	Деление дробления
	Хомяк	До 80	—	То же
	Кролик	До 90	—	Вплоть до рождения
	Хорек	До 60	—	До бластоцисты
	Овца	Большинство	—	Деление дробления
тепловой	Мышь	До 53	До 15	До бластоцисты
	Кролик	До 44	—	Вплоть до рождения
Осмотический шок	Крыса	До 58	—	Неправильное дробление
	Кролик	До 38	—	Вплоть до рождения
Эфирный наркоз	Мышь	До 18	—	Деление дробления
	Крыса	До 64	—	То же
Гиалуронидаза	Мышь	До 87	До 58	До бластоцисты
	Макака резус	77	38	Деление дробления
Сперма других видов животных	Кролик	Незначительный	—	То же
Виром саркомы Рауса	Курица	25,4	—	Экстраэмбриональная мембрана
Виром оспы птиц	Индейка	—	21	До сформированных эмбрионов

стимуляторов могут быть использованы механические, физические, химические или биологические факторы.

Наибольший интерес представляет применение биологических факторов, поскольку их действие может сохраняться и в последующих поколениях. Эффект инфицирования кур и индеек вирусом саркомы Рауса или вирусом оспы птиц сохраняется в течение двух поколений и проявляется в увеличении до 25% числа снесенных яиц, способных к партеногенетическому развитию. На млекопитающих подобные эксперименты не проводились, однако в отношении других перечисленных факторов представлен значительный по своему разнообразию материал на различных видах животных (табл. 2). При этом отмечается, что стимуляция электрическим или температурным шоком оказывается наиболее эффективной как *in vitro*, так и *in vivo*. Электрический ток активизирует к партеногенезу примерно $\frac{3}{4}$ свежеевулированных яйцеклеток, 90% из которых достигает стадии морулы или бластоцисты. Температурные воздействия стимулируют до 90—100% яйцеклеток, часть которых развивается до рождения нормальных особей. Живое потомство получено и при применении осмотического шока. Однако активиро-

ванных яйцеклеток при этом было значительно меньше — 38—58%.

Эксперименты по стимуляции партеногенетического развития у млекопитающих обычно проводятся на свежеевулированных яйцеклетках, которые у большинства видов находятся на стадии метафазы II. По Graham, завершение второго мейотического деления после активации может привести к выделению одного набора хромосом в виде направительного тельца и формированию единственного пронуклеуса из другого, как у мышей после обработки яйцеклеток гиалуронидазой. В этом случае зародыш развивается по гаплоидному типу.

Иногда вместо формирования второго направленного тельца яйцеклетка сразу делится на две, в одной из которых формируется женский пронуклеус, в другой — ядро второго направительного тельца также формирует пронуклеус. Обычно такое завершение второго мейотического деления происходит в первые часы после активации и приводит к образованию гаплоидных клеток, часть которых может оказаться мозаичными как результат последствий кроссинговера. Если второе мейотическое деление заканчивается без разделения цитоплазмы и выделения направительного тельца, то происходит образование двух пронуклеусов, которые в метафазе первого деления обуславливают диплоидность клеток зародыша.

Присутствие двух пронуклеусов не всегда обеспечивает диплоидность. Иногда происходит задержанная цитотомия и образуются две гаплоидные клетки. Подобное явление отмечалось при активации половозрелых яйцеклеток мышей. Второе мейотическое деление может также заканчиваться образованием единственного пронуклеуса без выделения направительного тельца. При этом оба хромосомных набора оказываются в одном пронуклеусе, чем обеспечивается необходимая плоидность будущего организма.

Рассмотренные пути завершения второго мейотического деления в результате активации свежеевулированной яйцеклетки далеко не исчерпывают всех возможных вариантов партеногенетического развития. Наблюдения природной популяции скальной ящерицы и эксперименты на тутовом шелкопряде показали возможность партеногенетического развития яйцеклетки в результате подавления первого мейотического деления. В зависимости от того, на какой стадии развития будет находиться яйцеклетка в момент активации, путь ее партеногенетического развития будет различным. Beatty насчитывает восемь таких путей с учетом трех переменных: выделение первого направительного тельца, выделение второго направительного тельца и первое деление дробления на схеме (рис. 1). В сочетании с приведенными вариантами, предложенными Graham, указанная схема, пожалуй, наиболее полно отражает возможные пути партеногенетического

развития яйцеклетки. В то же время принятое в шелководстве подразделение партеногенетического развития на амейотическое и мейотическое для практического животноводства более удобное, поскольку не детализируя механизмы, лежащие в основе такого развития, оно дает представление о генетическом характере полученного конечного материала.

В результате цитологического анализа при амейотическом партеногенезе искусственно активированные яйцеклетки, находящиеся на стадии метафазы первого деления созревания, завершают свое деление путем сохранения материнского набора хромосом в виде диплоидного ядра, способного к дальнейшему развитию, то есть полностью подавляется редукционное деление, в то время как эквационное деление, разделяющее сестринские хроматиды, происходит беспрепятственно. При мейотическом партеногенезе у тутового шелкопряда происходят оба деления с образованием женского пронуклеуса, который после удвоения своего хромосомного набора делится на два гаплоидных дочерних ядра. Образованные таким путем ядра сливаются и образуют одно диплоидное ядро, принимающее участие в дальнейшем партеногенетическом развитии особи. Подобный путь развития по типу гиногенеза у млекопитающих также используется, только пока не в связи с активацией неоплодотворенной яйцеклетки к развитию, а в результате обычного оплодотворения с последующим применением методов тонкой хирургии, позволяющих удалить из оплодотворенной яйцеклетки мужской пронуклеус. При этом оставшийся женский пронуклеус участвует в дальнейшем эмбриональном развитии.

Таким образом, у тутового шелкопряда амейотический путь партеногенетического развития позволяет получать точные, если не принимать во внимание незначительный процент спонтанного мутирования генов, генетические копии матери, а мейотический — практически 100% гомозигот. Однако у млекопитающих активация неоплодотворенной яйцеклетки на стадии метафазы второго деления созревания приводит к запуску механизмов, несколько отличающихся от таковых у тутового шелкопряда. Аналогичное можно отметить и в отношении сельскохозяйственной птицы. Poole et al., например, исследовал вопрос гомо- и гетерозиготности индюков-партеногенов методом трансплантации их кожи потомству партеногена и неродственной ему самки. Потомки гомозиготного партеногена должны иметь хотя бы по одному гену от каждой пары, присутствующей в генотипе отца. Участки кожи, взятые от такого самца и пересаженные его потомкам, должны приживаться так же, как они приживаются при пересадке от партеногена к матери. Отторжение кожи у потомства было бы убедительным доказательством того, что партеноген гетерозигот имеет, по крайней мере, по одной паре аллелей гистосовместимости. В первом опыте произошло отторже-

ние пересаженного участка кожи, во втором — при повторной пересадке, что указывало на типичную иммунологическую несовместимость. Полученные результаты не оставляют сомнения в том, что партеногенетическое развитие в данном случае происходило не в результате подавления первого деления дробления. Более вероятно подавление эквационного деления, вследствие чего сохраняется гетерозиготность — результат кроссинговера.

О гетерозиготности некоторых индюков-партеногенов свидетельствует и эксперимент, проведенный Olsen. От самок-помесей (F_1) пород белтсвилская белая мелкая и бронзовая (породы, гетерозиготные по генам окраски) получены 4 взрослых партеногена, из них 3 (одного белого и двух бронзовых) спаривали с самками породы белтсвилская белая. Потомство белого было белое, одного бронзового — бронзовое, а другого бронзового — бронзовое и белое. Результаты этого эксперимента, продемонстрировавшие явную гетерозиготность по гену окраски одного из партеногенов, еще раз убедительно подтвердили возможность партеногенетического развития путем подавления второго мейотического деления и получения особей, гомозиготных на 99,9%.

Данные приведенных результатов не позволяют чисто механически переносить термин «мейотический партеногенез» из работ с тутовым шелкопрядом на рассматриваемые виды животных, поскольку процессы, совершающиеся в яйцеклетке после ее активации, в каждом случае имеют определенную специфику и в то же время не исключают друг друга. Кроме того, эти события совершаются в обоих случаях после вмешательства в тонкие клеточные механизмы второго мейотического деления и в конечном результате приводят к получению потомства очень высокой степени гомозиготности. А это, на наш взгляд, допускает возможность использовать термин «мейотический партеногенез» по отношению к млекопитающим и птице в виде обобщающего условного обозначения активации яйцеклетки на стадии метафазы II с целью получения гомозиготного потомства.

Таким образом, если воспользоваться предложенной терминологией, то мейотический партеногенез позволяет получать почти полностью гомозиготных особей в течение одного поколения. Обычно такого эффекта селекционер вообще не достигает или ему приходится затрачивать на это многие годы. К тому же животных с такой степенью гомозиготности и не пытаются получить, поскольку процесс сильного инбридирования, как правило, сопровождается значительным снижением плодовитости и жизнеспособности особей, появлением различных уродств и порочительных последствий инбридинга у крупного рогатого скота. Так, исследование отпоказало, что из 167 зарегистрированных мертворожденных телят у 136 (81,4%) родители оказались в той или иной степени

инбредными, а из 431 на долю инбредных родителей пришлось 352 мертворожденных (81,7%).

Имеются данные и по отрицательному влиянию инбридинга на продуктивные качества животных. Так, при инбридинге типа полубрат — полусестра в молочном скотоводстве повышение степени инбридинга на 1% вызывает снижение годового удоя первотелок в среднем на 22,5 кг, продукции молочного жира — на 0,67 кг, а при инбридинге типов отец — дочь или мать — сын соответственно на 33,4 и 0,96 кг.

В растениеводстве разработаны соответствующие методы скрещивания высокоинбредных гомозиготных линий, отличающихся низкой продуктивностью, которые обеспечивают получение такого высокоурожайного потомства, что в несколько раз окупаются все расходы, связанные с созданием и поддержанием исходных линий.

Линейное разведение и использование межлинейных кроссов широко используются в птицеводстве. Однако при линейном разведении применяются не очень высокие степени инбридинга, позволяющие получать гомозиготность лишь по некоторым желательным признакам продуктивности. Растениеводческие методы в животноводстве (крупный рогатый скот, лошади или овцы) пока еще не применяются из-за большой экономической ценности каждой особи. Убытки, наносимые инбридированием, могут быть так велики, что никакой гетерозис в дальнейшем их не компенсирует. Однако использование высокоинбредных животных было бы желательным, например, в виде топкроссинга в молочном и мясном скотоводстве или в овцеводстве.

Широкие возможности в этом отношении открываются при использовании мейотического партеногенеза. Он позволяет до предела сократить очень убыточный процесс инбридирования и довести его, как уже отмечалось, до одного поколения, а значит — свести все убытки при получении высокоинбредных гомозиготных особей к минимуму. В данном случае экономический эффект гетерозиса от использования таких гомозиготных особей может быть сопоставим с подобным эффектом в растениеводстве. В селекционной практике этот метод успешно применен на тутовом шелкопряде. Можно предположить, что экономический эффект резко возрастет при применении мейотического партеногенеза на более крупных животных, у которых коэффициент воспроизведения на порядок или на два ниже, чем у шелковичного червя. Несомненна огромная роль этого метода не только в решении ряда практических, но и теоретических задач генетики и селекции животных.

Особую важность при клонировании животных приобретает амейотический партеногенез, который позволяет практически без изменений повторять ценный генотип матери в ее потомстве. Большое хозяйственное значение имеет возможность получения

В последние годы была выдвинута идея использования химеризма для стимуляции развития эмбрионов, которые по тем или иным причинам не завершают развития. Было установлено следующее свойство химер: нежизнеспособные эмбрионы (партеогены, эмбрионы с летальными факторами в геноме) в результате агрегации с нормальными эмбрионами начинают функционировать и дают клеточные линии химер и с определенной долей вероятности могут давать потомство. В настоящее время, когда техника агрегации эмбрионов хорошо отработана, появляется возможность получать партеногенетические особи, представляющие огромный интерес для селекционно-племенной работы.

Культивирование ооцитов

Современная селекция животных основывается на использовании методов, разработанных частной и популяционной генетикой, цитогенетикой, иммуногенетикой и другими науками. Продолжаются поиски новых генетических приемов селекции с целью улучшения существующих и создания новых пород животных. Один из таких приемов — трансплантация эмбрионов и клонирование млекопитающих, успешная разработка которых может привести к большим достижениям в животноводстве, особенно в селекции крупного рогатого скота, свиней, овец и других млекопитающих. В настоящее время весь комплекс этих проблем интегрировался в особый раздел биологической науки — эмбриогенетику.

Наиболее крупное достижение современной зоотехнической науки — широкое внедрение искусственного осеменения сельскохозяйственных животных спермой, сохранявшейся в замороженном виде. Значение этого метода многогранно, но главное — много повышается роль производителя в улучшении селекционируемых стад. Интенсивное использование высококлассных быков-улучшателей, оцененных по качеству потомства, позволило резко ускорить темпы селекционного процесса — создавать в сравнительно короткие сроки высокопродуктивных сельскохозяйственных животных.

По значимости в ускорении процессов селекции трансплантацию эмбрионов можно приравнять к искусственному осеменению. На первых этапах развития трансплантация зародышей, как и искусственное осеменение животных, будет ускорять селекционный процесс за счет повышения в нем роли не только отцовского, но и материнского организма, создания в короткие сроки семейств от высокопродуктивных, ценных в племенном отношении женских особей. Темпы селекции повысятся также с увеличением вероятности появления большего числа ценных генотипов при получении быков-производителей на основе ин-

тенсивного использования высокопродуктивных матерей. Имеются данные, что в течение года от одной коровы-донора методом трансплантации можно получить не менее 60 потомков.

На современном этапе развития трансплантация стала новым фактором, который наряду с искусственным осеменением способствует более широкому использованию генетически ценных животных, повышению эффективности селекционно-племенной работы.

Однако разработанные методы гормональной стимуляции женских особей еще не позволяют в полной мере использовать биологические ресурсы их размножения. Установлено, что в яичниках сельскохозяйственных животных закладываются десятки тысяч гамет и только очень небольшая их часть дает начало новым организмам.

Во многих странах изучают возможности получения зародышей для пересадки из яйцеклеток, отобранных из яичников забитых животных, и по культивированию самих яичников с целью более интенсивного их использования в качестве доноров яйцеклеток в течение длительного срока. При этом недозревшие яйцеклетки, извлеченные из яичников, культивируются до стадии метафазы II, то есть когда их можно оплодотворять. Применяются различные среды и создаются необходимые условия для доразвития яйцеклеток. Наиболее распространены среды 199, Нам-*F*-10 и среда З. М. Бринстера. Успешно применяется синтетическая среда яйцеводов.

Для роста клеток во все эти среды добавляют либо гомологическую сыворотку, либо чистый бычий сывороточный альбумин. В средах с различными добавками удавалось 60—70% незрелых яйцеклеток довести до стадии метафазы II. Удалось добиться некоторого повышения процента созревающих клеток путем варьирования концентрации альбумина в искусственной среде яичников, у которой хорошо сбалансированный солевой состав. При различных добавках среды обеспечивается 95% созревания яйцеклеток.

В сосудах культивирования создают оптимальную газовую среду, включающую диоксид углерода (CO_2), кислород и азот в различном соотношении. Наилучшие результаты по культивированию яйцеклеток получены при 5%-ной концентрации кислорода. Оплодотворенные яйцеклетки, культивируемые в 10%-ной концентрации кислорода, хотя и дробились, но развивались медленно. Возможно, что избыток кислорода мешает нормальному развитию. Яйцеклетки, как правило, имеют достаточно энергетических запасов, чтобы поддержать нормальное развитие при невысокой концентрации кислорода. Высокие концентрации кислорода ингибируют развитие яйцеклеток *in vitro*. Этот эффект характерен для яйцеклеток многих млекопитающих. Было изучено влияние сыворотки крови коровы в стадиях

охоты, овуляции и через 24 ч после овуляции на созревание ооцитов и их оплодотворение *in vitro*. При этом самая высокая оплодотворяемость отмечена при добавлении к среде сыворотки коровы, находящейся в охоте.

Было установлено, что эмбрионы крупного рогатого скота лучше развиваются при культивировании их в яйцевом кресте.

Опыты по дозреванию ооцитов лошади *in vitro* были проведены в Канаде (М. Десжардон и др.). Ооциты извлекали из антральных фолликулов, при этом 30% их достигали метафазы II.

Таким образом, успешное культивирование яйцеклеток может проходить в соответствующих средах вне организма, и при этом удается получить довольно высокий процент зрелых клеток. Для оплодотворения яйцеклетки берут, как правило, либо у стимулированных коров, либо добавляют гормон в культуральную среду. В яйцеклетках присутствует ингибирующий фактор, который можно снять лютеонизирующим гормоном, прогестероном или др. Разработана эффективная схема стимулирования коров сочетанием СЖК, простагландина и ЛГ. Применение этой схемы дает возможность получать более 20 овулирующих фолликулов на каждый яичник.

Следовательно, сочетание подходящих сред, газового режима и применение гормонов позволяют не только доводить ооциты коров до метафазы II, но и сохранить их способность к оплодотворению. Вопрос заключается в том, в какой мере эта способность может сравниться с естественным оплодотворением.

Уже получено потомство из культивируемых вне организма ооцитов кроликов и овец. Методика культивирования отличалась от вышеописанных — ооциты дозревали в изолированных фолликулах. К культуральным средам добавляли гонадотропные гормоны. Состав газовой среды также отличался от обычного, используемого при культивировании ооцитов. Их дозревание в фолликулах успешно проходило при 55% кислорода, 40% азота и 5% диоксида углерода.

Изучена динамика созревания ооцитов у крупного рогатого скота и других млекопитающих. Установлено, что при культивировании ооцитов коров через 4 ч возобновлялся процесс мейоза только у 14% из них, через 6 ч — у 38, через 9 ч — у 65, через 24 ч — у 84%. Следовательно, в период 6—9 ч культивирования от 38 до 56% ооцитов находились в стадии диакинеза, дальнейшее культивирование приводит к переходу ядер от стадии диакинеза к метафазе II. При этом отмечается значительная асинхронность вступления ооцитов в мейоз, что свидетельствует о их гетерогенности в яичнике. Определенное число ооцитов находится в разных стадиях дегенерации. Однако в процессе культивирования при определенных условиях этот процесс

может быть приостановлен. Доказана принципиальная возможность оплодотворения яйцеклеток млекопитающих *in vitro*.

Разработаны методы культивирования ранних эмбрионов крупного рогатого скота и овец *in vitro*, а также в яйцеводах кроликов. Исследования интенсивно продолжаются. Главные усилия направлены на увеличение удельного веса ранних эмбрионов, которые бы в условиях культивирования достигали стадии морулы и бластоцисты. Это позволит широко использовать их для трансплантации.

Особое внимание уделяется проблеме созревания цитоплазмы ооцитов, точной характеристике ядерно-цитоплазматических взаимосвязей. Установлено, что первые этапы эмбрионального развития проходят в условиях, когда ядро не генерирует РНК в цитоплазму и процессом управляет РНК, накопленная в период оогенеза. В связи с этим идет поиск методов активации синтеза РНК в этот период. В ближайшей перспективе появится возможность резко увеличить число ооцитов, получаемых от самок, обеспечить ускорение процессов селекции, в полной мере использовать биологический репродуктивный потенциал высокопродуктивных коров, выбраковываемых по возрасту и другим показателям, создать большие запасы гамет генетически ценных животных. Это одно из важнейших прикладных направлений данной проблемы.

Следует отметить, что впервые телята от оплодотворения ооцитов *in vitro* были получены Бринстером (США).

Однако в опытах были использованы яйцеклетки, уже созревшие в яичнике *in vivo*. Что касается получения телят из ооцитов, которые были доведены до созревания вне организма, то они были впервые получены в нашей стране.

Другое важнейшее направление — проведение разных работ, связанных с генной и клеточной инженерией на ценнейшем генетическом материале.

Проводятся и другие работы в области клеточной инженерии. В качестве примера можно привести исследования по получению цебридов. Методика предусматривает объединение двух яйцеклеток. В данном варианте происходит не просто оплодотворение, но объединяются и цитоплазмы клеток. Эти работы представляют большой теоретический и практический интерес.

Многие методы генной и клеточной инженерии уже разработаны в институтах фундаментального профиля. Большинство этих работ проведено на лабораторных животных. Задача исследователей и специалистов животноводства — быстро овладеть этими методами и перенести их на сельскохозяйственных животных. Это позволит резко повысить эффективность селекционно-племенной работы в животноводстве, создать новые высокопродуктивные линии, типы и породы животных, отвечаю-

щих высоким требованиям интенсивного животноводства.

Исследовательские работы направлены на совершенствование методов длительного хранения эмбрионов, трансплантации их нехирургическим способом, суперовуляции и развития фолликулов, прижизненной оценки жизнеспособности эмбрионов.

Проводятся углубленные исследования процессов оплодотворения, в том числе *in vitro*, разработка надежных методов определения пола и регулирования соотношения полов, изучение среды матки и яйцеводов, метаболизма ранних эмбрионов.

Все в большей степени научно-исследовательские силы подключаются к проблеме культивирования и манипуляции с яйцеклетками и эмбрионами *in vitro* с широким использованием процессов современной биотехнологии и главных ее направлений генной и клеточной инженерии.

ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

Важнейшая народнохозяйственная задача — интенсификация животноводства. Поставлена задача резко увеличить уровень производства продуктов животноводства при экономном расходовании ресурсов. Главный биологический фактор интенсификации — генетическое совершенствование животных, основных орудий производства в этой отрасли; повышение их генетического потенциала. В результате планомерной, многолетней работы исследователей и практиков животноводства достигнуты значительные результаты в селекции сельскохозяйственных животных.

Генетические методы все в большей степени находят применение в селекционно-племенной работе. Особую роль в повышении эффективности селекционно-племенной работы сыграло внедрение методов популяционной генетики. Разработка и применение методов определения изменчивости, повторяемости, наследуемости и генетической корреляции количественных хозяйственно ценных признаков позволили точно прогнозировать и планировать селекцию на них. Популяционная генетика стала теоретической основой системы крупномасштабной селекции, которая интегрировала самые новейшие достижения в этой отрасли генетики, методы искусственного осеменения и длительного хранения гамет сельскохозяйственных животных, а также современные способы сбора, хранения и анализа генетической информации с использованием современных ЭВМ.

Широкое использование крупномасштабной селекции прежде всего в молочном скотоводстве, а затем и в других подотраслях животноводства позволило резко ускорить темпы генетического совершенствования разводимых в стране пород сельскохозяйственных животных. Возможности этой системы далеко не использованы, и она будет все шире внедряться в практику племенного дела.

Вместе с тем у этой системы, основанной на методах генетики популяций, имеются и ограничения. Так, поиск быка-улучшателя основан на оценке по потомству большого числа производителей. А это связано с большими затратами, поскольку быки-улучшатели — явление редкое, а выдающиеся — чрезвычайно редкое. Кроме того, ряд селекционных программ, направленных на выведение животных, невосприимчивых к некоторым заболеваниям (лейкоз, мастит), пока не дают существенных сдвигов. Поэтому селекционеры сельскохозяйственных животных все чаще обращают внимание на клеточную и генную инженерию. Один из методов клеточной инженерии — трансплантация ранних эмбрионов, получение идентичных близнецов, химерных животных — уже широко внедряется в практику селекции сельскохозяйственных животных и ускоряет генетическое улучшение пород.

С 50-х годов до настоящего времени разработаны методы генетического манипулирования, которые сложились в четкую систему генной инженерии животных. К этим работам относится пересадка клеточных ядер у лягушек методом микроинъекции Бригса и Кинга. В настоящее время перенос ядра соматической клетки в энуклеированную зиготу успешно проведен на мышах.

Освоен метод переноса ядра путем слияния кариопластов. Разработана методика получения химер у млекопитающих.

Гарднер разработал методику инъекции бластомеров в бластоцисты реципиента. Эта методика освоена на мышах Бутлером. На ее основании получены химеры у овец. Указанные работы, связанные с клеточной инженерией животных, подготовили подходы к генной инженерии сельскохозяйственных животных. Один из методов получения трансгенных животных заключается в переносе генов в культивируемые клетки, а затем их инъецировании в бластоцисту. Разработаны различные методы внесения генов в генотип реципиентных клеток.

Наибольшее распространение в последнее время получил метод инъецирования чужеродных генов в пронуклеус зиготы животных. Впервые инъецирование было проведено на ооцитах лягушек: в яйцеклетки вводили определенную ДНК, и были отмечены интеграция и транскрипция.

В 1981 г. был инъецирован ген β -глобина кролика в зиготу мыши. Ген, включенный в геном, имел вид длинного тандема организованных участков, которые корректно транскрибировались только в том случае, если они не содержали плазмидных компонентов (Т. Е. Wagner и др.).

Проявление действия встроенных генов, введенных путем микроинъекции, изучали на мышах. На ряде генов установлено их тканеспецифическое действие в зависимости от регуляторных элементов того или иного гена.

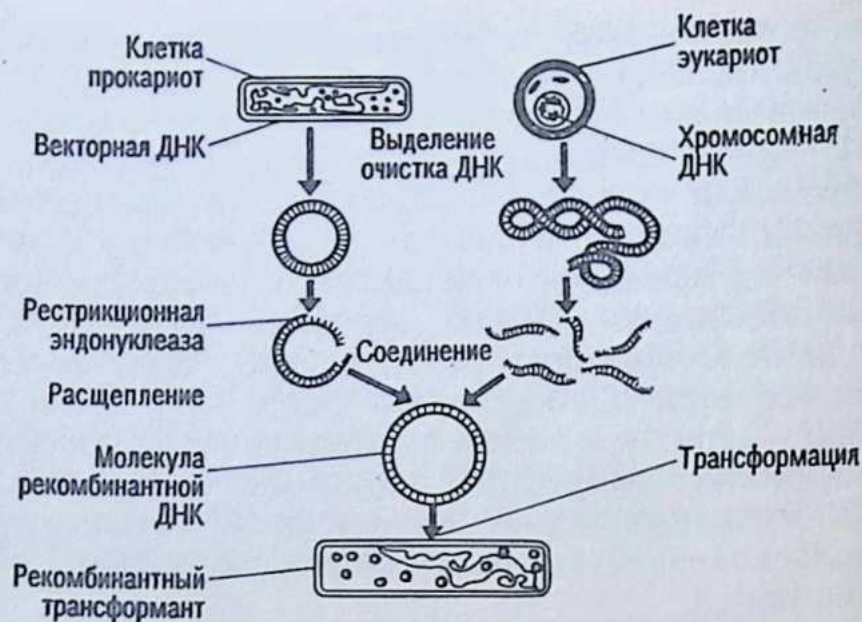


Рис. 2. Основные положения технологии расчленения молекулы ДНК в определенном месте

В 1980 г. в пронуклеус зиготы мыши была инъецирована плаزمида *pBR 322*, содержащая вставку генов вирусов *SV 40* и *HSV*. У трех мышей (3,8%) из 78 найдена ДНК, что подтвердило хромосомную интеграцию, однако ДНК подверглась реорганизации.

При инъецировании гена β -глобина человека в комплексе с геном ТК *HSV* в пронуклеусы зигот мыши установлена интеграция у пяти из 33 плодов (15,1%), извлеченных на 16—17-й день.

Проведена микроинъекция в пронуклеус зиготы гена β -глобина кролика, экспрессия наблюдалась у пяти мышей.

Бринстер и др. инъецировали в пронуклеусы зигот мышей комплекс, включающий металлотioneин мыши с геном тимидинкиназы с промотором, интеграция была отмечена у семи из 41 мыши (17%), экспрессия наблюдалась у четырех особей. Наиболее активная экспрессия отмечена в печени и почках.

Революционные достижения в биологии, особенно в генетике, позволили создать принципиально новые биотехнологии, генетическая инженерия стала признанной, перспективной технологией.

В середине 70-х годов были открыты микробные ферменты, позволяющие разрезать молекулы ДНК в совершенно определенном месте, то есть выделять нужные ее участки, что позволило искусственно сливать гены или создавать рекомбинантную ДНК. Основные положения этой технологии изображены на схеме (рис. 2).

Стало возможным идентифицировать и клонировать определенные гены. Выбранный ген должен иметь какую-либо биологическую функцию, которая может быть детектирована. Выде-



Рис. 3. Стадии выделения гена из одного организма и переноса его в другой организм

ленный ген должен быть введен в ДНК-молекулу переносчика или вектора — посредника при переносе гена. Таким образом, ген может быть перенесен из организма донора в организм реципиента, который впоследствии будет в состоянии реплицировать чужеродный ген. Следовательно, чужеродный ген в организме реципиента будет не только действовать, но и реплицироваться.

Генная инженерия в основном состоит из выделения из одного организма гена (ДНК), определяющего желательный признак, и переноса его в другой организм, который получает новый генетически наследуемый признак. На схеме (рис. 3) приведены стадии этого процесса для различных организмов.

Современная биотехнология создает возможность передачи отдельного гена или блока генов, контролирующих определенный признак. Такой ген может быть перенесен из любого организма в любой другой организм. При этом в новом организме он будет, вероятно, способен проявлять свойственную ему экспрессию, то есть проявляться в фенотипе. При этом организмом-реципиентом может быть как растительная, так и животная форма.

Использование биотехнологии в селекции животных

Параллельно с генной инженерией разработан ряд других направлений биотехнологий. Одно из них — трансплантация оплодотворенных яйцеклеток и ранних эмбрионов. Этот метод успешно применяется в работе с крупным рогатым скотом начиная с 1951 г. Его используют для получения потомства от наиболее ценных животных.

Метод трансплантации эмбрионов стал одной из технологий генетической инженерии в работе с животными. Первым шагом в этом плане стала успешная трансплантация оплодотворенных яйцеклеток, в ядро которых был введен чужеродный ген путем микроинъекции. Опыты Пальмитера, Бринстера продемонстри-

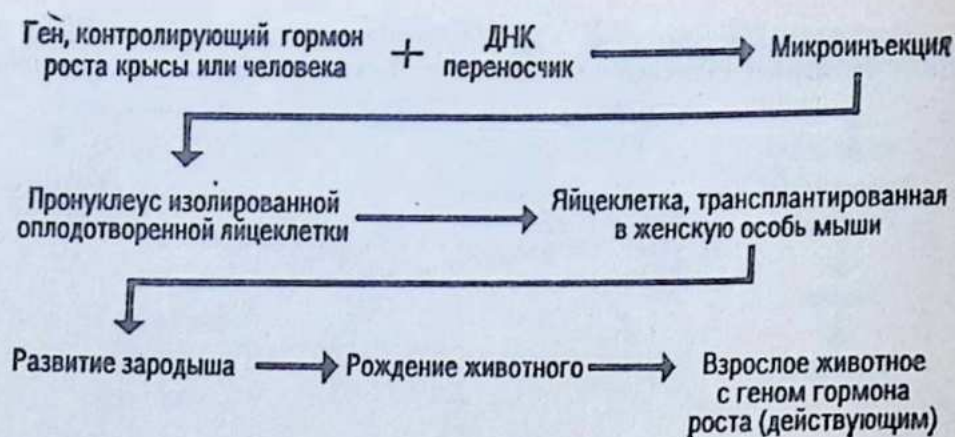


Рис. 4. Трансплантация путем микроинъекции оплодотворенной яйцеклетки с чужеродным геном в ядре

ровали возможность применения методов молекулярной генетической инженерии в работе с мышами на схеме (рис. 4).

Опыты на лабораторных животных быстро переросли в технологии, практически применяемые уже на практике. Для получения рекомбинантных продуктов используют бактерии, грибы и все чаще клетки животных. Это позволяет получать искусственным путем белки, которые в норме продуцируются только животными. Нужные гены были перенесены в соответствующие организмы, в которых и проявляли экспрессию (табл. 3).

Этот метод широко используется в медицине и ветеринарии. В качестве примера можно привести ренин, используемый в сыроварении. Широки возможности получения таким путем и ферментов, используемых для изготовления моющих средств и в приготовлении пищи.

В настоящее время исследования направлены на создание системы ферментов для получения глюкозы из целлюлозы. Гены, контролирующие выделение ферментов, которые обнаружены у медленнорастущих грибов, были клонированы и перенесены в быстрорастущие бактерии и дрожжи. Это позволило создать эффективную технологию получения из целлюлозы древесины легкопереваримых углеводов. Проводятся работы по получению ферментов, участвующих в гидролизе лигнина, что позволяет создать технологию его расщепления на более простые молекулы, а это в дальнейшем даст возможность получать биогаз или одноклеточный протеин. Это может стать основой технологии обработки грубых, целлюлозосодержащих кормов (биомасса и т. д.).

Развернуты работы по получению трансгенных животных. Установлено, что мышь из трансплантированной яйцеклетки может иметь одну копию гена гормона роста или несколько таких копий в своих хромосомах. Гормон роста программируется геном, стимулирует рост организма и определяет конечный его размер.

3. Животные белки, продуцированные микроорганизмами после перенесения в них соответствующих генов

Белок	Микроорганизм
Инсулин	<i>E. coli</i>
Гормон роста человека и животных	»
Интерфероны человека	<i>E. coli</i> и дрожжи
Интерфероны крупного рогатого скота	То же
Активатор плазминогена	»
Альбумин сыворотки человека	Дрожжи
Фактор свертывания крови VIII	Культура клеток млекопитающих

Гены, контролирующие образование гормона роста (как крысы, так и человека), уже изучены при введении в организм мыши. Все это указывает на реальную возможность использования методов генной инженерии при работе с высшими животными. Такая технология разрабатывается. При этом в первую очередь следует использовать гены, контролирующие интенсивный рост животных и эффективную их продуктивность. Исследователи этой проблемы нередко сталкиваются и с нежелательными последствиями введения чужеродного гена, в частности с потерей фертинга.

Генная и клеточная инженерия широко используются в ветеринарии. Большие потери при воспроизводстве скота и птицы вызываются различными заболеваниями. Особенно большой ущерб наносят инфекционные заболевания. Для борьбы с рядом болезней успешно применяют различные вакцины. Методами генной инженерии можно получить такие вакцины, которые невозможно получить традиционными методами. Эти вакцины могут быть более безопасными, дешевыми и стабильными по сравнению с существующими.

Иммунная реакция — мощный защитный механизм у животных. При попадании в организм чужеродного белка определенные клетки продуцируют антитела, призванные нейтрализовать его. Установлено, что определенная часть молекулы протеина является антигенной детерминантой. При помощи рентгенографии и кристаллографии можно не только увидеть структуру белка, но и установить локализацию антигенной детерминанты.

Возможность наблюдать трехмерную структуру антигенного сайта уже позволяет синтезировать полипептидную структуру, которая может служить в качестве синтетических антигенов для использования в вакцинации.

Гены, контролирующие образование таких полипептидных антигенов, могут быть синтезированы и введены в клетки, которые будут в массе продуцировать антигены.



Рис. 5. Гибридная технология для получения вакцины путем инъекции антигена

Важнейшая биотехнология для ветеринарии — гибридная. Этот метод показан на схеме (рис. 5). Путем инъекции антиген вводят мышам. Клетки костного мозга мыши, продуцирующие антитела, сливаются (смешиваются) с клетками, способными расти в культуре (миеломные клетки). В результате гибридные клетки продуцируют антитела. Эти клетки можно клонировать. Клеточную линию, продуцирующую желательные антитела, отбирают, и в постоянной культуре она становится источником антител. Этот метод используют для идентификации антигенных белков, а также специфических антигенных сайтов, определяющих образование антител.

В настоящее время эти технологии получают все большее развитие.

Развитие методов биотехнологии животных

В отношении сложнообусловленных полигенных количественных признаков, к которым относятся большинство хозяйственно ценных показателей сельскохозяйственных животных, в селекции применяются методы популяционной генетики.

Методы определения изменчивости, повторяемости, наследуемости количественных признаков, генетических корреляций между ними положены в основу современной крупномасштабной селекции.

Все это дает возможность точно планировать селекционно-племенную работу по улучшению количественных признаков.

Широкое использование информатики и ЭВМ позволяет создать базу для оперативного анализа генетической информации в огромных по численности популяциях сельскохозяйственных животных. Все это значительно ускоряет темпы генетического улучшения разводимых в стране пород, активизирует процессы выведения новых линий, типов и пород животных.

Генная инженерия представляет собой логическое продолжение развития и применения новейших генетических методов в селекции животных. Возможности генной инженерии увеличились в связи с открытиями в области регулирования действия генов. Инъекция клонированного гена ростового гормона человека свиньям и овцам стала возможной в результате двух новых методов биотехнологии — микрохирургии на эмбрионах и рекомбинации ДНК. Микрохирургия на яйцеклетках и эмбрионах и рекомбинация ДНК в принципе открывают возможность более интенсивной селекции животных. Сочетание генетического манипулирования с уже широко распространенными методами длительного хранения спермы и эмбрионов дает селекционеру невиданные возможности более эффективной селекции.

Пересадка ядер яйцеклеток земноводных

В 1952 г. Бриггс и Кинг выделили отсасыванием ядро из клеток бластулы лягушки, перенесли его пипеткой вместе с окружающей мембраной и небольшим количеством цитоплазмы в активированную яйцеклетку с удаленным ядром и получили живой эмбрион. Это позволило установить, что на стадии бластулы процессы дифференцировки не являются необратимыми. В 1955 г. эти же авторы доказали, что способность донорского ядра давать начало развитию жизнеспособного организма лягушки снижается по мере развития организма донора. В других опытах показана возможность получения этим методом головастиков лягушек, способных к самостоятельному питанию. В 1962 г. (Гёрдон) было установлено, что, по крайней мере, в 4% случаев ядра клеток эпителия желудочно-кишечного тракта головастиков могут давать начало нормальным взрослым лягушкам. Следовательно, даже ядра клеток с высокой степенью специализации в определенной степени обладают свойством тотипотентности. Однако в данном случае эмбриональный рост был замедленным, и в процессе развития отмечалось много аномалий. А при пересадке ядер ооцитов лягушки в лишенные

264
ядер яйцеклетки были получены нормально развитые головастики. Рост этих лягушек был практически нормальным. Ядра из культуры эпителиальных клеток головастиков обуславливали при пересадке их в яйцеклетки, лишенные ядер, формирование нормальных взрослых особей с частотой менее 1%. В опытах на лягушках количество успешных пересадок было низким — менее 6%, причем отмечались многочисленные аномалии развития. Взрослые особи были получены в опытах с трансплантацией ядер эмбрионов, находящихся на ранних стадиях развития, и ядер культивированных эпителиальных клеток головастиков. При пересадке ядер из клеток взрослых лягушек в зиготы взрослых особей получено не было.

Особый интерес для практики селекции животных представляет возможность пересадки клеточных ядер у млекопитающих. Имеются сведения об успешном выделении ядер с помощью микропипетки и переносе их в лишенные ядра зиготы мыши. Внутренняя клеточная масса и клетки трофической эктодермы были выделены из бластоцистов и их ядра перенесены в энуклеированные зиготы мыши. Сообщается, что путем переноса ядер внутренней клеточной массы бластоцистов получены три мыши, однако не было ни одного случая рождения мыши после переноса в зиготу ядра из клетки трофобласта.

Особый интерес представляет методика переноса ядер путем слияния кариопластов. Мак Гартх и Солтер создали метод слияния кариопластов с лишенными ядер зародышами мыши. Для удаления пронуклеуса они располагали пипетку у поверхности желточной мембраны и всасывали в нее пронуклеус. Затем пипетку оттягивали до тех пор, пока желточная оболочка не разрывалась. Пипетку с мембраной и пронуклеусом (кариопласт) наполняли раствором инактивированного вируса Сендаи, а затем все содержимое вводили в околожелточное пространство лишенной ядра зиготы. После слияния кариопласта и желточной оболочки зиготы эмбрионы культивировали до стадии бластоциста. Таким образом, были получены 64 эмбриона. После пересадки их мышам-реципиентам получено 7 потомков, из них 5 достигли половой зрелости. Мак Гартх и Солтер использовали метод слияния кариопластов для пересадки ядер бластомеров в лишенные ядра зиготы мыши и нашли, что донорские ядра из эмбрионов, имевших более двух бластомеров, не обеспечивали полного развития.

Сведений о пересадке ядер эмбрионам сельскохозяйственных животных в литературе почти нет. Вполне вероятно, что после соответствующей модификации техника слияния кариопластов может быть использована и для переноса ядер в эмбрионы сельскохозяйственных животных. Однако, чтобы перенос ядер стал практически осуществим, необходимо найти источник ядер, способных дать начало нормальному организму, или создать

методы перепрограммирования дифференцированных ядер в недифференцированные. Это очень сложная исследовательская задача.

В истории развития биотехнологии животных значительное место занимает создание химерных животных. Эти методы включают слияние бластоцистов и получение химер из клеток двух и более родителей. Первые химеры млекопитающих были получены Тарковским путем слияния эмбрионов мышей. Он удалял прозрачную оболочку 8-клеточных эмбрионов мыши с помощью пипетки и помещал их в непосредственной близости одна от другой в небольшую покрытую парафином каплю на 5—30 мин. Затем их культивировали в течение 24 ч и более. Через 16 ч от начала культивирования отмечался процесс слияния, а через 24 ч завершалась стадия бластоциста. Из 153 пересаженных бластоцистов в 36 случаях получено потомство. У некоторых плодов отмечалась мозаичность. Доказательством успешного слияния служили промежуточные половые признаки и (или) смешанная пигментация.

Минц растворял прозрачную оболочку с помощью проназы у 8-клеточных эмбрионов, что создавало лучшие условия для слияния. Исследования, проведенные им, позволили отработать технику получения химер у мыши. Были получены взрослые мыши, химерная природа которых подтверждалась содержанием изоферментов.

Пересадка ядер яйцеклеток млекопитающих

Метод совмещения бластомеров был использован при попытке получения химер у овец. Успех был ограниченным до тех пор, пока не была разработана техника введения совмещенного бластомера в прозрачную оболочку и включения прозрачной оболочки в агаровый блок. Блоки затем переносили в яйцеводы овец и извлекали обратно через 4—5 дней. Бластоцисты, имевшие нормальный вид, пересаживали овцам-реципиентам. Из пересаженных 110 агрегатов, включавших 2—8-клеточные эмбрионы, получено 36 химерных овец (С. В. Febilly и др., 1984). Те же авторы использовали этот метод слияния для получения межвидовых химер овцы и козы. Химеры крупного рогатого скота получены путем слияния бластомеров с использованием искусственной прозрачной оболочки.

Впоследствии был разработан и другой метод получения химер.

Методика совмещения бластомеров разработана Гарднером с целью получения химер у мышей. Бластоцисты обрабатывали проназой для удаления прозрачной оболочки, после чего донорские клетки разъединяли с помощью пипетки в среде, свободной от кальция и магния. Донорские клетки переносили с по-

64
мощью пипетки в бластоцель эмбрионов реципиентов. Этим методом из 47 рожденных мышат и эмбрионов 6 были химерными.

Иммунохирургическое удаление трофической эктодермы из внутренней клеточной массы донора и последующее инъецирование клеток внутренней клеточной массы в бластоцисты-реципиенты использованы Бутлером и другими для получения химер у овец. Получено 15 ягнят, из которых 6 были химерными.

Получение химер — важный метод для изучения процессов развития эмбрионов млекопитающих. При получении химер в эмбрионы сельскохозяйственных животных вводят новый генетический материал. Если с помощью генной инженерии могут быть созданы клетки с нужными наследственными признаками, то их можно инъецировать в бластоцисты для получения химер. Если инъецированные новые клетки будут участвовать в формировании зародышевых клеток, то геном химерных животных может стать источником материала для селекционной работы.

Примером этому может служить получение клеточной линии мышей. Эмбрионы в возрасте 3 и 6 дней были вживлены в мышонку мыши. Развитие эмбрионов было дезорганизовано, они разрастались, образуя различные ткани (тератомы). При введении клеток этих тератом в брюшную полость мыши они образовали слой эктодермы, покрытый эндодермой. Такие эмбрионидные тела можно поддерживать в течение нескольких поколений.

Бринстер использовал клетки из центральной части этих тканей в качестве источника для инъекции в бластоцисты мыши. Получены особи с мозаичной окраской шерстного покрова. Для испытания способности этих клеток к воспроизводству их инъецировали в бластоцисты мыши. Оказалось, что 3 из 48 живых мышей представляли собой химер. Из них один самец был впоследствии использован в спаривании. При этом было обнаружено, что он нес половые клетки, полученные от тератомы. Папаиоану и другие вводили культивированные клетки эмбриональной опухоли в бластоцисты. Получены 3 линии химер, у животных одной из которых после рождения развивались опухоли.

Эванс и Кауфман разработали метод получения пригодных для размножения (тотипотентных) клеток из мышинных эмбрионов культивированием в искусственной среде. Бластоцисты получали от обработанных прожестинном мышей на 4—6-й день после охоты и культивировали. После прикрепления трофобласта к чашке внутренняя клеточная масса превращалась в яйцевидное цилиндрическое образование, которое можно было удалять и культивировать отдельно. Эти клетки получили название клеток ЕК в отличие от эмбриональной карциномы. Клетки ЕК могут давать начало тератомам, то есть могут размножаться и для них характерно стабильное число хромосом, нормальное

для вида. При инъектировании этих клеток в бластоцисты они могут давать начало химерам. Этим методом получено 330 особей потомства, из них около 50% были химерами. При спаривании оказалось, что из них около 20% имели половые клетки. Таким образом, получение культуры клеток типа ЕК может служить ценным источником клеточного материала для генной инженерии в животноводстве.

Основные методы генной инженерии животных

Успех генной инженерии на животных зависит от возможности вставок генов (представляющих интерес) в геном. Два метода открывают большие возможности для вставки клонированных генов в ядро клетки: перенос генов в пронуклеус и вирусная трансфекция.

Перенос генов с ДНК. Установлено, что инфекционность ДНК аденовируса 5 в однослойной культуре клеток КВ человека может быть значительно повышена путем преципитации вирусной ДНК с помощью фосфата кальция.

Метод оказался эффективным и для других ДНК. Используя перенос генов с помощью ДНК, Виглер и другие смогли перенести ДНК, включающую ген тимидинкиназы (ТК), выделенный из вируса герпеса (*HSV-1*) в культивированные клетки мыши, в которых тимидинкиназа отсутствует. Полученные в результате этого клоны, содержащие вирусную тимидинкиназу, стабильно поддерживались в течение ряда поколений. Поскольку эффективность трансфекции ДНК с фосфатом кальция невелика, то для отбора клонов клеток, трансформированных по тимидинкиназе, была использована среда НАТ (гипоксантин, аминоптерин и тимидин). Клетки, не прошедшие трансформацию, не имели ТК, поэтому после трансформации их можно было элиминировать (отбросить) и культивировать в среде, содержащей НАТ. Выжили только клоны с функциональной тимидинкиназой. Для селекции можно использовать свойство устойчивости к определенным веществам, например неомицину.

Вирусная инфекция. Вирусная инфекция — естественный путь введения генетической информации в клетки (животных). Кроме того, вирусы используются для трансформации клеток с ценными генами. Проведена работа по инъекции ДНК вируса SV40 в бластоцель мышинных эмбрионов и пересадке трансформированных эмбрионов в матку псевдобеременных мышей. Эта ДНК обнаружена у 25 из 29 мышей, полученных из 80 инъектированных эмбрионов. Анализ на гибридную ДНК показал, что 10 мышей были носителями ДНК вируса SV0. Вирусная ДНК была неравномерно распределена по тканям, вероятно, в связи с неодинаковым уровнем инфицирования клеток внутренней клеточной массы или в результате гибели некоторых линий эмбриональных клеток, несущих вирус, в процессе развития.

Показано, что мыши, зараженные вирусом лейкемии Молони на стадии 4—8 клеток, стабильно содержали одну копию вируса в своем геноме. Вирус передавался потомству как менделевский доминантный признак. Мыши II поколения были заражены и поражались лейкемией. Проявление вируса у взрослых животных варьировало: у некоторых линий мышей развивалась ранняя лейкемия, а у других заболевание развивалось в более позднем возрасте.

Одно из возможных последствий внедрения гена с применением любых способов — образование вставочных мутаций, то есть изменений в функции собственного гена в результате вставок чужого гена в него или около него. Одна линия мышей, трансформированных вирусом лейкемии Молони, не могла быть доведена до гомозиготности. В результате ранней эмбриональной смертности гомозиготных эмбрионов продукт полного доминирования гена в процессе развития отсутствовал.

Получение мутантов путем вставок открывает огромные возможности для генетических исследований.

Данные об использовании ретровируса для трансформации клеточных линий млекопитающих по функционально неселектируемому гену в литературе не встречаются. Однако Миллер и другие описали синтез поддающегося селекции ретровируса, содержащего миниген, контролирующий ростовой гормон крысы, который может инфицировать культивируемые клетки и обуславливать выработку большого количества ростового гормона. Вставка вирусов в клеточный геном происходит в одном месте без перестройки. Было установлено, что изменение характера проявления действия гена обусловлено первоначальным местом его встройки, а не последующей модификацией.

В настоящее время разработаны системы различных ретровирусных векторов, обеспечивающие надежные трансфекции чужеродных генов в организм птиц и млекопитающих.

Таким образом, с учетом сложности генома животных, а также наличия взаимодействия генов в ряде случаев эффект вставки гена будет проявляться не в чистом виде, а сопровождаться другим, иногда не контролируемым пока изменением генома.

По-видимому, огромную роль здесь может играть и так называемый эффект положения гена, то есть воздействие внедренного гена будет во многом зависеть от его локализации в геноме реципиента.

Имеются данные о том, что вирусы саркомы Молони у мышей могут быть использованы для инфицирования клеток эмбриональной карциномы, которые способны к самостоятельному размножению, как и клетки эндодермы эмбрионов мышей, в результате чего вирус, находившийся в клетках в большом числе копий, не проявлял своего действия вследствие метилиро-

вания. Однако, если ДНК вводилась в дифференцированную клетку, действие гена проявлялось.

Существуют и другие, не вирусные, элементы, которые могут служить носителями при переносе генов. Это так называемые мобильные элементы. В 1983 г. была изолирована и описана ДНК мобильных *P*-элементов из дрозофилы. Эти элементы иногда образуют вставки в геноме дрозофилы. Они могут быть вырезаны с большой точностью, после чего мутировавший в результате вставки ген снова начинает проявлять свое действие. При инъекции ДНК предполагаемого *P*-элемента задней стороны яиц мух типа М перед самым образованием полярных клеток отмечалась высокая степень мутабельности в отдельном локусе, который контролирует морфологию волосков и щетинок на кутикуле взрослых мух. Появление мутантных линий можно было демонстрировать гибридизацией *in situ*, при которой проявлялось включение ДНК *P*-элемента. Включенные в геном *P*-элементы не содержали ДНК дрозофилы, которая присутствовала в оригинальном гибридном материале или в участке плазмиды-носителя *pBR 322*, что доказывает транспозицию элемента *P* в геном. Затем Рубин и Спрадлинг осуществили соединение гена, контролирующего ксантиндегидрогеназу, и инъецировали эту конструкцию в эмбрионы. Взрослые мухи передали своему потомству признак розовой окраски глаз, и таким образом была доказана наследуемость гена. Ученые предложили две модификации ДНК элемента *P* для того, чтобы сделать его более пригодным в качестве носителя: включение большого числа сайтов рестрикции в этот элемент и создание аномального *P*-элемента, кодирующего транспозазу, но не включаемого в геном. *P*-Элементы были использованы для вставки различных генов в геном дрозофилы, в частности, допа-декарбоксилазы и спиртовой дегидрогеназы. Оба гена проявляли свое действие на соответствующих стадиях развития, причем в тех тканях, в которых этот ген обычно проявляется.

Наиболее широко для введения генов используется микроинъекция. Весьма совершенным методом, используемым в последнее время для изучения проявления действия генов, является микроинъецирование в пронуклеус зиготы. Впервые инъецирование было проведено на ооцитах лягушки *Xenopus laevis*, в которые вводили хорошо известную ДНК. В 1975 г. Колман ввел в яйцеклетки и ооциты *X. laevis* ДНК клонированные гены и наблюдал проявление их действия, чтобы изучить, присутствует ли механизм переноса и в ооцитах, и в яйцеклетках. Установлено, что транскрипция рекомбинантной ДНК происходила в обоих случаях. Было показано, что ооциты *X. laevis* могут транскрибировать рекомбинантные ДНК вполне эффективно, если ДНК вводится в зародышевый пузырек. В 1981 г. осуществлено инъецирование гена β -глобина кролика в оплодотво-

ренные яйцеклетки *X. laevis*. Инъецированная ДНК прошла репликацию нехромосомным путем в период развития яйцеклетки до стадии гастрюлы. В возрасте 6 мес инородный ген присутствовал только в хромосомной ДНК; все внегеномные ДНК, кодирующие инородные глобины, деградировали в процессе развития.

Изучение проявления действия генов, введенных путем микроинъекции, у млекопитающих проведено на мыши. На ряде клонированных генов было продемонстрировано их тканеспецифическое действие. Следует отметить, что геном мыши относительно хорошо картирован, что дает возможность оценивать проявления включенного гена относительно известной генетической базы. В 1980 г. осуществлено инъецирование в пронуклеусы яйцеклеток мыши плазмиды *pBR 322*, содержащей вставку *SV 40* и ген *HSY-TK*. В одном из опытов у 3 мышей из 78 присутствовала ДНК, дававшая сильную гибридизацию. Можно предположить, что произошла хромосомная интеграция, однако ДНК подверглась реорганизации. При инъецировании гена β -глобина человека в комплексе с геном *HSY-TK* в пронуклеусы яйцеклеток мыши геномная ДНК пяти из 33 плодов, извлеченных на 16—17-й день, давала сильную гибридизацию при проведении проб как на ген β -глобина, так и на ген *HSY-TK*. В клетках было найдено по несколько копий каждой ДНК, находившейся в составе ассоциатов с ДНК высокой молекулярной массы. В одном из плодов, положительных по *HSY-TK*, отмечалось проявление действия гена тимидинкиназы. Бринстер и другие инъецировали в яйцеклетку мыши комплекс, включавший промотор гена металлотioneина-1/MT мыши, соединенный с геном *HSY-TK*, и нашли, что у семи из 41 мыши ген был интегрирован, но только у четырех особей отмечалось проявление *HSY-TK*. Экспрессия была наибольшей в печени и почках трансгенных животных и четко усиливалась солями тяжелых металлов, что отражает специфическое действие промотора. Встроенный комплекс был представлен в хромосоме несколькими прямыми tandemными повторами. При микроинъекции гена β -глобина кролика в яйцеклетки мышей из 18 полученных мышей восемь имели положительную реакцию. Число копий гена в клетках колебалось от 2 до 20 и более, однако корреляция между количеством инъецированной ДНК и числом интегрированных копий отсутствовала. Это еще раз подтверждает всю сложность процесса действия интегрированных генов в геноме животных. При разведении этих мышей пять особей передавали инъецированную ДНК потомству. Отдельные особи в потомстве имели значительно большее число копий гена β -глобина по сравнению с родителями, что может быть объяснено в том случае, если родители имели мозаичную природу.

Гордон и Руддл осуществили микроинъекцию в яйцеклетки мышей двух разных типов генетического материала. Они выделили трех мышей, которые соответствовали по своим характеристикам трансгенным, то есть приобретали сайты рестрикции инъецированной ДНК: обладали способностью передавать этот участок с зародышевыми клетками. Из полученных в потомстве 15 особей девять унаследовали новые участки рестрикции, имевшиеся у родителей, причем эти участки остались неизменными.

Потенциальные возможности микроинъекций для создания трансгенных мышей с новыми фенотипическими признаками показаны Палмитером и др. Они инъецировали комплекс, полученный в результате слияния генов и включающий промотор гена МТ, соединенный со структурой гена гормона роста крысы. Из 21 мыши у семи произошла интеграция инъецированных участков. Интересно отметить, что у шести мышей произошли фенотипические изменения — они росли быстрее контрольных животных. Наиболее сильное проявление гена отмечалось в печени, что снова подтвердило тканеспецифичность стимулятора МТ мышей в организмах животных.

Было проведено инъецирование ряда других генных комплексов в зиготы мышей. При соединении промотора гена эластазы крыс со структурным геном ростового гормона человека удалось добиться секреции ростового гормона человека клетками поджелудочной железы. Подобным образом был инъецирован в яйцеклетку ген миозина крыс, что проявлялось в специфической мускульной реакции. Была также осуществлена инъекция гена главного комплекса гистосовместимости свиней в зиготы мыши, результатом чего была реакция, характерная для трансплантации, на антиген, который кодирован инъецированным геном.

Палмитером и другими описана линия трансгенных мышей с комплексом МТ-МК, которая не передавала по наследству вставленный ген с мужскими особями в пяти поколениях. Возможно, что интеграция генов произошла таким образом, что оказалась нарушенной функция важного гена, контролирующего сперматогенез. Было установлено, что экспрессия вставленного гена колебалась в разных поколениях мышей, что может быть связано с варьированием структуры хроматина от поколения к поколению.

Зиготы сельскохозяйственных животных имеют непрозрачную цитоплазму, что делает визуальный контроль за пронуклеусами более трудным, чем у мышей. У свиней эта трудность была преодолена с помощью центрифугирования зигот. Центрифугирование позволило визуализировать пронуклеус. Пронуклеусы яйцеклеток коров и овец также становятся видимыми после центрифугирования. Используя центрифугирование и оп-

тику с интерференционным контрастом с источниками света высокой интенсивности, Хаммер и другие в 1985 г. впервые получили трансгенных свиней. Однако результативность этих опытов была очень низкой. Так, для получения одного трансгенного ягненка потребовалось получить 1032 инъецированных зигот, а для получения 20 трансгенных поросят потребовалось 2035 инъецированных зигот. В этой работе пересаживали комбинацию промотора гена МТ в соединении со структурным геном ростового гормона человека. У 11 из 20 поросят проявление действия структурного гена было подтверждено результатами радиоиммунологического анализа плазмы на ростовой гормон человека. Число вставок генов колебалось от 1 до 490. Трансгенных свиней в настоящее время изучают с целью определения влияния генных вставок и их экспрессии на фенотип животных.

Последние достижения в изучении функции генов получены довольно быстро благодаря разработке технологии рекомбинантных ДНК и биологической технологии. Эти технологии все шире начинают применяться к сельскохозяйственным животным, в результате чего получены химеры и трансгенные особи. Исползованию технологии введения генов в геном сельскохозяйственных животных должно предшествовать изучение того, как функционируют эти генные вставки. Необходимо знать, как влияют на экспрессивность генов активаторы и усилители (энхансеры). Должна быть изучена тканеспецифичность проявления действия генов, определены функции генов, контролирующих физиологические процессы, влияющие на продуктивность. Требуется более подробное изучение генома животных. В принципе каждое трансгенное животное может потенциально дать новую линию, поскольку вставленный ген способен занимать различные позиции в геноме. Однако потребуются изучение связей, обусловленных положением вставленного гена.

Темпы исследований в области клеточной и генной инженерии лавинообразно возрастают, захватывая все новые и новые неизведанные пути. Наибольшая точка роста наметилась в использовании методов генной и клеточной инженерии на сельскохозяйственных животных.

По мере накопления факторов будут создаваться более реальные условия для использования этих методов в селекции сельскохозяйственных животных.

Методы введения генов

В настоящее время уже разработан ряд методов клонирования генов и пересадки, их направленного изменения. Один из важных аспектов манипуляций с ДНК состоит в том, что можно пользоваться одними и теми же методами независимо от того, являются ли источниками материала бактерии, растения или

животные, в том числе сельскохозяйственные. В сущности любую ДНК можно рекомбинировать с любой другой ДНК.

Для зооинженеров особый интерес представляют методы переноса генов в клетки животных и методы, пригодные для встраивания генов в геном животных. Имеются несколько устоявшихся групп методов — вирусные, химические, физические, метод слияния и новый метод — использование ретровирусов.

Вирусные методы. ДНК-содержащие вирусы используются как векторы переноса генов. Был разработан аденовирусный вектор, который эффективно инфицирует клетки животных, в результате чего копии (одна или несколько) рекомбинантной ДНК вируса могут быть интегрированы в геном клетки реципиента. Особенно следует отметить вирус папилломы крупного рогатого скота. ДНК этого вируса реплицируется вне хромосом, так что основанные на вирусе папилломы крупного рогатого скота векторы могут оказаться пригодными для поддержания генов в клетках в неинтегрированном состоянии, то есть они могут функционировать в цитоплазме. Часто эти векторы используются в так называемой челночной форме, способной реплицироваться как в бактериальной, так и в животной клетках. Правда, многие из наиболее изученных вирусов могут реплицироваться в клетках, и некоторые из них могут уничтожать клетки хозяина (литические векторы). Кроме того, они гораздо менее эффективны при трансформации, чем ретровирусы. Это можно отнести к их недостаткам. Поскольку они представляют потенциальную опасность и имеют низкую эффективность, их широкое использование на животных менее вероятно. Однако такие векторы широко применяются при конструировании вакцин.

Химические методы. Другим методом, активно используемым для встраивания генов в клетки культуры ткани, является введение ДНК с использованием фосфата кальция. Первоначальный метод Грэхама и Ван дер Эба модифицирован Виглером и сотр., чтобы встраивать в геном клеток млекопитающих, растущих в культуре, фрагмент ДНК, несущий один или более генов. Этим методом в клетки культуры животных тканей было перенесено большое число различных генов.

Трансфекцию проводят пипетированием суспензии ДНК, скомплексированной в небольшие преципитаты с фосфатом кальция на монослой клеток, растущих в чашке для культивирования. При этом имеется ряд модификаций. Например, вместо фосфата кальция можно использовать диэтиламиноэтилдекстран, или клетки можно подвергнуть воздействию глицерином после 2-часовой инкубации. Эффективность процесса варьирует в зависимости от особенностей клеточной линии. В оптимальных условиях и при очень рецептивных клетках (например, мышинных) на 100—1000 клеток можно получить одну клетку, которая

имеет интегрированную и экспрессирующую ДНК. Поскольку обычная эффективность этого метода (вероятность интеграции) составляет 10^{-5} — 10^{-7} , то нужен специальный метод для выявления этой случайной трансфекцированной клетки. Другими словами, должен присутствовать ген, который может спасти эту клетку от летального действия избирательного агента, добавляемого в инкубационную среду, или который дополняет генетический дефект, например ген, кодирующий гипоксантин—гуанинфосфорибозилтрансферазу — ГТФТ или тимидинкиназу — ТК. При этих условиях трансфекцированная клетка выживает, в то время как все другие клетки будут уничтожены. Попытки получить трансфекцированные клетки без избирательного давления обычно были безуспешными. Это типичный пример избирательного отбора на клеточном уровне.

Преимущество указанного и других химических методов состоит в том, что они относительно просты в исполнении, не требуют специального оборудования, а также инфекционного возбудителя, поэтому они совершенно безопасны. Недостаток их — низкая вероятность поглощения и экспрессии экзогенной ДНК. Таким образом, невысокая эффективность усложняет их применение на клетках животных, если только этот метод не сочетать с сильным селективным фактором.

Физические методы. Микроинъекция и электропорация — два основных класса физических методов. Электропорация — это сравнительно новый метод, который состоит в переносе ДНК непосредственно через клеточную мембрану посредством электрического тока. Этот метод широко используется для переноса целой гаммы генов в различные клетки, в том числе для переноса гена иммуноглобулина. Потенциальные возможности этого метода при переносе генов в геном животных пока неясны. Наиболее эффективен метод микроинъекции.

Микроинъекция широко используется, и ее преимущество состоит в том, что она дает высокий эффект (может быть трансфицировано до одной клетки из пяти инъекцированных). Область, где микроинъекция дает большой эффект, — это перенос генов в зиготы мышей и других животных, показано на схеме (рис. 6). Гордон первым установил, что если плазмидную ДНК микроинъектировать в пронуклеус зиготы мыши и затем поместить ее в яйцевод реципиентной самки, зигота может развиваться в нормальную мышь, несущую плазмидную ДНК в каждой клетке своего организма. Более того, инъекцированная ДНК может передаться потомству. Такие животные, несущие в своем геноме экзогенный ген, называются трансгенными.

Хаммер использовал этот метод для частичного исправления у мыши дефекта в продуцировании ее гормона роста. Соединив ген гормона роста крысы с активной регуляторной последовательностью, он получил сконструированную рекомбинантную

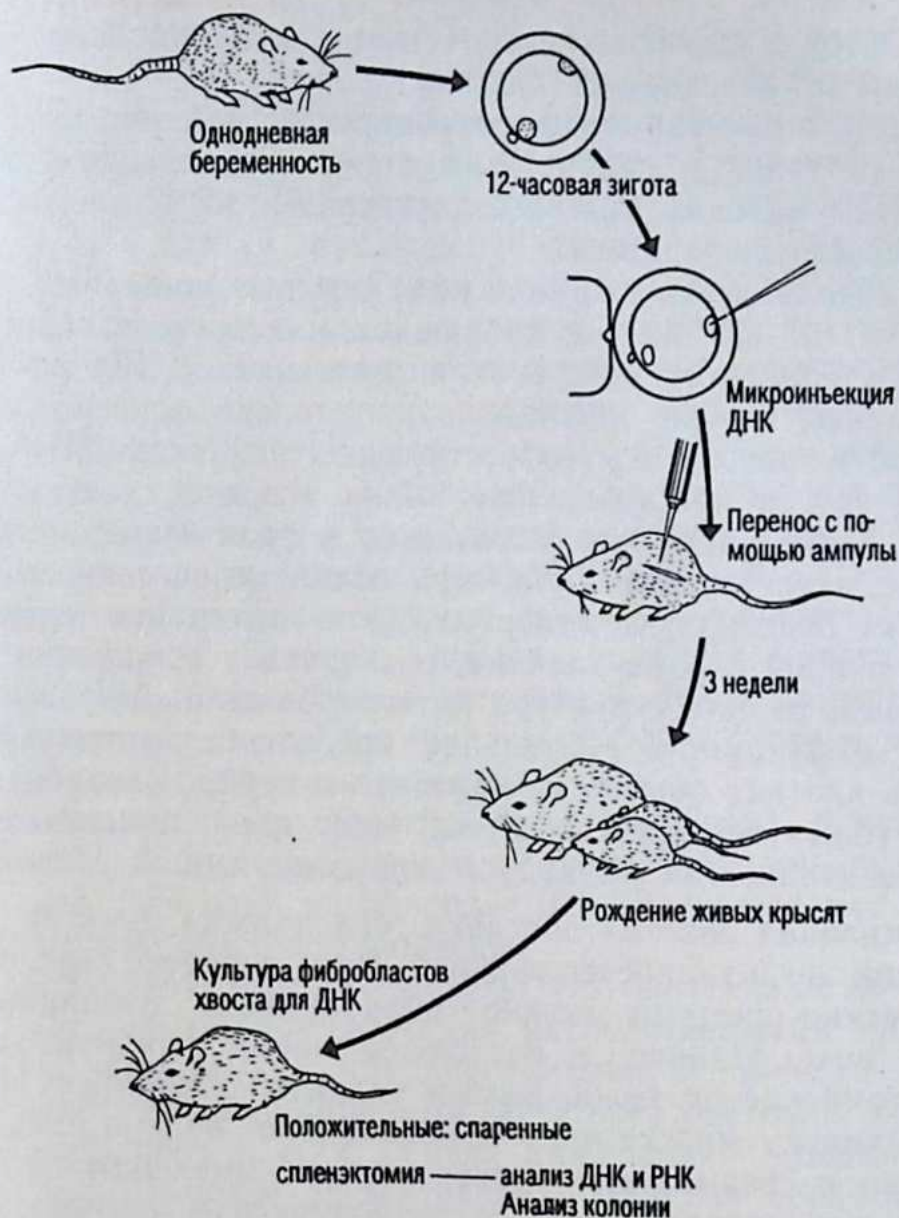


Рис. 6. Микроинъекция ДНК в пронуклеус зиготы мыши

ДНК, которая активно продуцирует гормон роста в организме генетически дефектной мыши. Следовательно, микроинъекцию можно использовать как систему транспортировки (внесения) гена в каждую клетку организма животного. Основное преимущество микроинъекции оплодотворенных яйцеклеток состоит в достаточно высокой вероятности получения трансгенных животных. Однако и этот метод не лишен недостатков. Так, данная процедура приводит к повреждению многих зигот в процессе инъекции, а регуляция встроенного гена недостаточно хорошо контролируется.

Методы слияния. Этот метод состоит в том, что какой-либо носитель сначала загружают ДНК и затем его сливают с клеткой-мишенью. К этим системам относятся, например, липосомы, которые представляют собой липидные везикулы и протопласты (клетки с удаленной клеточной стенкой). Преиму-

щество методов слияния состоит в том, что они более эффективны, чем химические методы.

Векторы, полученные из ретровирусов, как система транспортировки генов в геном, имеют ряд существенных преимуществ. Этим методом можно инфицировать 100% клеток, и они могут проявлять экспрессию.

При использовании химических методов, во-первых, только в одной из 10^3 — 10^7 клеток наблюдается экспрессия экзогенного гена, хотя большинство клеток и поглощает ДНК; во-вторых, одновременно можно инфицировать столько клеток, сколько требуется; в-третьих, в соответствующих условиях ДНК может интегрироваться как единичная копия в одном, хотя и произвольном, сайте, тогда как химические и физические методы часто приводят к вставке множества копий перенесенного гена в tandemных повторах; в-четвертых, хотя интеграция произвольна в отношении генома хозяина, она точна в отношении вирусного генома, то есть структура интегрированной ДНК известна; в-пятых, инфекция и длительное пребывание ретровирусного вектора в клетках обычно не наносят им вреда. Разработан ряд ретровирусных векторных систем; чаще всего пользуются векторами, основанными на вирусе лейкемии мышей Молони.

Оптимальная система доставки гена должна быть не только стабильной, но и тканеспецифичной. При переносе гена в гематопозитические системы можно обрабатывать изолированный костный мозг. Однако в настоящее время никакую другую ткань, кроме клеток кожи, нельзя удалить, обработать и заменить. Поскольку многие вирусы инфицируют только специфические ткани и связываются с рецепторами, имеющимися только на некоторых типах клеток, то ретровирусная частица, содержащая гликопротеиновую оболочку, которой она узнает только гематопозитические исходные клетки, позволит вводить ретровирусный вектор внутривенно при небольшой опасности инфицирования других клеток, кроме клеток костного мозга. Такая специфичность могла бы позволить переносить гены, например, в печень животных, поджелудочную и молочную железу или другие органы. Однако имеется проблема, которая состоит в том, что для интеграции ретровирусной ДНК, по-видимому, необходима репликация клеток. Например, неделящиеся клетки головного мозга инфицировать невозможно.

Идеальная система должна не только доставить вектор специфически в клетки нужного типа, но также и направить вектор встраивание в избранный сайт хромосомы путем гомологической рекомбинации — сложнейшая и пока не решенная задача у животных независимо от того, какие векторы используются — ретровирусные или основанные на плазмиде.

В заключение следует отметить, что все методы переноса генов используются для различных опытов на культуре ткани. Однако только два метода (микроинъекция и метод с использованием ретровирусов) оказались эффективными при встраивании функциональных генов в интактных животных. Микроинъекция представляет собой ценный метод осуществления переноса гена в клетки зародышевой линии, тогда как ретровирусы в настоящее время пригодны главным образом для переноса гена в соматические клетки, например в клетки костного мозга. В ближайшей перспективе, несомненно, появятся новые более эффективные методы генной инженерии животных, с помощью которых можно будет повысить продуктивность животных и надежность их защиты от болезней. Так, свиноводы будут выращивать свиней нового типа, достигающих товарной массы на 1—2 мес быстрее при более высокой (на 20—30%) оплате корма продукцией по сравнению со свиньями современных пород.

По мнению Т. Вагнера, ученого в области молекулярной и клеточной биологии, генная инженерия будет применена вначале на свиньях, затем на крупном рогатом скоте и других видах сельскохозяйственных животных.

Повышение продуктивности будет получено с использованием методов биотехнологии и главным образом путем переноса генов. Это один из наиболее перспективных для селекции животных методов биотехнологии.

В заключение можно отметить, что биотехнология — это система методов манипулирования наследственными признаками растений, животных и микроорганизмов. К области биотехнологии относятся индуцируемый мутагенез растений, трансплантация эмбрионов и т. д. Генная инженерия (соединение генов) — это наиболее эффективное и мощное средство, позволяющее направленно изменять наследственность организмов, в том числе млекопитающих. Он основан на выделении и переносе ДНК — носителя генов. Гены — химические коды, управляющие обменом веществ животного, его устойчивостью к некоторым заболеваниям, реакцией на внешние воздействия, то есть всем фенотипом организма, его морфологией и физиологией.

Можно переносить ген или цепь генов, отторгая их от ДНК одного организма и перенося его в ДНК другого организма. Например, ДНК животного организма включает в себя гены, кодирующие образование инсулина. Ученые теперь могут переносить гены человека в бактерии, которые затем продуцируют инсулин человека, необходимый для лечения больных диабетом. С помощью генной инженерии бактерии продуцируют гормоны роста свиней и крупного рогатого скота. Уже отработана заводская технология этого процесса. При введении скоту эти гормоны могут сильно повышать скорость роста, удой и оп-

лату кормов. Перенесены гены гормона роста человека и крысы в пронуклеус зиготы мыши, чтобы получить мышь значительно большего размера, чем ее родители. И такие особи действительно получены.

Конечная цель генной инженерии такая же, как и у традиционной селекции. Генная инженерия осуществляет на клеточном и геномном уровне то, что селекционеры проводят с целостным организмом. И те и другие в конечном итоге манипулируют генами. Но генная инженерия позволяет получать результаты быстрее. Все дело за быстрым совершенствованием методов рекомбинантных ДНК в применении к сельскохозяйственным животным.

Одно из непреодолимых ограничений традиционной селекции животных — обязательное наличие половой совместимости родителей. Даже межвидовое скрещивание часто не дает результатов вследствие бесплодия гибридов. Но это ограничение полностью снимается при переносе генов на клеточном уровне. В принципе теория позволяет даже гены растения или микроорганизмов пересадить животному, и наоборот. Генная инженерия имеет доступные подходы к неограниченному геномному спектру. Многие ученые придерживаются мнения, что возможности рекомбинирования генов почти неограничены.

Рассмотренные в разделе «Методы введения генов» подробно описаны в работе В. Ф. Андерсона, в которой дана сводка основных методов введения чужеродных генов в геном реципиента.

Перенос генов путем инъекции в пронуклеус зиготы

Как уже говорилось, существует несколько способов переноса генетической информации. Однако все большее распространение получает метод переноса генов путем микроинъекции в пронуклеус зиготы. Ниже подробно описана схема этого метода.

Для этой работы требуется комплект инструментов и приспособлений. В их число входят микроманипуляторы. Один из распространенных микроманипуляторов «Ляйц» имеет правосторонний и левосторонний узлы. Каждый из них устанавливается с одной из сторон от столика микроскопа: один — для пипетки, удерживающей зиготу, а другой — для манипулирования инъекционной пипеткой. Вертикальное движение регулируется отдельными механизмами грубой и точной настройки. Горизонтальное перемещение по осям X и Y осуществляется с помощью двух независимых органов управления грубой подачи. Точная регулировка микроинструментов обеспечивается направляющим рычагом, представляющим собой наиболее важную часть микроманипулятора «Ляйц». Использование этого рычага позволяет перемещать микроинструменты одновремен-

но по двум координатам. Движение руки оператора передается рычагом микроинструмента с передаточным числом, которое можно менять в пределах от $1:1/16$ до $1:1/800$. Наша промышленность выпускает отечественные манипуляторы, которые вполне обеспечивают успешное проведение этих операций.

Для успешного проведения микроинъекции необходим инверсионный микроскоп с фиксированным столиком, имеющим оптику прямого изображения, а также объективы и конденсор с большим рабочим расстоянием. Такой конденсор и объективы обеспечивают рабочее пространство, необходимое для установки инъекционной камеры и микропипеток. Оптика дифференциального интерференционного контраста Номарского или оптика модуляционного контраста Хоффмана предпочтительнее стандартной оптики светлого поля и оптики фазового контраста, так как она намного расширяет возможность визуального наблюдения контуров предъядра — пронуклеуса, что облегчает проведение инъекции. Для оптики Номарского следует использовать стеклянную инъекционную камеру. Микроинъекция в пронуклеус производится при увеличении $320-400\times$ (объективы на $32\times$ — $40\times$ и окуляры на $10\times$). Для введения зиготы в инъекционную камеру, выведения ее оттуда и перемещения внутри нее можно использовать объектив с увеличением, например, $4\times$.

Микроскоп и микроманипуляторы должны быть установлены на общей опорной плите.

Фактором, который следует учитывать при установке аппаратуры, является степень вибрации. Если внешняя вибрация отсутствует, то приборы можно установить на обычном лабораторном столе. Если имеется случайная вибрация здания, то необходимо использовать более тяжелую опорную плиту с применением каких-либо амортизационных материалов, например подкладки из губчатой резины.

Микропипетку для удержания яйца изготавливают диаметром внешним от 70 до 100 мкм и диаметром внутренним у окончания приблизительно 10—15 мкм. Капилляры подогревают, а затем тянут вручную до получения необходимого внешнего диаметра. В оттянутом участке капилляра производят его разрыв. Затем кончик оплавливают до необходимого внутреннего диаметра. Полученную пипетку-держатель можно вставлять в пластмассовые или полиэтиленовые трубки. Вся система наполняется до кончика пипетки-держателя минеральным маслом. В системе не должны присутствовать воздушные пузырьки. Пипетка-держатель, которую фиксируют с помощью микроинструментального кольца на микроманипуляторе, должна располагаться под небольшим углом так, чтобы она достигала дна инъекционной камеры. Пипетке можно придать легкий изгиб под углом примерно $15-20^\circ$ в 2—3 мм от кончика. Для этого

пипетку в месте предстоящего изгиба осторожно нагревают над пламенем микрогорелки. Изгиб обеспечивает горизонтальное расположение кончика на дне инъекционной камеры. До начала работы можно изготовить необходимое число пипеток, которые следует простерилизовать горячим воздухом и хранить в стерильных условиях.

Пипетки для инъекции изготавливают из тонкостенных стеклянных капилляров с помощью механического оттягивателя. Меняя температуру разогрева элемента накаливания и величину тянущей силы, можно получить надежные пипетки для инъекции. Хорошая инъекционная пипетка должна иметь такой кончик, который был бы не только достаточно тонок (около 0,5 мкм) для зиготы, что сократило бы ее повреждение до минимума, но и достаточно прочен для проникновения сквозь прозрачную оболочку и плазматическую мембрану.

Должны быть предусмотрены промывка стеклянных капилляров, стерилизация их горячим воздухом и хранение в стерильных условиях до их использования. Изготавливать пипетки следует в день их использования.

Разработано два способа впрыскивания ДНК с помощью инъекционных пипеток. Эти способы представляют собой систему непрерывного потока. Пипетку, наполненную раствором ДНК, с помощью жесткой трубы соединяют с цилиндром, в котором воздух или какой-либо другой газ находится под давлением. Для регуляции потока в линию вводят газорегулятор, обеспечивающий весьма точное управление напором. Давление, вызывающее необходимый поток раствора ДНК, обычно невелико. Его следует определить эмпирическим способом, производя впрыскивание раствора в пронуклеус при различных величинах напора. Это иногда приводит к разрыву и гибели зигот, поэтому необходимо определить оптимальное давление.

Инъекцию в пронуклеус хорошо проводить при положительном давлении, для создания которого возможны три варианта. При первом варианте используют крупный (объем 50 мл) шприц с притертым поршнем. К шприцу с помощью пластмассовой трубки подсоединяют инъекционную пипетку. До того как пипетку, наполненную раствором ДНК, помещают в инструментальное кольцо, поршень шприца отводят примерно наполовину, затем, нажимая на поршень, создают давление на раствор ДНК, и он вытекает из кончика пипетки. Когда давление на поршень прекращается, происходит быстрый возврат в нейтральное положение, что предотвращает образование отрицательного давления. Скорость истечения определяется в основном размером устья инъекционной пипетки.

Во втором варианте применяют ту же схему, что и в системе непрерывного потока, но вместо регулятора давления, обеспечивающего высокую точность, применяют Т-образную труб-

ку. Одно из колен Т-образной трубки обычно остается открытым. Во время подачи в систему воздуха под давлением частичная блокировка этого колена (большим пальцем) создает отрицательное давление и обеспечивает выход раствора ДНК. Продолжительность блокировки определяет объем раствора ДНК, вводимого в пронуклеус.

В третьем варианте используют принцип контрольного механизма пипетки-держателя. Для получения напора применяют микрометр или шприц Гамильтона винтового типа на 100 мл. В этой системе пластиковую трубку, соединяющую инъекционную пипетку с микрометром или шприцем, заполняют минеральным маслом или силиконовым раствором, а раствор ДНК обычно набирают в кончик пипетки путем всасывания в отличие от нагнетания в него раствора с торцевого конца.

На практике наиболее широко применяются два вида инъекционных камер. Прежде всего можно воспользоваться обычной лункой в предметном стекле микроскопа. Каплю стандартной культуральной жидкости для зигот мышей помещают в центр лунки слегка силиконизированного предметного стекла. Затем поверх капли осторожно наносят минеральное масло. Предметное стекло с лункой можно использовать на инверсионном микроскопе с применением оптических систем Номарского.

Второй вид камеры, к которому нередко прибегают, представляет собой крышку пластмассовой чашки Петри одноразового использования. На перевернутую крышку помещают большую плоскую каплю модифицированной культуральной среды и покрывают ее минеральным маслом. Такая схема, однако, не подходит для использования ее наряду с оптикой дифференциального интерференционного контраста Номарского. Крышка чашки Петри имеет низкие стенки, что позволяет располагать микропипетки под меньшим углом. Для обоих видов инъекционных камер пипетку-держатель и инъекционную пипетку вводят в каплю под углом приблизительно $10-20^\circ$, что позволяет им достигнуть зигот, находящихся на дне камеры. Таким образом, когда пронуклеус визуалью обнаружен и сфокусирован, зиготы можно подсасывать и удерживать с помощью пипетки-держателя без всякого вращения.

Техника наиболее перспективного метода переноса генетической информации в геном животных описана в работе А. У. Тэма.

Подготовка зигот мышей. Зиготы мышей можно получить от самок во время естественного эструса или во время вызванной суперовуляции инъекцией гонадотропина.

Зиготы выводятся из яйцеводов вагинально стандартизированной культуральной жидкостью для предимплантационной

обработки через 12—14 ч после овуляции. На этой стадии полученные зиготы обычно заключены в слизистые сгустки, которые в целях диссоциации их клеток можно обработать гиалуронидазой (300 Ед/мл). Обработку можно проводить с помощью препаративной лупы в течение нескольких минут до тех пор, пока клетки не начнут отделяться. Обработку гиалуронидазой после того, как яйцеклетки будут очищены, следует быстро прекратить. Затяжка процедуры может привести к неблагоприятному эффекту. Собранные зиготы промывают от гиалуронидазы в свежеприготовленном растворе и держат в культуральной жидкости при температуре 37°C и 5% диоксида углерода (CO₂), за исключением процедуры микроинъекции.

Подготовка раствора ДНК. Раствор ДНК, используемый для микроинъекции, должен быть свободен от контаминантов, способных повредить зиготу, что может привести к засорению пипетки. Реагенты фенол, этанол, хлороформ и другие, используемые для очистки ДНК, тщательно удаляют. Суперспиральная плазмидная ДНК должна быть очищена центрифугированием в этидиобромидном хлористоцезиевом градиенте. В отношении линейных фрагментов, образующихся в результате эндонуклеазной активности, необходимо провести интенсивную экстракцию с помощью фенола (хлороформа) или очистку в геле с последующим фенольным (хлороформным) экстрагированием. Следует также провести окончательный анализ в отношении дальнейшей очистки ДНК.

Очищенную ДНК вводят в инъекционную буферную среду. Опробованы различные буферные составы — от дистиллированной воды до изотонического фосфатного буферного раствора. Не было найдено никакого превосходства одного буфера над другим. Однако этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) улучшает интеграцию ДНК. Все растворы должны пройти стерильную фильтрацию, а конечный препарат ДНК отцентрифугирован в течение 15—30 мин в микроцентрифуге, с тем чтобы оставшееся корпускулярное вещество осело.

Микроинъекция в пронуклеус. Инъекционную камеру подготавливают, как указано выше, и помещают на предметный столик микроскопа. Наводя фокус на край капли с помощью малоомощного объектива, в нее опускают пипетку-держатель, причем с таким расчетом, чтобы ее кончик слегка коснулся дна. С помощью микрометра производят небольшое подсасывание, с тем чтобы в пипетку-держатель вошло некоторое количество жидкости и мениск между слоем минерального масла и культуральной жидкостью был виден и находился у кончика пипетки. Тонкой пипеткой в каплю вводят группу мышинных зигот. Под большим увеличением их исследуют на присутствие пронуклеуса. Если все клетки или некоторые из них подходят для проведения инъекции, то кончик инъекционной пипетки напол-

няют раствором ДНК и вводят его при небольшом увеличении микроскопа в каплю. Этот кончик и зиготы должны быть сфокусированы. С помощью инъекционной пипетки зиготы подводят к кончику пипетки-держателя. Перейдя на большое увеличение, определяют мужские и женские пронуклеусы. Мужской пронуклеус крупнее и поэтому инъекцию в него проводить легче. Инъектировать пронуклеус легче, когда он расположен в непосредственной близости к плазматической мембране в той полусфере яйца, которая ближе всего находится к инъекционной пипетке.

С помощью инъекционной пипетки яйцо ориентируют так, чтобы мужской пронуклеус занял удобную позицию для инъектирования. Производя небольшой подсос на пипетке-держателе, яйцо притягивают к отверстию на кончик пипетки. Слишком сильный подсос может деформировать зиготу, поэтому в отверстие должна входить только прозрачная оболочка. Затем следует убедиться, находится ли яйцо в том же положении для инъектирования; для этого вновь проводят фокусировку контуров пронуклеуса и плазматической мембраны. Затем с помощью направляющего рычага инъекционную пипетку подают таким образом, чтобы она прошла сквозь прозрачную оболочку и плазматическую мембрану в пронуклеус. Кончик инъекционной пипетки и пронуклеус должны быть сфокусированы. Ядрышки, находящиеся в пронуклеусе, трогать не следует, так как они очень липкие и могут пристать к кончику инъекционной пипетки. Если инъекционная пипетка успешно вошла внутрь пронуклеуса, то при использовании системы непрерывного потока будет наблюдаться весьма быстрое его расширение. Когда объем пронуклеуса увеличится примерно на 30—50%, инъекционную пипетку с помощью направляющего рычага быстро отводят. При использовании способа положительного давления напор в системе обеспечивают в том случае, если инъекционная пипетка введена в пронуклеус. Должно быть достигнуто постепенное увеличение пронуклеуса.

Если после инъекции предъядро не увеличилось, то возможны два варианта. В первом случае засорилась инъекционная пипетка и поэтому проток раствора ДНК прекращен. Необходимо взять новую пипетку, наполнить ее раствором ДНК и повторить инъекцию вновь. Во втором случае инъекционная пипетка фактически не прошла сквозь плазматическую мембрану и, таким образом, не находится внутри пронуклеуса. Мембрана весьма гибкая и может сильно прогибаться внутри яйца без разрыва. На это указывают два признака: а) при выходе раствора ДНК под давлением вокруг кончика инъекционной пипетки образуется «наплыв» ДНК; б) прогиб плазматической мембраны в месте очевидного вхождения инъекционной пипетки и отклонение угла между ними от 90°. Оба эти признака

свидетельствуют о том, что инъекционная пипетка просто вдавливает мембрану в цитоплазму, а не протыкает ее. Следят за тем, чтобы кончик инъекционной пипетки не ударялся о края отверстия пипетки-держателя. Об инъекции яйца судят по увеличению пронуклеуса.

Все зиготы в камере инъектируют последовательно. Инъектированные зиготы держат отдельно от неоплодотворенных или непригодных для инъекции. Инъектированные зиготы затем снова помещают в культуральную жидкость, а в инъекционную камеру вводят новые зиготы. Когда все имеющиеся зиготы будут инъектированы, их сортируют, отделяют лизирующие зиготы от жизнеспособных. В большинстве экспериментов выживает 60—80% инъектированных зигот, которые можно пересаживать в яйцевод самок с синхронизированной охотой.

Определение трансгенных мышей

Трансгенных животных, интегрировавших инъектированные последовательности инородных генов, определяют путем экспериментов по ДНК-гибридизации. Обычно высокомолекулярную ДНК выделяют из небольшого фрагмента хвоста мыши. Для общей ДНК хвоста можно использовать точечный блоттинг (дот-блоттинг) и провести гибридизацию в соответствии с вводимыми последовательностями генов. Мышей, имеющих эти последовательности генов, можно по их гибридизационным сигналам считать позитивными. В качестве альтернативы геномную ДНК можно подвергнуть действию рестрикционной эндонуклеазы и с помощью блоттинговой гибридизации рассмотреть на присутствие интересующих генных последовательностей. В большинстве случаев рестрикционную эндонуклеазу подбирают так, чтобы получить диагностический гибридизационный ДНК-фрагмент известного размера. Чтобы проверить, стабильно ли ген интегрировался в геномы трансгенных животных, получают их потомство, которое затем подвергают проверке с помощью тех же экспериментов по гибридизации. В определенных случаях в результате микроинъекции, когда интеграция происходит не на уровне зиготы, а на этапе начала дробления, в отдельных бластомерах могут быть получены мозаичные трансгенные животные, у которых интеграция генов может происходить не во всех клетках и тканях, а только в части из них. Этот случай следует иметь в виду при определении трансгенности животных.

Использование интродукции и регулирования клонированных генов для совершенствования сельскохозяйственных животных

Разработка технологии переноса генов, которая дает возможность вводить клонированные гены в геном животных, открывает перспективы создания технологии для генетического

совершенствования и создания новых типов животных. С помощью методики генетических рекомбинаций за одно поколение животных, вероятно, станет возможным достичь большего генетического совершенствования, чем с помощью традиционной селекции за длительный период времени. Но чтобы реализовать эти возможности, необходимо не только внедрить конкретный ген в генетическую структуру животных, но и регулировать его экспрессию в соответствии с физиологическими потребностями животного.

Хотя клонированные гены уже вводят в организм трансгенных животных и показано их функционирование в соответствующих белковых продуктах, механизмы внешнего или регулируемого внутреннего контроля за генетическим проявлением действия этих генов полностью еще не изучены. Создание, конструирование и испытание генетических структур для трансгенных животных — самая значительная задача, стоящая перед теми, кто намерен использовать технику пересадки генов для совершенствования сельскохозяйственных животных. В результате введения в организмы животных трансгенных природных или модифицированных генов, постоянно проявляющих свое действие, могут быть созданы хозяйственно ценные животные с новыми свойствами. Однако потребуется специфический контроль за временем и местом проявления действия этих дополнительно внесенных генов.

Как уже отмечено, несколько белковых продуктов, полученных в результате использования клонированных генов животных, могут резко изменять продуктивность. Очевидно, лучшим примером такой генетической системы является система гормона роста. Накоплен большой материал, показывающий, что повышение уровня гормона роста в крови мясных животных повышает скорость роста и эффективность использования корма, а в крови молочных животных — молочную продуктивность. Эффект дополнительного введения экзогенного ростового гормона на скорость роста известен уже более 50 лет. Установлено, что экстракт из гипофиза вызывает резкое повышение скорости роста экспериментальных животных. Впоследствии было показано, что гормон роста свиней повышает скорость их роста и эффективность использования ими корма. Установлено также, что гормон роста повышает молочную продуктивность коров на 15—25% в начале лактации и до 40% — в конце лактации.

Введение гормона роста взрослым коровам в течение всей лактации не оказывало отрицательного влияния на физиологию животных. Поэтому поступление гормона роста в организм растущей трансгенной свиньи или лактирующей трансгенной коровы также, вероятно, приведет к созданию высокопродуктивных животных.

Эксперименты с трансгенными мышами, несущими гены гормона роста в соединении с сильными конститутивными активаторами, обеспечивающими высокое содержание этого гормона в разных тканях, показали, что при постоянном присутствии гормона роста в течение всей жизни животных отмечалось значительное повышение скорости роста, которое, однако, у отдельных женских особей сопровождалось нарушением способности к воспроизводству. Если это не вызывает серьезных опасений в отношении свиней и других животных, предназначенных на убой, то в отношении животных другого вида нарушение воспроизводительной функции может быть серьезным препятствием в применении метода. Поэтому создание генетических структур, обеспечивающих регулируемое проявление гена гормона роста у трансгенных животных, в том числе выделение гормона у молодняка, выращиваемого на мясо, и сохранение гена в «спящем» состоянии у репродуктивных животных, — вероятно, важнейшая задача в практическом применении переноса гена гормона роста в геном сельскохозяйственных животных.

Современный уровень молекулярной биологии и техники получения рекомбинантных ДНК позволяет предположить, что точный контроль за экспрессией введенных генов у трансгенных животных может стать реальной возможностью уже в ближайшей перспективе.

Принципы генетического регулирования у животных, вытекающие из исследований на трансгенных животных, показывают несколько направлений регулирования экспрессивностью генов у сельскохозяйственных животных для обеспечения повышенной продуктивности.

Ниже приведен обзор достижений в области переноса генов млекопитающих и генетического регулирования у трансгенных животных, а также обсуждение потенциальных возможностей использования этих достижений в животноводческой науке.

Пересадка генов и получение трансгенных млекопитающих

Трансгенных животных получают путем микроинъекции рекомбинантных ДНК в пронуклеусы зигот вскоре после оплодотворения по методике, разработанной в начале текущего десятилетия. По этому методу можно вводить практически любую молекулу ДНК в геном животных, в каждую клетку формирующегося организма. Со времени разработки указанной технологии были созданы линии мышей, несущие клонированные трансгены, контролирующие образование β -глобина у нескольких видов, тимидинкиназы вируса герпес, ростового гормона нескольких видов, трансферина кур, вирусного Т-антигена опухолеродного вируса SV40, иммуноглобинов μ - и κ -эластазы

4. Тканеспецифическое проявление действия генов

Ген, определяющий	Тип клеток	Максимальный % экспрессии
β -Глобин кролика	Эритроидные	50
β -Глобин человека	»	100
β -Глобин мыши/человека	»	2
Эластазу крысы	Поджелудочная железа	1200
Легкую цепь миозина крыс	Скелетные мышцы	500
α -Фетопротенин	Желточный мешок и печень	25
Легкую цепь каппа мыши (Ig)	B-Клетки	50
Тяжелую цепь μ -иммуноглобулинов мыши (Ig)	B-Клетки, T-клетки	85

крыс, продукта клеточного онкогена, легкой цепи миозина крыс и α -фетопротенина мышей. Выполненные исследования не только продемонстрировали универсальность методики пересадки генов, но и показали также, что при включении в состав вводимого в геном генного материала соответствующих регулируемых элементов трансгены обнаруживают исключительно специфическую регуляцию и тканеспецифическое проявление своего действия.

Важный аспект соответствующей регуляции генетической системы — тканеспецифическое проявление действия гена, то есть выделения белкового продукта гена исключительно или в большей степени предпочтительно в клетках одной или нескольких конкретных органов и тканей. Ряд клонированных генов проявляет свое действие у трансгенных животных тканеспецифическим образом. Список этих генов, тканей, в которых проявляется их специфическое действие, и данные о степени специфичности приведены в табл. 4.

Так, было показано, что ген β -глобина кролика проявляет свое действие специализированно в эритроидных клетках трансгенных мышей, несущих этот ген в своем хромосомном наборе. Позднее в нескольких других лабораториях была подтверждена эта тканевая специфичность. Самая высокая степень тканевой специфичности проявилась у гена эластазы крыс, который абсолютно специфичен для клеток поджелудочной железы и транскрибируется в этих клетках в 10 000 раз более интенсивно, чем в любых других клетках трансгенной мыши, где он встречается.

Проведена также (кроме генных систем глобина и эластазы) значительная работа с генами иммуноглобулинов μ и κ , которая показала, что они проявляют свое действие в высокой степени специфично в лимфоидных клетках. Ген иммуноглобулина μ проявляет свое действие одинаково хорошо как в клет-

ках *B*, так и в клетках *T*, а гены легкой цепи каппа — только в клетках *B*. Однако ни тот, ни другой ген не проявляет свое действие в каких-либо измеримых количествах в любых нелимфоидных клетках.

Временное регулирование проявления действия гена, как и тканевая специфичность, определяется сложными молекулярными механизмами, которые необходимо еще изучать, для того чтобы осуществлять временную регуляцию проявления действия трансгенов у экспериментальных и продуктивных животных.

Механизмы генетического регулирования

Хотя некоторые молекулярные механизмы, контролирующие проявление действия генов у прокариот, изучены сравнительно полно, все еще мало известно о конкретных молекулярных механизмах и взаимодействиях, которые регулируют проявление генов у животных, особенно у млекопитающих. Установлено, что механизмы генетической регуляции у низших живых существ очень сильно отличаются от таковых у высших эукариотических организмов. В значительной части регулирование проявления действия гена у прокариот происходит за счет негативного контроля. Способность РНК-полимераз связываться с ДНК и «считывать» генетическую информацию блокируется присутствием специфических репрессоров, что ингибирует проявление действия гена. Активация гена осуществляется путем снятия блокирующего действия репрессора. Такой основополагающий принцип не объясняет полностью механизм контроля, который действует в геноме млекопитающих. Колебания в механизме основного негативного контроля у прокариот, которые дают возможность повышать активность транскрипции в генетических системах после снятия репрессивного действия, могут больше соответствовать тому, что имеется в организме высших животных, поскольку промоторы, или места взаимодействия фермента РНК-полимеразы с ДНК, у высших животных, вероятно, дают возможность осуществления лишь весьма малоэффективной транскрипции структурных генов. Без дополнительного влияния эти гены могут проявлять свое действие на очень низком уровне. Хотя конститутивный уровень образования белка может быть разным для различных генетических систем высших животных, обычно он бывает очень низким, и эффективный уровень производства белка при этом очень низок.

В соответствии с выдвинутой гипотезой механизм генетического контроля у млекопитающих по сравнению с прокариотами — другой. По этой модели активация проявления действия гена — результат «открытия» геном-активатором или сайтом

внедрения РНК-полимеразы II группы нуклеотидов, прилегающих к структурному гену, что открывает более широкий доступ полимеразы к сайту начала транскрипции. Первый из усиливающих элементов был найден среди генов вирусов животных.

Это была небольшая последовательность нуклеотидов, прилегающая к участку инициации репликации онкогенного вируса SV40. Затем они были найдены во многих других вирусных системах, включая ретровирусы. Такие элементы получили название энхансеров.

Недавно Чёрч и др. показали, что тканеспецифичный характер энхансера гена иммуноглобина является результатом взаимодействия специфических для лейкоцитов клеточных белков с этими элементами, в результате чего они сохраняют свою функцию только в лимфоидной ткани, где могут формироваться соответствующие активные комплексы из энхансера и клеточного белка.

Согласно существующим представлениям тканевая специфичность трансгенов, которые ее проявляют при пересадке экспериментальным трансгенным животным, — результат влияния активирующих элементов, которые сохраняют активность, как и энхансер гена иммуноглобина, только в специфической ткани (или тканях), где специфичные клеточные белки соединяются с энхансером и активируют его. Идентификация этих активирующих элементов и их включение в рекомбинантные ДНК позволят добиться тканеспецифичного проявления для любого желательного структурного гена.

В проблеме регуляции действия генов у млекопитающих наиболее изучено регулирование проявления действия генов с помощью стероидных гормонов. Общий механизм действия стероидных гормонов состоит в активации транскрипции на геномном уровне. Стероидный гормон прикрепляется к молекулам белка-рецептора в цитоплазме специфических клеток-мишеней, восприимчивых к стероиду. Образовавшийся в результате этого комплекс стероидного гормона с рецептором мигрирует в ядро, где он прикрепляется к специфическому сайту ДНК в пределах чувствительных к стероиду генов и значительно повышает активность транскрипции этих генов. Исходя из имеющейся информации о молекулярной биологии, действия стероидного гормона — один из наиболее вероятных путей регуляции проявления генов у трансгенных животных.

Была установлена способность глюкокортикоидов вызывать проявление действия гена гормона роста человека в нескольких линиях трансгенных мышей. При инъекции дексаметазона или вводимого перорально триамцинолона уровень гормона роста в сыворотке крови повышается в 4—6 раз у мышей, имевших в геноме конструкцию, содержащую промотор гена металло-

тионеина-1 мыши и гормона роста человека. При введении глюкокортикоида также отмечалось 4-кратное увеличение содержания РНК и гормона роста в печени этих мышей. Эти результаты предполагают возможность регулирования проявления введенных генов у трансгенных животных с помощью стероидов. Этот механизм регулирующего действия стероидных гормонов может быть использован для эффективной регуляции экспрессии генов у трансгенных животных.

Гены, контролирующие такие белки, как гормон роста, рилизинг-фактор ростового гормона, соматомедины, соматотропины и другие, оказывают влияние на процессы роста и эффективность использования корма; гены, контролирующие гонадотропины или влияющие на гонадотропины (например, ген бурула у овец), могут использоваться для оказания влияния на репродуктивные способности животных путем их усиления или подавления (стерилизация). Наиболее оптимальный вариант для трансгенетического совершенствования животных — вероятно, иммунорегуляция, поскольку контролируемое проявление действия трансгенов в направлении изменения иммунных факторов может повысить уровень естественной иммунной защиты у животных.

Существуют и другие методы активизации экспрессии генов. В частности, экспрессия гена металлотионина (MT-1) контролируется на стадии транскрипции ионами тяжелых металлов. Установлено, что система, состоящая из регуляторной области гена MT-1 и структурной части гена тимидинкиназы (ТК), регулируется уровнем ионов кадмия. Так, при культивировании ооцитов в среде, обогащенной ионами кадмия, активность тимидинкиназы вируса герпеса увеличивается в 10 раз. В других опытах в корм трансгенным мышам добавляли $ZnSO_4$, что также активизировало транскрипцию гена MT-1. При этом было отмечено 800-кратное увеличение концентрации гормона роста в крови трансгенных животных в сравнении с контролем.

Это направление в работах по регуляции активности генов представляет особый интерес для зоотехнии, поскольку позволяет связать процессы регуляции с контролируруемыми человеком процессами кормления животных.

Генно-инженерные манипуляции с гормоном роста

Среди работ в области генной инженерии особое место заняли работы по изучению генов гормона роста (человека и животных). Это прежде всего связано с четко установленным действием этого гормона на такие важнейшие признаки сельскохозяйственных животных, как рост и молочная продуктивность.

В настоящее время клонированы гены гормона роста человека, крупного рогатого скота, свиней, крыс, мышей и др.

Проведены широкие исследования по внедрению этих генов в штаммы микроорганизмов, в клетки животных, культуры тканей и в пронуклеусы зигот животных. Накоплен значительный объем надежной информации.

Установлено, что действие рекомбинации ДНК проявляется как в прокариотических, так и эукариотических клетках.

Рассмотрим работы Дж. Дж. Катлина и др. по изучению действия рекомбинации ДНК с геном, контролирующим образование гормона роста КРС, в культивированных клетках млекопитающих.

Гормон роста крупного рогатого скота представляет собой белок молекулярной массой около 22 000 дальтонов, включающий 191 аминокислоту, и синтезируется в передней доле гипофиза. Гормоны роста разных видов определяют рост, а также ряд процессов обмена, включая обмен азота, липидов, неорганических веществ и углеводов. Гормон роста участвует в усвоении глюкозы, в расщеплении жиров, высвобождении глицерина и включении аминокислот в состав белка. Кроме того, гормон роста стимулирует синтез молока у коров.

Использование рекомбинантных ДНК позволило получить клоны ряда генов, контролирующих образование ростового гормона человека, крысы, крупного рогатого скота и свиньи.

Экспрессия рекомбинантных ДНК может быть получена как в бактериальных клетках (*E. coli*), так и в культивируемых клетках млекопитающих (например, клетки мыши).

В связи с перспективностью использования ростового гормона в животноводстве, представляет интерес получение стабильных линий клеток грызунов, в которых проявляется действие гена и которые выделяют биологически активный гормон роста КРС в достаточно больших количествах.

В работах Дж. Дж. Катлина был использован геномный клон гормона роста. При создании на основе клеток мыши или крысы линий, способных образовывать гормон роста, процесс включал следующие этапы:

- конструирование в условиях *in vitro* рекомбинированных молекул ДНК, включающих элементы, регулирующие эукариотическую транскрипцию, в соединении с геном, кодирующим БРГ (бычий ростовой гормон);

- проверка плазмидных конструкций на способность управлять синтезом и выделением БРГ во временных эукариотических клеточных системах;

- создание стабильных линий клеток мыши или крысы, включающих активные плазмидные конструкции, постоянно выделяющих БРГ;

- определение биологической активности БРГ, выделенного из этих клеток.

5. Оптимизация условий трансфекции, обеспечивающих выделение ростового гормона крупного рогатого скота клетками Н₃ крысы

Номер экспе- римен- та	Плазмиды	Доза ДНК, нг	Период трансфек- ции, мин	Содержание ростового гормона КРС через указанное число часов после трансфекции, нг/мл					
				24	48	72	96	120	144
1.	—	—	120	15,1	14,1	10,0	20,6	17,1	18,9
2	р СН-4	50	30	17,9	20,1	25,0	40,0	46,2	68,1
3	То же	100	30	19,1	16,0	36,5	87,1	85,6	118,6
4	»	250	30	26,0	29,0	115,7	205,1	748,2	764,8
5	»	500	30	29,2	41,5	89,5	259,6	308,3	475,1
6	»	50	60	23,4	12,9	30,0	33,2	34,0	56,0
7	»	100	60	17,5	21,1	26,4	62,6	82,5	212,1
8	»	250	60	18,2	22,5	96,5	222,1	481,2	506,1
9	»	500	60	33,1	34,3	92,2	200,4	397,1	545,2
10	»	50	120	18,8	16,3	26,1	29,2	30,1	44,4
11	»	100	120	21,1	17,9	39,2	44,3	52,6	60,5
12	»	250	120	13,0	23,3	44,7	60,2	105,7	120,0
13	»	500	120	30,4	39,9	43,9	65,0	67,0	147,3

На основе данной схемы были созданы стабильные линии клеток мыши и крысы, выделяющие БРГ в больших количествах. Полученный с помощью этих клеток ростовой гормон оказался биологически активным (табл. 5).

Культуральная жидкость, содержащая ростовой гормон крупного рогатого скота и натуральный гормон, полученный из бычьего гипофиза, обладала равно выраженной силой гормонального действия. Концентрированные культуральные среды контрольных клеток мыши в этой биопробе не обнаружили биологической активности. Было показано, что гормон, полученный на основе рекомбинантных ДНК и гипофизарный гормон имеют равную силу в реакции связывания рецептора.

Линия α -клеток мыши выделяла ростовой гормон крупного рогатого скота в больших количествах (50—60% всего белка, выделенного клетками за 4-часовой период импульсного мечення). Это существенно облегчает очистку ростового гормона. Перенос этой технологии на другие системы может способствовать улучшению идентификации, очистки и повышению точности биологического анализа новых пептидов, которые трудно очистить обычным методом.

Возможность испытания рекомбинантных ДНК по их способности управлять экспрессией конкретного гена в культуре клеток открывает удобный путь изучения этих рекомбинантных конструкций до введения инородных генов в организм животного.

Получены штаммы микроорганизмов (*E. coli*), в геном которых встроены гены соматотропина, что создает условия для промышленного производства этого гормона в системе микро-

биологической промышленности. Исследуются возможности внедрения гена соматотропина в геном животных, в частности сельскохозяйственных, методом микроинъекции в пронуклеус зигот. На лабораторных животных получены трансгенные особи, у которых отмечена не только интеграция гена в геноме, но и экспрессия и четкое влияние на процессы роста организма.

Открывается заманчивая перспектива по созданию новых типов животных с повышенным потенциалом мясности и молочности.

Генетическая регуляция процессов роста мышечной ткани

Сводка последних исследований в этом направлении изложена в работе Ф. Е. Варакоса.

При использовании методов генной инженерии для создания новых форм животных особое значение приобретает задача пересадки генов, продукты экспрессии которых регулируют в организме развитие наиболее важных хозяйственных признаков молочной и мясной промышленности. Поэтому широко используется пересадка генов соматотропина, который воздействует на эти признаки.

Стоит задача по пересадке генов, экспрессирующих другие гормоны и биологически активные вещества — регуляторы развития важнейших селекционируемых признаков.

В настоящее время не имеется высокоспецифичных способов воздействия на рост мышечной ткани из-за недостаточной информации о гормональной и метаболической регуляции ее роста. В целом можно составить каталог гормонов, непосредственно стимулирующих рост мышечной ткани. Однако относительно мало известно о детальных клеточных и биохимических механизмах действия гормонов.

Основной механизм роста мышц заключается в синтезе белка. В мышцах, как и во всех других тканях, клеточные белки подвергаются непрерывному синтезу и распаду. В состоянии устойчивости скорость этих процессов равна. При синтезе, превышающем распад, происходит рост. Мышцы атрофируются при скорости распада, превышающей скорость синтеза. Синтез и распад белка — высокорегулируемые процессы во всех типах клеток — и факторы, влияющие на рост мышечной ткани, можно рассматривать исходя из их воздействия на эти процессы. Большой пробел в наших знаниях о белковом обмене состоит в том, что мы не знаем, как в действительности происходит распад белка на молекулярном уровне. Хотя в этот процесс явно вовлечены протеолитические ферменты, описано только небольшое число клеточных протеаз; исходя из знания только этих ферментов, трудно объяснить нормальный процесс распада белка.

6. Факторы, влияющие на обмен белка в мышечной ткани

Фактор	Результат
Гормон роста (соматотропин)	Анаболизм
Соматостатин	Катаболизм
Инсулин	Анаболизм
Глюкагон	Катаболизм
Гормон щитовидной железы	
Нормальные уровни	Анаболизм
Высокие уровни	Катаболизм
Глюкокортикоиды	Катаболизм
Гонадальные стероиды (андрогены, эстрогены)	Анаболизм
Простагландин E_2	»
Простагландин F_2	»
Интерлейкин-1	Катаболизм

Так, по данным В. Е. Баракаса, можно определить следующие факторы, влияющие на обмен белка в скелетной мускулатуре (табл. 6).

Таким образом, к гормонам, воздействующим на рост мышечной ткани, а также на нормальный рост всего организма после рождения, относятся соматотропин, соматостатин, инсулин и глюкагон, гормоны щитовидной железы, глюкокортикоиды, гонадальные андрогены и эстрогены. Из них гонадальные андрогены и эстрогены и их производные составляют основной класс стимуляторов анаболического роста, используемых в настоящее время на крупном рогатом скоте.

На белковый обмен в мышцах влияют простагландины (ПГ) — производные арахидоновой кислоты. Они выделяются из клеточных мембран в ответ на самые различные стимулы. Простагландины участвуют в большом числе нормальных физиологических, а также патологических процессов. Этот эффект блокируется аспирином или индометацином — препаратами, подавляющими синтез простагландина.

Простагландины, по-видимому, играют важную роль и при усиленном распаде белка мышечной ткани, который сопровождает лихорадочное состояние животного и инфекционное заболевание. Легкие инфекционные заболевания и травмы приводят к потере белка в организме, особенно из мышц скелета, и, следовательно, к торможению нормального роста. Этот эффект — основной источник экономических потерь при выращивании молодняка. Такую атрофию мышц было трудно объяснить только воздействием гормонов, влияющих на белковый обмен в мышцах. В настоящее время установлено, что в этом процессе участвуют как интерлейкин-1, так и простагландин. Интерлейкин-1 — это продукт моноядерных фагоцитов, который индуцирует ряд защитных реакций хозяина. Интерлей-

кин-1 вызывает повышение температуры в гипоталамусе. Он индуцирует пролиферацию и активацию нескольких типов клеток, участвующих в защитных реакциях хозяина, в том числе нейтрофилов, Т-лимфоцитов, продуцирующих антитела В-лимфоцитов и естественных клеток-киллеров. Интерлейкин-1 стимулирует синтез печенью так называемых белков острой фазы, которые также участвуют в защитной реакции хозяина. Кроме того, интерлейкин-1 непосредственно стимулирует атрофию мышц, индуцируя синтез ПГЕ₂ в тканях, который затем активирует распад белка. Активация распада белка интерлейкином-1 устраняется ингибиторами синтеза простагландина.

Понимание гормональной регуляции синтеза белка в мышечной ткани значительно углубилось. Во-первых, стала понятной роль простагландина как основного класса клеточного вторичного посредника в воздействии гормонов на мышечную ткань. Во-вторых, объяснена потеря мышечного белка при лихорадочном состоянии и инфекционном заболевании. Дальнейшая информация о белковом метаболизме в мышечной ткани необходима, чтобы вызывать в нем высокоспецифичные изменения для получения от животных более высокой продуктивности.

Значительный объем информации накоплен и по проблеме регуляции молочной продуктивности.

Все это создает прочную биологическую базу для развития работ по генной инженерии, созданию генома животных, обеспечивающего повышение генетического потенциала мясной и молочной продуктивности сельскохозяйственных животных.

Генная инженерия и воспроизводство животных

К важнейшим хозяйственно ценным признакам сельскохозяйственных животных относятся воспроизводительная способность, плодовитость.

Совершенно очевидно, что эти процессы находятся под строгим генетическим контролем, который осуществляет гормональный статус организма, непосредственно влияющий на показатели воспроизводства. Установлено влияние ряда гормонов (ФСГ и ЛГ) на функцию воспроизводства.

Стало принципиально возможным методами генной инженерии организовать биотехнологическое производство этих гормонов для регуляции и стимуляции функций воспроизводства, осуществления работы по трансплантации ранних эмбрионов.

В этой связи представляет интерес изучение гена овец породы бурула, который является геном, прямо влияющим на функцию яичника овцы.

Бурула — одна из небольшого числа мериносовых пород овец с высокой генетической обусловленной способностью к вы-

сокой плодовитости. Порода представляет большую ценность в качестве генетического улучшателя (путем скрещивания) овец других мериносовых пород в отношении увеличения (40—60%) их плодовитости. При традиционной внутрипородной селекции по этому признаку такой эффективности можно достичь примерно в течение 30 лет.

Плодовитость овец относится к полигенным признакам, на которые оказывают влияние многие гены.

Высокая плодовитость овец бурула — вероятно, следствие влияния одного гена (F), который воздействует на число овулируемых яйцеклеток из яичника за каждый цикл течки. Этот факт возродил интерес к изучению роли основных генов (олигогенов) в развитии количественных признаков животных и к развитию методов их распознавания и использования.

Животные — носители бурула-гена — уже были использованы для генетического улучшения эффективности воспроизводства овец. Ген F ввели в геном животных других пород овец путем скрещивания и разработали точные математические модели для прогноза возможной эффективности этих программ. Технология рекомбинантной ДНК во многом может упростить этот процесс и сделать возможным пересадку гена F не только в геном овец, но и других видов сельскохозяйственных животных. Поэтому обзор данных о бурула-гене представляет большой интерес для практической генной инженерии сельскохозяйственных животных.

Изучение межлинейных кроссов показало, что повышение плодовитости — результат скрещивания бурула с другими мериносами, а также с различными другими породами овец. Однако не всегда повышение плодовитости можно отнести к эффекту только одного F -гена.

Из многих работ, посвященных оценке сравнительной продуктивности помесей бурула с овцами других пород, только в одной выявлен эффект F -гена на шерстную продуктивность и живую массу тела. В этой работе было показано, что F -ген не оказывает нежелательных плеiotропных действий на настриг шерсти, толщину и длину волокна, массу новорожденных ягнят, живую массу взрослых (15-месячных) овец. Эти данные подтверждают, что принципиальный эффект F -гена — влияние на плодовитость в результате воздействия на степень овуляции, в частности число потомков овец с генотипом FF , — был в 1,9 раза больше.

Исследования биологии размножения овец бурула подтвердили, что роль F -гена направлена на контроль физиологии яичника овец. Установлено, что овцы бурула имеют одинаковое с контрольными мериносами число развивающихся фолликулов. У овец романовской породы в 2 раза больше развивающихся фолликулов, чем у овец других пород. В пределах популяции

бурула (степень овуляции от 3 до 9) не было корреляции между степенью овуляции в предшествующем цикле и числом антральных фолликулов.

Эти данные подтверждают, что яичник овцы бурула имеет отличие в фолликулярных характеристиках от других плодовых пород. Стало очевидно, что *F*-ген не влияет на увеличение числа развивающихся в яичнике фолликулов. Степень атрезии среди развивающихся фолликулов также влияет на сходство овец с *F*-геном и не несущих его.

Однако овцы породы бурула характеризуются наличием фолликулов, которые имеют значительно меньшие размеры к моменту овуляции, а также тем, что они содержат только 50% числа гранулированных клеток в каждом развивающемся фолликуле; эти морфологические признаки могут быть отнесены непосредственно к эффекту *F*-гена.

Различия в развитии и морфологии фолликулов в такой же степени, по-видимому, обуславливают высокую степень овуляции у бурула. Было отмечено, что у бурула фолликулы диаметром менее 2 мм появлялись между 13-м и 15-м днями цикла и они достигали овуляционного размера (3—4 мм) на 15-й день. Однако пополнение продолжалось в течение 15—17 дней, и дополнительные фолликулы у бурула достигали овуляционного размера ко времени высвобождения лютеинизирующего гормона (ЛГ). Этого явления не отмечали у романовской породы, и оно характерно только для овец породы бурула.

Таким образом, два генотипа мериносов (то есть бурула и контроль) начинали лютеолизис с небольшим числом кандидатов (то есть антральных фолликулов) для овуляции. У контрольных мериносов часть «доминантных» фолликулов быстро развиваются, а остальные прекращают развитие и атрезиируют. У бурулы дополнительные кандидаты не исключаются, и их развитие до конечной стадии роста фолликулов и овуляции индуцируется повышенной частотой выброса ЛГ.

Время предовуляторного высвобождения ЛГ у плодовых овец — важный признак. В исследованиях на плодовых овцах с генотипами, отличающимися от генотипа бурула, было показано, что у них высвобождение ЛГ отмечалось значительно позже после начала течки (и лютеолизиса), чем у овец с низкой плодовитостью. У овец бурула этого не происходит, так как оба генотипа и «С»-мериносы высвобождали ЛГ приблизительно через 4, 5 ч после начала течки. У овец бурула овуляция отмечается в среднем на 7,5 ч раньше после начала течки по сравнению с контролем, несмотря на одинаковое время высвобождения ЛГ. Ген *F*, по-видимому, делает предовуляторные фолликулы более чувствительными к эндогенному ЛГ.

Имеются данные, свидетельствующие о том, что овцы бурула, не достигшие половой зрелости, и взрослые имеют в плазме

более высокие концентрации ФСГ, чем контрольные мериносы. Это различие было также подтверждено в отношении гипофиза с помощью метода радиорецептора и радиоиммунного теста.

Можно заключить, что множественная овуляция у овец — результат интенсивной ФСГ-стимуляции яичника в течение поздней лютеиновой и ранней фолликулярной фаз цикла течки.

Активность яичника овцы бурула, вероятно, не зависит от концентрации гонадотропина в плазме, а связана с повышенной чувствительностью к гонадотропину фолликулов этих животных. Это утверждение основано на том, что овца бурула проявляет более высокий овуляторный ответ на гонадотропин СЖК (ГСЖК), чем мериносы, и что овцы с *F*-геном более чувствительны к ГСЖК, чем овцы без *F*-гена. Различие в чувствительности было явным начиная с 5-месячного возраста овец. Это может быть основным признаком генотипов плодовитых животных, поскольку генетические связи между плодовитостью и чувствительностью к ГСЖК описаны также у мышей и крупного рогатого скота.

Пока не установлено — яичник или индивидуальные фолликулы плодовитых пород более чувствительны к ФСГ — гормону, отличающемуся от экзогенного ГСЖК. Такие данные могут быть получены при исследовании ответа изолированных фолликулов на добавление ФСГ или ответа яичника гипофизэктомированных овец на введенный овечий ФСГ. Такие эксперименты проводятся.

Если фолликулы овцы бурула имеют больше рецепторов к гонадотропину, то они могут затем больше захватывать гонадотропина из циркулирующей крови, чем фолликулы других мериносов. Этим можно объяснить различия в чувствительности яичника между генотипами. Приобретение рецепторов к ЛГ на гранулированной оболочке — существенная необходимость для овуляции развивающихся фолликулов овцы. У овец финский ландрас таких фолликулов в фолликулярную фазу больше, чем у овец породы суффольк. Однако нет данных, что плодовитая овца имеет больше рецепторов к ЛГ на каждом фолликуле.

Можно предположить, что добавочные фолликулы, которые развиваются у овец бурула, образованы так в результате наличия у них рецепторов к ФСГ (или большого числа рецепторов к ФСГ), что делает их способными отвечать на этот гонадотропин.

Было сделано заключение, что фактор яичника, отличный от эстрадиола и прогестерона, должен способствовать регуляции обратной связи ФСГ в течение цикла течки у овец. Фактор яичника, — по-видимому, ингибин, нестероидный гонадный гормон, способный селективно угнетать выделение ФСГ из гипофиза. Несмотря на то что в настоящее время ингибин очи-

щен, данные о его влиянии на плодовитость основаны главным образом на экспериментах с использованием фолликулярной жидкости (ФЖ), свободной от стероидов. Установлено, что в ФЖ имеются другие белковые гормоны, которые могут непосредственно действовать на яичник.

Свободная от стероидов овечья ФЖ способна подавлять течку и овуляцию у бурула и мериносов. Повторяющиеся инъекции овечьей ФЖ в течение 5 дней задерживают овуляцию, по крайней мере, на 12 дней. Частично очищенная овечья ФЖ была эффективна в такой же степени, как и неочищенная овечья ФЖ в подавлении овуляции. Этот эффект, по всей вероятности, результат действия ингибина в овечьей ФЖ, поскольку последняя селективно подавляет ФСГ у овец.

Доказательство включения ингибина в действие *F*-гена получено путем измерений его биоактивности у овец бурула и мериносов.

У овец бурула со средней степенью овуляции 2,8 содержалось $\frac{1}{3}$ ингибина по сравнению с мериносами, у которых было в среднем 1,2 овуляции.

Изучение ингибина в яичнике бурула позволило определить связь между этим гормоном яичника и плодовитостью. Косвенно эта связь доказывается повышением степени овуляции, которое отмечается у мериносов после активной иммунизации против ингибина. Это было впервые описано у мериносов в 1982 г. и затем подтверждено в исследованиях на овцах другой породы.

Наблюдалось достаточно эффективное повышение степени овуляции у иммунизированных животных. У них выявляли потерю регуляторного контроля функции яичника, которая проходила по такому же пути, как и у бурула. Так, ягнята-мериносы, иммунизированные против ФЖ крупного рогатого скота с третьей недели жизни, раньше достигали половой зрелости, и у них повышалось число овуляций (до 8).

Следовательно, недостаток ингибина яичника может иметь ключевое значение в высокой степени овуляции у бурула, опосредованной, вероятно, с помощью повышенной концентрации ФСГ в течение течки. Наличие изменений в фолликулах бурула, включая снижение популяции гранулированных клеток, согласуется с недостатком ингибина, местом синтеза которого являются эти клетки. Ускорение полового созревания и повышение степени овуляции у нормальных мериносов, иммунизированных против богатой ингибином фракции ФЖ крупного рогатого скота, — дополнительные косвенные доказательства этой гипотезы.

Хотя ингибин — белок яичника, селективно регулирующий секрецию ФСГ с помощью влияния по принципу обратной связи на систему гипоталамус — гипофиз, имеются веские основа-

ния предполагать о наличии интраовариального регулирующего вещества, которое может включаться в процессы овогенеза. Было показано, что свободная от стероидов фолликулярная жидкость содержит вещество (фактор, ингибирующий развитие фолликула), которое ингибировало фолликулярный ответ у хронически гипопизэктомированных овец на введение 2250 МЕ ГСЖК. Этот ингибитор роста фолликулов не мог быть ингибином, но, вероятно, оказывал местное воздействие внутри фолликула яичника, прерывая митотическое деление гранулированных клеток.

Указанное предположение позволяет объяснить, как у овец основные, или доминантные фолликулы среди фолликулов — кандидаты для овуляции — могут секретировать вещество, которое локально подавляет развитие других кандидатов. Наиболее важная задача — установить, имеет ли яичник овец бурула такой же дефицит ингибитора развития фолликулов, как и для ингибина.

Возможно, у овец имеется развитая двойная система регулирования. Таким образом, у овец всех пород наступает фолликулярная фаза нового цикла течки с избытком фолликулов, способных овулировать (супероовуляция у некоторых овец, подтвержденная с помощью ГСЖК или ФСГ). После лютеолизиса у нормальной овцы, когда начинается развитие фолликулов, продукция ингибина снижает обеспечение ФСГ в такой степени, что новые фолликулы не могут начать развитие. В это же время, в качестве гарантированного предупреждения развития доминантные фолликулы продуцируют ингибитор роста фолликулов, который исключает возможность начать развитие дополнительных фолликулов с помощью деления гранулированных клеток. При этом также должно обеспечиваться сохранение уровня продуцируемого ФСГ для дополнительных фолликулов.

Периферические концентрации эстрадиола незначительно отличаются у овец бурула и мериносов в течение цикла течки. Концентрации эстрадиола в кровеносных сосудах яичника аналогичны таковым у овец, имеющих *F*-ген, так и не имеющих его. Очевидно, особые фолликулы, которые полностью развиваются и овулируют у овец бурула, не секретируют дополнительный эстроген. Возникло предположение, что различие в чувствительности к отрицательной обратной связи, обусловленной стероидами, может быть ответственным за высокую степень овуляции у плодовитых овец финский ландрас. Установлено, что при угнетении отрицательной обратной связи ЛГ с помощью эстрадиола у овариэктомированных овец бурула и мериносов оба генотипа имели одинаковую чувствительность.

Особенность лютеиновой функции у овец бурула заключается в том, что концентрации прогестерона в плазме на 9—11-й день с начала течки не повышаются с увеличением степени

овуляции, что резко контрастирует с тем явлением, когда степень овуляции повышалась с помощью ГСЖК. Основа этого явления неизвестна, хотя, по-видимому, это результат пониженной массы индивидуального желтого тела у овец бурула.

Бурула-мериносы — наиболее интересная генетическая модель плодовитости у овец. Приведенные данные показывают, что эти животные имеют уникальный генотип. Практическое значение *F*-гена заключается в значительном его действии на плодовитость. Поэтому он может быть использован для быстрого повышения у овец эффективности воспроизводства. Действие копии гена сравнимо с эффектом многолетней внутривидовой селекции на величину приплода или степень овуляции.

Открытый ген *F* бурула в принципе может быть выделен, клонирован и введен в геном других сельскохозяйственных животных, что позволит существенным образом улучшить их воспроизводительную способность. Перспективно также выделение генов, определяющих синтез ряда гормонов, связанных с регуляцией процессов воспроизводства, и введение их в геном животных.

Следовательно, и в этой области генной инженерии открываются большие перспективы для селекции сельскохозяйственных животных.

Картирование генов домашних животных

Большинство важных селекционируемых признаков сельскохозяйственных животных (удой, содержание жира и белка в молоке, мясные качества и т. д.) — количественные, полигенные признаки, то есть их развитие зависит от интегрированного действия многих генов, локализованных в одной или разных хромосомах.

Изучение механизма генетической обусловленности количественных признаков представляет огромный практический интерес для селекционеров. Весьма важно определение локализации генов — их картирование.

Пока неизвестно, как многие гены включаются в реализацию определенной количественной характеристики или как каждый ген обуславливает свое воздействие и где он локализуется в хромосоме.

Современные методы составления генных карт пока испытаны главным образом на мышах и человеке. Они открывают новые пути к более глубокому пониманию генетической детерминации количественных признаков животных.

Значительные успехи достигнуты в составлении карты хромосом человека. Информация, полученная с помощью картирования генов человека, используется в медицине. Картированием генов определены участки хромосом, связанные с проявлением ряда наследственных болезней.

Методы картирования генов

В настоящее время имеется несколько различных подходов для составления карты генов, основанных на изучении передачи генов потомству, на оценке животных по потомству, на использовании переноса генов между соматическими клетками млекопитающих различных видов (гибридизация соматических клеток) и на методах, включающих прямое выявление генов с помощью *in situ* гибридизации ДНК специфического типа с фиксированной хромосомой.

Изучение потомства. Раньше на основании изучения потомства можно было только определить локализацию генов на одной и той же хромосоме (сцепление) и провести оценку принадлежности генетических локусов хромосом. Для определения расположения генетических локусов на одной и той же хромосоме измеряют мейотическую частоту рекомбинации между определенными локусами у потомства, один из родителей которого был гетерозиготным по двум локусам.

Картирование генов с использованием генетики соматической клетки. Картирование гена с помощью методов генетики соматических клеток основано на процессах, которые содействуют переносу генетического материала между клетками (перенос гена) и частичному уменьшению переносимого генетического материала в гибридных клетках. Наиболее общий подход для переноса генов из выбранного образца в клетки-реципиенты с целью картирования гена — гибридизация клеток. Соматические клетки одного вида животных подвергают спонтанному слиянию с клетками другого вида при их совместном культивировании. Частоту гибридизации можно значительно повысить, воздействуя на клетки инактивированным вирусом Сендай или полиэтиленгликолем. Определенные методы позволяют разделить все родительские клетки, которые не подверглись слиянию. Если линии клеток мыши или хомяка объединить с клетками человека или клетками других видов (свиньи или крупного рогатого скота), то отмечается преимущественное уменьшение хромосом в клетках вида, гибридизированного с клетками этих грызунов. Клоны гибридных клеток имеют только те хромосомы исходной родительской клетки.

Поэтому можно сделать заключение о локализации генов на одной и той же хромосоме или об отнесении генных локусов к индивидуальным хромосомам после исследования хромосомных дополнений и определения наличия или отсутствия генной продукции в некоторых гибридных клонах. Если генный зонд доступен, то наличие гена можно непосредственно определить с помощью метода рестрикционных фрагментов.

После того как ген отнесен к определенной хромосоме, следующий шаг заключается в определении локализации гена в

7. Состояние генных карт некоторых видов домашних животных
(по данным Ф. Х. Рудла и Р. Фрайеса)

Животные	Число сцеплений или групп синтении	Число хромосомных локализаций
Корова	25	34
Овца	12	22
Коза	0	0
Свинья	10	17
Курица	10	29

пределах хромосомы. Один из путей для достижения этого включает гибридизацию.

Гибридизация *in situ* — метод прямого картирования, включающий гибридизацию радиоактивно меченных ДНК проб с хромосомами в фиксированной метафазе и последующую регистрацию связи в виде серебристых гранул после автордиографии.

Генные карты основных видов домашних животных (крупный рогатый скот, овцы, свиньи, козы, куры) еще очень фрагментарны в сравнении с генными картами мыши и человека. Большинство генных карт домашних животных состоит только из нескольких сцеплений или групп, которые во многих случаях не локализованы к специфическим хромосомам (табл. 7).

Главное препятствие при картировании гена домашних животных заключается в отсутствии достаточной стандартизации кариотипов. На первом Международном симпозиуме по стандартизации объединенных кариотипов домашних животных единодушное мнение было достигнуто только по вопросу классификации кариотипов. Стандартизированного числового описания дисков хромосом, подобного описанию стандартизированных хромосом человека, еще нет.

По мере развития исследований в области картирования генов можно ожидать многочисленных применений их в практике скрещивания животных. После заполнения генной карты можно затем выйти на группы сцепления, подобные таковым, обнаруженным между локусом чувствительности к галотану, представляющему индикатор стресс-синдрома свиней, и локусами группы крови и энзимов, а также болезнью Марека и локусом главной гистосовместимости у кур. Эти группы сцепления представляют огромный интерес для селекции животных на устойчивость к стресс-синдрому у свиней и болезни Марека.

Картирование генов важно для выявления и выделения генов, которые определяют или оказывают влияние на сложные количественные признаки животных (продуктивность, плодовитость, рост, резистентность к болезням). Можно, например, сравнить частоту повторов последовательностей определенного гена у животных с высоким и низким удоем, поскольку, веро-

ятно, количественные различия в продуктивности связаны с частотой повторов гена. Ген можно также ввести с помощью микроинъекции в эмбрион с последующим изучением эффекта воздействия последовательности оснований гена на формирование животного.

Методы картирования все более совершенствуются. Это позволяет обеспечить ускорение процесса получения детализированных генных карт домашних животных.

Генные карты составляют на основании комплексных данных, полученных различными методами, включая изучение по потомству, гибридизацию соматической клетки, прямое картирование ДНК-сегментов гибридизаций *in situ*, гибридизацию с хромосомами в фиксированной метафазе. Картирование генов уже внесло определенный вклад в изучение генома млекопитающих, особенно генома человека. Применение методов соматических клеток и методов рекомбинантной ДНК позволяют ускорить прогресс в построении детализированных генных карт домашних животных. Такие генные карты будут служить в качестве инструмента селекции при скрещивании животных и использоваться для исследования полигенных признаков.

У селекционеров окажется тонкий инструмент, использование которого позволит перейти на точные количественные методы подбора животных, ускорит процессы селекции.

Наиболее полное изложение современного состояния вопроса и методов картирования дано в работе Ф. Х. Рудла и Р. Фрайеса.

Применение генной инженерии в ветеринарии

Методы генной инженерии получают все большее применение в области защиты животных от инфекционных, особенно от вирусных, заболеваний. Генно-инженерные способы получения вакцин более эффективны в сравнении с традиционными. Так, диарея (понос) новорожденных животных наносит большой экономический ущерб животноводству. Ротавирусы — одна из наиболее частых причин этого заболевания телят и поросят. Установлено, что это заболевание можно предупредить вакцинацией.

Чтобы вызвать иммунитет вакцинацией, необходимо стимулировать образование антител, которые нейтрализуют способность вируса инфицировать клетки хозяина. Антитела образуются при воздействии на клетки животного белков оболочки вируса. Современные методы биотехнологии дают возможность синтезировать и выделять такие вирусные белки (антигены) в большом количестве и использовать их в качестве вакцин. Их производство дешевле и применение безопаснее вакцин, приготовленных из целых вирусных частиц.

Для приготовления эффективной ротавирусной вакцины осуществляется несколько последовательных этапов в работе, которые требуют детального понимания молекулярной биологии вируса. Прежде всего необходимо идентифицировать белок, участвующий в реакции нейтрализации вируса.

Для этого используют моноклональные антитела, полученные против различных полипептидов вируса. Затем проводят анализ генетического материала вируса, чтобы локализовать и идентифицировать ген, который кодирует данный белок. Ротавирусы имеют геном, состоящий из 11 отдельных сегментов двухниточной РНК. Трансляция *in vitro* изолированных сегментов показала, что каждый сегмент представляет один ген и кодирует один полипептид. Чтобы установить, какие из сегментов кодируют иммунологически важные полипептиды вируса, были использованы иммунные сыворотки.

Далее, РНК, кодирующая эти гены, была обратно транскрибирована в ДНК, которая, в свою очередь, была встроена в плазмиду. Плазмиду (или вектор) вводили в специфического хозяина, для которого она инфекционна, методом трансформации. Выбрав вектор, можно поддерживать клонированные гены или в бактериях, например *E. coli*, или эукариотах (дрожжи или клетки животных в культуре ткани). Предпочтительней пользоваться бактериальными клетками, поскольку они быстро растут и ими легко манипулировать генетически. Исследователи скринируют получившиеся бактериальные трансформанты радиоактивно мечеными зондами, полученными из вирусного гена, и те бактерии, которые несут в себе клонированную вирусную ДНК, анализируют, чтобы подтвердить наличие там гена.

В настоящее время эти продукты все более широко используются для конструирования и производства вакцин против ряда вирусных заболеваний.

Методы генной инженерии будут занимать все более доминирующее положение в системе защиты сельскохозяйственных животных от инфекционных заболеваний.

Генная инженерия в селекции симбиотических микроорганизмов сельскохозяйственных животных

Рассмотренные выше методы касались генно-инженерных работ на лабораторных и сельскохозяйственных животных, направленных на изменение их генотипа.

Совершенно очевидно, что в этом направлении еще много нерешенных вопросов и потребуются большие усилия генных инженеров и селекционеров-животноводов по созданию годных для производства типов животных с четко направленными изменениями генотипа и желательными фенотипическими изменениями.

Однако в принципе имеется и другой путь реализации генно-инженерных разработок с прокариотами для нужд животноводства. Он основан на использовании очень широко распространенного в природе явления симбиоза между высшими организмами и симбиотическими микроорганизмами.

Фундаментальные биотехнологические исследования с прокариотами получают в этом случае прямой выход в животноводство. Общеизвестна огромная роль симбиоза высших животных, в том числе и сельскохозяйственных, с микроорганизмами желудочно-кишечного тракта. Непременный симбионт всех животных, классический объект исследований по генной инженерии — *E. coli* и другие микроорганизмы.

Все это создает объективные предпосылки для включения современных методов биотехнологии, в том числе генной инженерии, в селекцию симбиотических микроорганизмов, которые предстоит переделывать в направлении их большего соответствия потребностям макроорганизмов, то есть сельскохозяйственных животных. Таким образом, определяется один из путей, который подводит к оптимизации и стабилизации питания, ликвидации дефицита в ряде незаменимых факторов питания сельскохозяйственных животных. Поисковые исследования свидетельствуют о перспективности этого направления.

Особый интерес представляет создание форм симбионтов-продуцентов незаменимых аминокислот и целлюлозолитических микроорганизмов с повышенной активностью. Работы могут быть быстро продвинуты вперед только в тесном сотрудничестве исследователей сельскохозяйственного и микробиологического профиля, владеющих современными генетическими методами, в том числе методами генной инженерии.

Поисковые работы по селекции популяций микроорганизмов-симбионтов сельскохозяйственных животных уже проводятся на крупном рогатом скоте, свиньях и птице. В частности, на основе *E. coli*, генотип которой трансформирован методом генной инженерии, был разработан пробиотик, скармливание которого молодняку профилактирует расстройства пищеварения и стимулирует рост животных.

В птицеводстве введение в пищеварительный тракт бройлерам культуры генно-инженерного штамма *E. coli* — продуцента L-треонина — обеспечило существенное увеличение прироста живой массы.

Применение *E. coli* — естественного продуцента лизина — дало возможность ускорить темпы роста бройлеров. Изучено также влияние на процессы пищеварения телят предварительно отселекционированной ассоциации целлюлозолитических микроорганизмов. Получена статистически достоверная разница, переваримость клетчатки возросла на 9%. Это очень интересный результат, особенно в связи с необходимостью разработки

систем кормления животных при экономном расходовании зерновых концентрированных кормов и увеличения удельного веса грубых и сочных кормов, богатых клетчаткой.

Разумеется, действующие рычаги селекции макроорганизмов оказывают косвенное, опосредованное влияние и на эволюцию популяций симбионтов. Это неизбежно, учитывая устойчивые взаимосвязи в экосистеме макро- и микроорганизмов. Несомненно, процессы доместикации и последующей селекции сельскохозяйственных животных оказали мощное влияние на генетические и фенотипические свойства популяций и ассоциаций симбиотических микроорганизмов. Однако нельзя рассматривать эти изменения однозначно. Вероятно, с изменением систем кормления и содержания некоторые микробиологические процессы в желудочно-кишечном тракте интенсифицировались, но одновременно некоторые из них были утеряны или существенно ослабли. Можно, например, констатировать ослабление процессов трансформации целлюлозы и других.

В настоящее время возникла проблема развертывания прямой селекции в важнейшем звене экологической системы — в популяциях симбиотической микрофлоры сельскохозяйственных животных с целью интенсифицировать полезные микробиологические процессы в пищеварительном тракте для более полного использования генетического потенциала продуктивности макроорганизмов.

Разработка методов управления этой экосистемой позволит увеличить продуктивность животных на базе повышения эффективности использования кормов. Возможны следующие способы регулирования микробиологических процессов:

- а) изменение желудочно-кишечной микрофлоры путем изменения рациона;
- б) регулирование микрофлоры добавлением ингибиторов;
- в) скормливание препаратов-пробиотиков (препаратов, полученных на основе использования микроорганизмов, выделенных из желудочно-кишечного тракта животных).

В настоящее время уже создано много препаратов такого типа, однако их использование не всегда эффективно. Одна из причин низкой эффективности препаратов-пробиотиков — использование для их производства штаммов, не прошедших направленной генетико-селекционной работы.

Развитие методов генной инженерии революционизировало генетику бактерий и привело к тому, что стало возможным введение в бактериальную клетку новых генов практически из любого организма. Таким образом, созданы условия не только для проведения селекции микроорганизмов традиционными методами отбора, но и для использования генной инженерии, что существенно повысит ее эффективность, позволит достичь более полного баланса в системе макро- и микроорганизмов.

Развитие крупномасштабной селекции в животноводстве в решающей степени расширило использование мировых генетических ресурсов. Ускорение темпов селекции сельскохозяйственных животных, в том числе крупного рогатого скота, в значительной степени зависит от возможности использования этого фактора.

Мировой генофонд крупного рогатого скота огромен — в мире разводят более 1000 различных пород. Различные цели и программы селекции, разный характер взаимодействия искусственного и естественного отбора, неодинаковые природно-климатические условия зон разведения скота привели к значительной дифференцировке свойств пород. В результате этого уровень генетического потенциала пород на современном этапе весьма различен.

Примером может служить голштинская популяция чернопестрого скота, выведенная в США и Канаде, которая характеризуется наиболее высоким генетическим потенциалом молочности и хорошей приспособленностью к условиям промышленной технологии производства молока.

Скот ряда пород приспособлен к специфическим, часто экстремальным, условиям внешней среды. Например, зебувидный скот устойчив к кровепаразитарным заболеваниям, условиям жаркого климата и т. д. Использование огромного мирового генетического богатства — задача большой народнохозяйственной значимости. Эта работа развивалась — вначале был экспорт-импорт животных, затем все большее значение приобретал экспорт-импорт спермы, что позволило сделать этот процесс более оперативным и экономически обоснованным.

В настоящее время открывается возможность обмена генетическими ресурсами путем экспорта-импорта ранних эмбрионов. Однако возникает опасность передачи через ранние эмбрионы возбудителей различных заболеваний. Это же относится и к обмену спермой. Имеется предположение, что опасность передачи инфекции с эмбрионами значительно меньше, чем опасность передачи инфекции со спермой, поскольку эмбрионы в фазе трансплантации защищены плотной капсулой (*zona pellucida*). Для заражения эмбриона возбудитель должен пройти

через эту зону. По данным ряда исследователей, только незначительное число возбудителей болезней обладают этой способностью. Поэтому большинство возбудителей локализуется на внешней стороне зоны, и уже разработаны методы удаления или инактивации их путем промывки и другие способы обработки ранних эмбрионов. Против некоторых вирусов эффективен метод инактивации трипсином.

Наибольшую опасность представляют вирусы и субвирусные агенты. Поэтому взятие и трансплантация эмбрионов должны проводиться в условиях строжайшей асептики. Сыворотки как составные части сред, применяемые при сборе, промывке, замораживании, размораживании, микроманипуляциях, должны быть свободны от микоплазм и вирусов, все инструменты — стерильны.

В процессе замораживания-размораживания ранних эмбрионов часто повреждается *zona pellucida*, поэтому промывание эмбрионов и другие операции по дезинфекции проводят до замораживания.

Многие вопросы передачи инфекции через эмбрионы еще недостаточно изучены. Поэтому в разных странах в этом направлении проводятся поисковые исследования. Эмбрионы подвергают воздействию *in vitro* возбудителем болезни, затем промывают и, наконец, исследуют методами электронной микроскопии. Проводят электронно-микроскопическое изучение эмбрионов, взятых от инфицированных доноров. В ряде исследований эмбрионы заражают *in vitro*, трансплантируют здоровым реципиентам и затем проводят работы по выявлению признаков болезни у реципиентов. И, наконец, эмбрионы от зараженной матки трансплантируют здоровой самке-реципиенту и устанавливают наличие или отсутствие данного заболевания у реципиента.

Более широкое использование биотехнологии в ветеринарии позволит в ближайшей перспективе разработать надежные методы, позволяющие сделать трансплантацию важным средством оздоровления сельскохозяйственных животных.

Теоретические и практические основы гормонального вызывания суперовуляции у крупного рогатого скота и овец

Гормональный метод вызывания множественной овуляции у сельскохозяйственных животных, теоретические основы которого были разработаны еще в 30-х годах группой советских ученых под руководством академика М. М. Завадовского, широко используется в нашей стране. Однако пока индуцирование суперовуляции — одно из ненадежных звеньев метода трансплантации. Многие, еще не вскрытые причины проявления этой реакции на гонадотропины сдерживают широкое внедрение трансплантации в практику животноводства.

Пока не установлены оптимальные дозы гонадотропина (СЖК), используемого в сочетании с лютеолитическими препаратами, исключающие перестимуляцию яичников. Почти ничего неизвестно о факторах, влияющих на скорость восстановления яичников у животных с множественной овуляцией, особенно о возможных отрицательных влияниях избыточного количества яичниковых гормонов на воспроизводительную функцию, продвижение яйцеклеток и их жизнеспособность. Не изучен до конца механизм биологического действия СЖК при вызывании суперовуляции, не разработаны точные критерии оценки качества овуляции и др.

Стимулирование фолликулярного роста и овуляции у доноров с использованием СЖК вызывает эндокринные изменения у большинства обработанных животных. После инъекции гонадотропина яичники увеличиваются в массе и объеме с последующим образованием разного числа и величины желтых тел. Антагонизм эстрогенов и прогестерона в связи с реакцией яичников приводит к накоплению такого количества гормонов в крови животных, уровень которых резко отличается от нормы.

Такой эндокринологический статус оказывает влияние на морфологическое и физиологическое состояние шейки и рогов матки, яйцеводов и может неблагоприятно влиять на продвижение гамет, нормальное их развитие, что способствует снижению оплодотворяемости и дегенеративным изменениям зародышей в течение суперовуляции и после нее.

Незначительный и очень длительный полураспад СЖК в организме при его использовании свидетельствует о том, что гонадотропины уменьшают число рецепторов и происходит замена их нечувствительными клетками «мишени».

Проведены многочисленные исследования по использованию различных гонадотропинов, гипофизарных и плацентарных гормонов для вызывания суперовуляции у коров и телок-доноров. При этом основной целью было определение влияния различных гормонов, их сочетаний, установление оптимальных доз, то есть выявление таких доз гормональных препаратов, которые за несколько дней до предполагаемой охоты вызывали бы стимуляцию роста и созревания 10—20 и более фолликулов.

Было показано, что применение фолликулостимулирующих гормонов связано со стадией эстрального цикла. Попытки применения СЖК в лютеиновой фазе оказались неэффективными. Для достижения удовлетворительной множественной овуляции у коров и телок-доноров и оплодотворяемости яйцеклеток гонадотропины использовали в фолликулярной фазе полового цикла (с 16-го дня).

8. Реакция суперовуляции и оплодотворяемость доноров после применения разных серий гонадотропина СЖК (по В. Е. Даровских, Н. И. Сергееву)

Серии препарата	Обработано животных	В охоте		Реакции яичников в среднем на одного донора		Реагировало доноров суперовуляцией		Доноров с оплодотворенной яйцеклеткой	
		число	%	желтых тел	фолликулов**	число	% к оперированым	число	% к оперированым
1	26	22	85	$6,5 \pm 0,9$	$2,7 \pm 0,7$	16	73	10	100*
2	12	10	83	$6,2 \pm 1,7$	$0,6 \pm 0,9$	6	60*	4	100
3	32	30	94	$9,0 \pm 1,0$	$1,7 \pm 0,4$	27	90*	15	71*
4	20	20	100	$8,1 \pm 0,7$	$3,6 \pm 0,6^{**}$	20	100*	16	94*
5	9	8	89	$9,4 \pm 1,3$	$1,5 \pm 0,8$	8	100	7	100

* $P < 0,05$.

** Между 3-й и 4-й сериями $P < 0,01$; 2-й и 4-й — $P < 0,02$.

Эстральный цикл коровы-донора можно контролировать предварительной энуклеацией желтого тела. Однако эта процедура может приводить к появлению спаек в яичнике, а иногда и к гибели животных вследствие возможного кровотечения.

Комбинированным применением СЖК с энуклеацией желтого тела показано, что уровень суперовуляции и оплодотворяемость яйцеклеток зависят от чистоты удаления желтого тела из яичника.

Отмечено, что при использовании повышенных доз СЖК (2000—3000 МЕ) на 16-й день эстрального цикла число овуляций повышается, и эти различия очень значительны.

Уровень суперовуляции, вызванной СЖК, различен в зависимости от серии гонадотропина. При этом процент оплодотворяемости яйцеклеток значительно варьирует (от 8 до 94%). Пока неясно, какие свойства гонадотропина СЖК связаны с оплодотворяемостью. При применении разных серий гонадотропина СЖК, различающихся по относительному содержанию в них фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) и лютеонизирующего гормона (ЛГ), выяснено, что отдельные серии СЖК обеспечивают стимуляцию суперовуляции у 60—100% коров-доноров со средним числом овуляций от 6,2 до 9,4 на реагирующего донора (табл. 8).

По числу неовулировавших фолликулов, выявленных через 6—7 дней после охоты, обнаружены достоверные различия между 3-й и 4-й; 2-й и 4-й сериями гонадотропинов ($P < 0,01$). У доноров, получивших гонадотропин серии 4, было в среднем 3,6 фолликула, тогда как у животных 2-й и 5-й групп — 0,7—1,5.

Из табл. 8 видно, что частота суперовуляции и оплодотворяемость доноров зависели от серии гонадотропина. Из общего

числа животных, обработанных гонадотропином серий 3, 4 и 5, реагировали суперовуляцией 90—100%, тогда как препараты серии 1 и 2 вызывали реакцию суперовуляции у 60—73% доноров ($P < 0,05$). Почти у всех доноров (94—100%) полученные яйцеклетки были оплодотворенными, за исключением животных, обработанных препаратом серии 3, среди которых только 71% ($P < 0,05$) имели оплодотворенные яйцеклетки.

Серия гонадотропина влияет также и на оплодотворяемость. Из общего числа яйцеклеток, полученных от доноров, обработанных препаратом серии 3, только 44% оказались оплодотворенными. Оплодотворяемость яйцеклеток в других группах составляла 63—97% ($P < 0,01$).

После применения препарата серии 4 показатель среднего числа всех яйцеклеток на одного положительного донора ($4,5 \pm 0,9$) имеет среднее значение по сравнению с другими группами (3,2—6,6). Однако, в связи с тем что у доноров 4-й группы оплодотворяемость яйцеклеток и процент нормальных зигот выше, эффективность суперовуляции (по числу нормальных зигот на одного обработанного донора) достоверно выше (2,7 эмбриона) по сравнению с другими группами животных ($P < 0,05$).

Наблюдаемая зависимость оплодотворяемости яйцеклеток от серии препаратов гонадотропина подтверждает результаты опытов других авторов, которые обнаружили аналогичную закономерность. Причины этих связей пока неясны. В указанных опытах серии препарата 1 и 2 различались в соотношении фолликулостимулирующей и лютеонизирующей активностей (180 и 120 МЕ ФСГ). Однако не было значительных различий в оплодотворяемости яйцеклеток и жизнеспособности эмбрионов. Следовательно, эти показатели не связаны с соотношением ФСГ и ЛГ в исследованных препаратах гонадотропина.

Отмечена широкая индивидуальная изменчивость в реакции яичников у телок и у лактирующих коров, когда применяют даже стандартную дозу гонадотропина. Часть этой изменчивости в реакции яичников коров и телок обусловлена различием типов гонадотропина с разным соотношением ФСГ и ЛГ. Вариации в суперовуляции могут быть обусловлены более длительным влиянием СЖК по сравнению с влиянием эндогенных гипофизарных гормонов.

Среднее число овуляций у лактирующих молочных коров составляет половину величины, полученной у телок при обработке 2000 МЕ СЖК. Пока не совсем ясно, чем обусловлено снижение реакции яичников коров на гонадотропины, — лактацией и/или возрастом телок. Снижение реакции яичников у коров в середине лактации на 27% — факт бесспорный.

Установлено, что у коров с множественной овуляцией эстрогенов в плазме крови в 4 раза больше во время охоты, чем

во время спонтанного цикла. Высокий уровень эстрогенов в плазме крови совпадает с наличием в яичниках большого количества неовулировавших фолликулов.

По-видимому, у суперовулировавших коров высокий уровень эстрогенов усиливает подвижность яйцеводов и матки, вызывая ускоренный перевод яйцеклеток в матку и их изгнание, преждевременное сбрасывание оболочки эмбрионами, что ведет к дегенерации.

Для получения предсказуемой реакции яичников и во избежание риска длительной их стимуляции применяют антисыворотку на СЖК. Обработка антисывороткой в день проявления охоты, то есть через 4 дня после инъекции СЖК, дает более высокую реакцию суперовуляции в сравнении с контрольными животными, уменьшает число неовулировавших фолликулов, повышает оплодотворяемость яйцеклеток (80% по сравнению с 60), укорачивает период эструса (24 ч по сравнению с 28 ч) и не снижает варибельности овуляторной реакции у отдельных животных.

Положительное влияние антисыворотки на большинство показателей суперовуляции и оплодотворяемость яйцеклеток, вероятно, обусловлено ее нейтрализующим действием на СЖК, циркулирующим в крови животных в день охоты, что, по-видимому, прерывает дальнейшую стимуляцию растущих фолликулов в яичниках. Это создает более благоприятный гормональный фон для овуляции и оплодотворяемости яйцеклеток путем снижения относительного уровня эстрогенов.

Оптимизация дозы и времени инъекции антисыворотки СЖК может дать лучшие возможности снижения варибельности и предсказуемости реакции суперовуляции у коров-доноров.

Для вызывания суперовуляции применяют двукратную обработку СЖК в дозе 1400—2000 МЕ на 8—12-й день и повторно на 16-й день полового цикла. Для вызывания овуляции внутривенно вводят 3000 МЕ хориогонина. Одновременно со второй инъекцией СЖК инъецируют подкожно простагландин. При такой схеме обработки суперовуляция наблюдалась у 75—80% коров при среднем уровне от 8 до 15 овуляций на положительного донора.

В настоящее время накопилась значительная информация относительно комбинированного использования СЖК и простагландинов для суперовуляции. Первые обнадеживающие результаты суперовуляции от совместного применения СЖК и простагландина были получены в 1974 г. Коровам-донорам в середине цикла (10—12-й день) внутримышечно инъецируют 1500—2000 МЕ СЖК и через 48 ч — первую дозу (25 мг) простагландина (2 раза в день внутриматочно). При такой схеме гормональной обработки около 50% животных реагируют суперовуляцией.

Обработкой животных СЖК и простагландином в конце периода течки можно вызвать суперовуляцию. При этом решающее значение в качестве и числе овуляций имеет соотношение прогестинов и эстрогенов. Гонадотропин СЖК инъецируют на 15—16-й день эстрального цикла.

Сравнительное испытание трех вариантов гормональных обработок с целью синхронизации охоты и вызывания суперовуляции у коров: 1) двукратная инъекция простагландина по 12,5 мг между 5-м и 16-м днями эстрального цикла; 2) однократная инъекция аналога простагландина по 500 мкг в те же сроки; 3) внутривлагалищное введение тампонов, содержащих по 500 мг прогестерона, с 15-го по 21-й день цикла и за сутки до введения простагландина инъецируют СЖК в дозе 1500 МЕ — показало, что приемлемые результаты синхронизации охоты у коров-доноров можно получить при использовании прогестагенов. Все обрабатываемые животные приходят в охоту в первые 3—4 дня. Уровень множественной овуляции значительно выше при использовании прогестагенов по сравнению с простагландинами.

Введение СЖК на 8—12-й день полового цикла и введение простагландина спустя 48 ч не снижают числа овуляций у реагирующих животных при возникновении ранней суперовуляции под влиянием простагландина.

В настоящее время в большинстве случаев применяют однократное введение СЖК в дозе 2500—3000 МЕ в середине лютеальной фазы и через 48—72 ч инъецируют простагландины. При этом методе обработки среднее число овуляций составляет 8—12 с колебаниями от 0 до 20.

При введении 3000 МЕ гонадотропина СЖК телкам в период от 8 до 12 дня полового цикла и 48 ч спустя — простагландина уровень суперовуляции колеблется от 0 до 70 овуляций.

Причины такой вариабельности в уровне суперовуляции даже при одной и той же дозе гонадотропина пока не изучены. Возможно, оказывает влияние протеаза крови животных, которая быстро ингибирует СЖК, либо отсутствие клеток «мишени», на которые действует гонадотропин, либо это связано с взаимодействием различных типов клеток на уровне стимулированного фолликула.

Сравнительное испытание действия СЖК и ФСГ+ЛГ в сочетании с простагландинами показало, что сочетание ФСГ+ЛГ обеспечивает в 2 раза больше овуляций у коров-доноров и выход нормальных эмбрионов (7—10 по сравнению с 1,3—2,2). Оптимальная доза ФСГ в сочетании с 20% ЛГ при многократной обработке коров — 42 мг. Многократное применение эндогенных гормонов не оказывает отрицательного влияния на уровень суперовуляции, оплодотворяемость и качество зародышей.

Суперовуляция, вызванная СЖК, не имеет точных пределов. У некоторых коров часто наблюдается нежелательное изменение в яичниках (фолликулярные и желточные кисты), некоторые животные вообще не реагируют на гонадотропин или у них развивающиеся фолликулы в яичниках не овулируют. Различия в реакции яичников коров-доноров свидетельствуют об индивидуальной чувствительности на гормональные обработки. Предварительный и целенаправленный выбор животных по этому признаку пока невозможен.

Целесообразно в качестве доноров использовать животных с нормальными половыми циклами без каких-либо отклонений. Для вызова суперовуляции у ценных племенных животных лучше использовать ФСГ, который коровы легче переносят, чем СЖК. После многократных обработок коров ФСГ у них не нарушается в последующем воспроизводительная способность. Хорошие результаты по вызову суперовуляции возможны при обработке животных гонадотропинами, когда в яичниках имеется активное желтое тело диаметром около 1 см или кроме него еще и неактивное небольшое желтое тело. Если диаметр желтого тела менее 1 см или имеются признаки его регрессии, то уровень суперовуляции снижается. При наличии в одном из яичников, кроме желтого тела, развитого фолликула диаметром около 1 см уровень суперовуляции также снижается и нарушается нормальная овуляция. Неудовлетворительные результаты по вызову суперовуляции бывают и в том случае, если кроме развитого желтого тела имеется четко выраженный персистентный фолликул, фолликулярная или желточная киста.

Это свидетельствует о том, что для повышения эффективности гормонального вызывания суперовуляции большое значение имеет состояние яичников на день обработки. Однако и в этом случае нельзя полностью исключить отрицательных результатов.

Коровы молочных пород имеют более низкую овуляторную реакцию на обработки гонадотропином, чем коровы мясных — шароле и др.

Подбор высокопродуктивных коров для использования в качестве доноров эмбрионов имеет существенное значение в повышении эффективности трансплантации. Так, из предварительно не проверенных коров-доноров реагируют суперовуляцией около 72%, и приживляемость их эмбрионов после пересадки составляет около 38%. У предварительно отобранных доноров аналогичная реакция наблюдается у 80% коров, и приживляемость их эмбрионов более высокая (до 75%).

При определении воспроизводительной способности высокопродуктивных коров после суперовуляции и нехирургического извлечения эмбрионов выявлено, что большинство животных имеет нормальную плодовитость и что суперовуляция оказыва-

ет большее влияние на этот показатель, чем процедура извлечения эмбрионов.

Введение СЖК в разные дни полового цикла (9—14-й день) коровам-донорам в дозе 500 МЕ на 100 кг живой массы в сочетании с простагландином обеспечивает наибольшее число овуляций ($12,5 \pm 5,5$) при обработке коров на 11-й день и наименьшее ($4,5 \pm 3,2$) — на 14-й день. Однако нет достоверных различий при обработке коров-доноров гонадотропином на 9—13-й день цикла.

У бесплодных коров с установленной и не установленной причинами бесплодия реакция яичников на гонадотропин низкая (около 6 овуляций на донора) и неудовлетворительная оплодотворяемость яйцеклеток (1—1,2 на донора).

Существенное влияние на уровень суперовуляции оказывает кормление. Даже голодная диета после введения СЖК значительно снижает уровень суперовуляции у коров.

В экономическом отношении наиболее выгодно использовать коров в качестве доноров эмбрионов несколько раз в год. Однако пока неясны устойчивость полового аппарата к многократным процедурам извлечения эмбрионов и чувствительность яичников на повторные инъекции экзогенных гонадотропинов. Отмечено снижение числа овуляций и качества эмбрионов при повторных обработках нативным препаратом СЖК.

После повторных обработок стандартным препаратом гонадотропином СЖК высокой очистки уровень суперовуляции почти не изменяется, но значительно уменьшается число извлеченных зародышей по сравнению с первой обработкой. В дальнейшем процент извлеченных зародышей не меняется, но качество их снижается.

Несмотря на общую тенденцию снижения числа овуляций с увеличением числа гормональных обработок, отмечены значительные индивидуальные колебания в числе овуляций при всех обработках. Вероятно, повторные инъекции гонадотропина не у всех животных вызывают образование желтых тел на СЖК, которые инактивируют его действие.

У коров с множественной овуляцией, в яичниках которых были только желтые тела, наблюдается значительно больше дегенерированных зародышей, чем у коров, у которых кроме желтых тел имелись неовулировавшие фолликулы (44,6 по сравнению с 26,8%). Высокий уровень прогестерона в молоке на 4-й день после осеменения соответствовал и повышенному проценту дегенерированных зародышей.

Таким образом, техника вызывания множественной овуляции при применяемой технологии в значительной мере еще не совершенна, так как число реагирующих животных и оплодотворенных яйцеклеток на донора вариabельно. Наряду со значительными колебаниями в числе овуляций на одну и ту же

дозу СЖК, прослеживается четкая зависимость уровня овуляции от дозы гонадотропинов. Одна из причин неудовлетворительной суперовуляции при применении СЖК — несоответствие в соотношении в ней ФСГ- и ЛГ-активности для нормального роста и развития фолликулов у коров и телок-доноров.

Известно, что соотношение ФСГ- и ЛГ-активности в различных сериях СЖК может варьировать в заметных пределах, и это обстоятельство является значительным препятствием в точной стандартизации фолликулостимулирующей активности этого гонадотропина. Поэтому все шире применяют для вызывания множественной овуляции у коров и телок очищенные гипофизарные препараты ФСГ. Так, очищенный гипофизарный экстракт ФСГ свиней вызывает более точную регуляцию суперовуляции у коров по сравнению с СЖК.

Однако и в этом случае не исключается индивидуальная вариабельность в уровне суперовуляции. Индивидуальные различия реакции яичников коров на ФСГ, вероятно, могут быть обусловлены колебаниями в уровнях эндогенных гонадотропных и половых гормонов.

По-видимому, множественная овуляция у животных сопровождается проявлением комплекса физиологических явлений, отличающихся от таковых при спонтанной овуляции в период естественного полового цикла, что снижает оплодотворяемость яйцеклеток и выход полноценных эмбрионов, пригодных для пересадки.

Отмечены значительные отклонения в содержании половых гормонов в крови коров после суперовуляции, что может быть одной из причин нарушения продвижения яйцеклеток в половых путях и дегенерации зародышей вследствие изменения условий среды в яйцеводах и матке.

В связи с этим схемы гормонального вызывания суперовуляции должны, вероятно, основываться на данных изменениях уровня гонадотропных и половых гормонов у предварительно отобранных коров для использования их в качестве доноров эмбрионов.

Для получения эмбрионов около $1/3$ от подготавливаемых для суперовуляции коров-доноров оказываются для этого непригодными. Объясняется это наличием животных с малым или слишком большим ростом фолликулов в сочетании с отсутствием или низким процентом овуляции. Для объяснения возможных причин изменчивости числа овуляций считается целесообразным различать потенциальную и индуцированную изменчивость.

Потенциальная изменчивость числа овуляций — наследственно обусловленная и сугубо индивидуальная реакция на гонадотропин. Однако наследственность реакции нельзя переоценивать. Как и во всех намеченных наследственных комплек-

сных факторах, преобладают факторы окружающей среды над наследственно обусловленными в общей системе вариантов.

Таким образом, если бы можно было предсказать индивидуальную реактивную способность животного-донора на гонадотропины и произвести соответствующий подбор доноров, то представилась бы возможность уменьшить потенциально обусловленную изменчивость результатов суперовуляции, но в целом уменьшить изменчивость не удалось бы.

Фолликулы в зависимости от степени зрелости имеют различную чувствительность на гонадотропины, что находится в соответствии с числом имеющихся в эпителии фолликулов-рецепторов. Известна также различная чувствительность преантральных и антральных фолликулов на гонадотропины.

При стимуляции СЖК в первую очередь овулирует самый большой по размеру фолликул. Между первой и последней овуляциями промежуток времени составлял 56 ч (J. Hahn, 1985).

Исходя из почти равной степени развития эмбрионов, полученных после гормонального вызывания суперовуляции, становится ясным, что овуляции могут происходить в краткий промежуток времени, то есть стимуляция в этих случаях обеспечивает развитие фолликулов с одинаковой степенью зрелости.

Перед началом гормональной обработки животных-доноров ничего не известно о степени зрелости имеющихся в яичниках популяции фолликулов. Поэтому всякое стимулирование может привести к совершенно различным результатам, что и выражается в индуцированной изменчивости. Пока не выяснено, какие фолликулы овулируют и какие атрезиируют, какое значение имеет атрезия, реагируют ли атрезированные фолликулы на гонадотропины и какие факторы обуславливают эти процессы.

Таким образом, проблема нейрогуморальной физиологической регуляции функции яичника по-прежнему остается областью интенсивных исследований. Значение ее для воспроизводства животных огромно, поскольку яичник — основа всего процесса воспроизводства и через него можно биотехнически влиять на процесс размножения.

На воспроизводство животных используется очень малая часть яйцеклеток (табл. 9).

Суперовуляцию можно вызвать у молодых, взрослых и даже беременных животных на всех стадиях эстрального цикла. Но оплодотворение яйцеклеток наступает в том случае (крупный рогатый скот, овцы), если во время гормональной обработки в яичниках имеется активное желтое тело. Поэтому гонадотропины надо инъектировать в фолликулярную стадию эстрального цикла. На гонадотропин способны давать ответную реакцию только те фолликулы, которые во время инъекции имеют четко обозначенную полость.

9. Потенциальная возможность яичников и фактическое использование зародышевых клеток в размножении домашних животных (по Meger и др., 1970)

Животные	Число имеющихся зародышевых клеток в яичниках, тыс.	Число овуляций за 1 эстральный цикл	Оплодотворенных яйцеклеток в 1 цикле	Число потомков в год
Коровы	100—200	1—2	1—2	1
Овцы	100—200	1—6	1—5	1—4
Свиньи	120—250	10—30	10—12	20
Лошади	100—150	1—2	1—2	1

У овец для вызывания суперовуляции чаще применяют СЖК. Наряду с этим можно использовать экстракт из гипофиза овец и лошадей. СЖК применяют однократно вследствие длительного сохранения препарата в крови животных (до 30 дней), гипофизарные препараты из гипофиза овец и лошадей инъецируют несколько раз. Обработку овец начинают с 11-го дня эстрального естественного или синхронизированного цикла. Введение СЖК на 12-й день цикла увеличивает число овуляций, но число нормальных эмбрионов, пригодных к пересадке, заметно снижается. Суперовуляция у овец может быть вызвана и в анэстральный период после предварительной обработки прогестероном.

Реакция яичников на гонадотропин у овец имеет большую изменчивость, и она зависит от породы и происхождения, массы тела, стадии эстрального цикла, времени введения и частоты применения препарата, дозы и места аппликации гонадотропина, сезона года и возраста животного.

Главная проблема в гормональном вызывании суперовуляции — низкий процент овуляций, нарушения механизма передвижения яйцеклеток в яйцеводах и эмбрионов в матке, низкий процент оплодотворяемости яйцеклеток у суперовулировавших овец.

Поэтому большинство исследователей и практиков обычно стремятся получать у коров и овец не более 10 овуляций на оба яичника. Максимальное число овуляций, которое до сих пор было получено при обработке СЖК: у овец — 38 (R. Z. W. Averill, 1958; Сергеев и др., 1984), у коров — 88 (J. L. Avery, 1962).

Уровень суперовуляции у крупного рогатого скота уменьшается при обработке СЖК, следующей одна за другой, что объясняется возникновением иммунных реакций на чужеродный протеин и образованием в организме животного специфических антигормонов. При этом яичники активно реагируют на эндогенный и экзогенный ФСГ с проявлением высокого процента овуляций, оплодотворяемости яйцеклеток и выхода нормальных

эмбрионов. Следовательно, в практической работе целесообразно поочередное применение СЖК и ФСГ.

Очищенный препарат ФСГ или обработка низкими дозами экстракта гипофиза перед введением СЖК могут, вероятно, снизить влияние антител.

Повторные обработки гонадотропином СЖК не снижают уровня суперовуляции и оплодотворяемости яйцеклеток у овец. Однако наблюдается существенное сокращение длительности эстрального цикла в среднем на 4 ч, уменьшается число овец с «тихой охотой».

Внутрияичниковые процессы регулирования полового цикла

Процессы регуляции размножения охватывают гипоталамическую структуру центральной нервной системы с включением экзогенных и эндогенных раздражителей, нейронных путей, пептидов и, вероятно, простагландинов, оказывающих влияние на уровень секреции гипоталамуса — основного места образования гонадотропного релизинг-гормона.

Аденогипофиз вырабатывает гонадотропин фолликулостимулирующего гормона (ФСГ), лютеонизирующий гормон (ЛГ) и пролактин.

На яичники воздействуют гонадотропины аденогипофиза, вызывая в зависимости от их физиологического состояния секрецию эстрогенов, андрогенов, гестагенов и других гормонов.

В свою очередь, матка оказывает содействие образованию гормонов в яичниках и вырабатывает простагландины, непосредственно влияющие на физиологическую цикличность яичников.

На основе развития молекулярно-биологических методов исследований удалось доказать наличие лютеолитических свойств простагландинов и впервые представилась возможность более полно проследить процессы, протекающие в яичнике во время полового цикла. Полученные сведения пока еще не полные, но они дают возможность лучше познать общую регуляцию полового цикла и открывают некоторые перспективы активного вмешательства в нее.

Выявлены существенные видовые различия во внутрияичниковой регуляции, которые не могут быть механически перенесены с одного биологического вида на другой.

Гонадотропины (ФСГ и ЛГ) оказывают непосредственное влияние на яичники, индуцируют рост и дифференцировку фолликулов, обеспечивают созревание яйцеклеток, их овуляцию, образование желтых тел и секреторную функцию яичников. Вероятно, для обеспечения нормального течения этих процессов необходимы оба гормона.

Исключение могут составлять процессы развития желтого тела, его морфолого-функциональное состояние в зависимости от периода полового цикла.

Значение пролактина, секреция которого не связана с гонадотропным релизинг-гормоном, но контролируется центральной нервной системой, пока не изучено.

В ответ на введение ЛГ продуцируются внутренние андрогены, и прежде всего тестостерон. Выработка их, вероятно, происходит в клетках гранулезы, а выделяются они через внеклеточное пространство и базальную мембрану. В клетках гранулезы локализуется 19 систем ферментов, которые обеспечивают превращение андрогенов в эстрогены.

Активность ферментов (гидроксилаза, ароматаза) контролируется гонадотропином ФСГ, секреция которого тормозится эстрогенами. Клетки гранулезы синтезируют также протеин, вырабатывают белковый гормон ингибин, который постоянно присутствует в организме животных. У самок он называется фолликулостатином и препятствует избыточному поступлению ФСГ. Его секреция, по-видимому, стимулируется ФСГ по замкнутому кругу. Физиологическое значение этого гормона пока не выявлено.

Факторы, побуждающие к росту и дифференцировке первичные ооциты, окруженные клетками гранулезы, базальной мембраной, еще неизвестны. Вероятно, гонадотропины не участвуют в дальнейшем развитии фолликулов. Однако клетки гранулезы содержат мембранные рецепторы для ФСГ. Плазматическая мембрана гранулезных клеток, пронизанная ФСГ в виде пролифераций, обеспечивает дальнейший рост рецепторов ФСГ. Наряду с этим повышается активность ферментных систем (ароматаз) и клетки теки под воздействием ЛГ секретируют андрогены, которые с ростом фолликулов превращаются в эстрогены. Таким образом, с ростом фолликулов сдвигается уровень андрогенов в пользу эстрогенов, что подтверждается увеличением числа рецепторов ФСГ в клетках гранулезы.

При ранней стадии созревания фолликулов действие ЛГ, вероятно, направлено только на клетки теки, которые стимулируют дифференцировку и секрецию андрогенов. Однако клетки гранулезы, находясь под общим влиянием ФСГ, на конечной стадии созревания фолликулов индуцируют образование рецепторов ЛГ, которые обеспечивают предовуляторное накопление ЛГ в клетках гранулезы. В этот период происходит ряд структурных изменений в яйцеклетке под влиянием стероидных гормонов фолликула.

Ко времени предовуляторного повышения уровня ЛГ клетки гранулезы сравнительно короткий срок находятся под контролем ФСГ и эстрогенов и выделяют в клетки теки повышенное количество андрогенов, что является главной причиной ат-

резии большего числа фолликулов, которые не развиваются до овуляторной стадии. Под воздействием ЛГ андрогены тормозят пролиферативное влияние эстрогенов на гранулезу, увеличивается секреция тестостерона и резко сокращается выработка эстрогенов атрезирующим фолликулом. Главный фактор, обеспечивающий созревание фолликулов и вызывающий их атрезию, — способность фолликула реагировать на повышение содержания гонадотропина возрастанием образования эстрогенов. Потеря развивающимся фолликулом чувствительности на гонадотропин прерывает его дальнейшее развитие.

Рост ооцитов начинается с образования вторичных фолликулов и протекает параллельно с ростом первичного фолликула. В последующем размер ооцита остается постоянным, несмотря на дальнейшее увеличение объема фолликула. В период предовуляторного повышения уровня ЛГ образуется зародышевый пузырек независимо от роста и изменений в созревании фолликула. Завершается редукционное деление с отделением полярного тельца. Фолликулы к этому времени достигают определенного размера. Ооциты в маленьких фолликулах не развиваются, что, по-видимому, связано с наличием в фолликулярной жидкости мейозотормозящего фактора, который в своем составе содержит относительно малое количество белка. Предполагают, что под влиянием ЛГ понижается активность белка и по мере созревания фолликула и предовуляторного повышения уровня ЛГ активность мейозотормозящего фактора полностью исчезает и наступает мейоз. Этот механизм положен в основу стимулирования роста ооцитов в атрезированных фолликулах и мейотического созревания.

Ооциты после пика ЛГ остаются в фолликуле до полного физиологического вызревания в пределах от 6 до 8 ч.

Яйцеклетки, высвободившиеся ранее этого срока из фолликула, могут развиваться в культуральной среде до бластоцисты, но у них не образуется цитоплазматический фактор, который обеспечивает соединение ядра спермия при оплодотворении. Это главное препятствие при оплодотворении культивированных ооцитов вне организма. Соединение ядра спермия обеспечивается посредством частичного растворения клеточной мембраны, находящейся между клетками гранулезы и яйцеклеткой, что, вероятно, имеет определенное значение в обмене веществ ооцитов. Пик ЛГ совпадает с исчезновением склеивания спермиев, и это является возможной предпосылкой отсутствия полиспермии при оплодотворении. Преждевременно высвободившиеся ооциты не обладают свойством блокировать спермии, и многие из них могут проникать в яйцеклетку. После так называемой фазы индукции, в которой протекают указанные процессы, проходит многочасовой промежуток времени, прежде чем ооцит достигнет способности дальнейшего развития. Ко-

такт со спермой непосредственно после фазы индукции не в каждом случае ведет к развитию дифференцированной бластоцисты. Для созревания ооцитов существенное значение имеют яичниковые стероидные гормоны, особенно для цитоплазматического созревания яйцеклеток. Так, удалось оплодотворить вне организма яйцеклетки овцы с последующим их развитием при добавлении в культуральную среду, кроме гонадотропина, также эстрадиола. Механизм этого влияния еще не выяснен.

Предовуляторный пик ЛГ вызывает глубокие изменения в секреции яичниковых стероидов. Уже перед овуляцией начинается лютеинизация клеток гранулезы, и они почти полностью теряют способность выделять андрогены, синтез эстрогенов блокируется и возрастает секреция прогестерона и его производных. Наряду с этим в осуществлении процесса овуляции может играть роль так называемый феномен десенсибилизации, который заключается в том, что гонадотропин после длительного воздействия, несмотря на наличие соединений, прекращает действовать на рецепторы мембраны.

Перед началом лютеинизации и выработкой прогестерона ЛГ не обнаруживают в периферической крови. Вероятно, он инактивируется фактором, которого в секрете мало, его не обнаруживают и в фолликулярной жидкости. ЛГ предотвращает лютеинизацию и секрецию прогестерона, изолируя клетки гранулезы. Оба процесса наступали спонтанно, если клетки гранулезы из созревших фолликулов культивировались вне организма.

При интраовариальной регуляции процесса овуляции важную роль играют простагландины групп Е и F, которые синтезируются в фолликулярной жидкости и стимулируются уровнем ЛГ. Концентрация ЛГ в фолликулярной жидкости по мере созревания фолликула повышается. Влияние простагландинов на процесс овуляции состоит, возможно, в том, что они вызывают сокращение клеток теки, которые относительно их морфологических и функциональных свойств связаны с гладкими мышечными волокнами. Образующийся предовуляторный прогестерон также участвует в процессе овуляции. При этом образуется и повышается активность протеолитических ферментов, которые размягчаются и растворяют стенку фолликула.

В синтезе гормонов желтым телом имеются видовые различия. Так, наряду с синтезом прогестерона, клетки гранулезы желтого тела у крупного рогатого скота образуют различные соединения: 20β -гидроксистероидов, у овец — 20α -дигидропрогестерона, у свиней — 20α -гидроксипрогестерона. Кроме того, желтые тела у свиней синтезируют эстрогены. У жвачных образование эстрогенов в фазу желтого тела происходит исключительно большими неатрезированными фолликулами, и концентрация их значительно ниже, чем у свиней. Это обуслови-

вадет слабое торможение секреции ФСГ и создает условия созревания фолликулов у крупного рогатого скота и овец в период функционирования желтого тела. Поэтому фаза созревания фолликулов у этих видов после инволюции желтого тела относительно короче.

Важнейший гипоталамический гормон для образования и сохранения желтого тела у сельскохозяйственных животных — ЛГ.

После предовуляторного пика его оказывается достаточно при относительно низкой базальной секреции, чтобы поддерживать в норме физиологическое и функциональное состояние желтого тела.

Морфологическая регрессия и спад секреторной активности желтого тела к концу полового цикла индуцируются повышенным выделением маточного простагландина $F_{2\alpha}$, действие которого усиливается синергическим влиянием яичниковых гестагенов и эстрогенов. Внутряичниковый механизм перехода от лютеотропного к лютеолитическому функциональному состоянию желтого тела пока не выяснен. Предполагают, что прежде всего нарушается кровоснабжение желтого тела вследствие сосудосуживающего действия маточного простагландина и антагонизма в действии простагландина и ЛГ в рецепторах ЛГ мембраны клеток гранулезы. Известно, что молодое желтое тело более устойчиво к влиянию простагландина $F_{2\alpha}$. Рецепторы в этот период значительно насыщены ЛГ предовуляторной концентрации его, и только потенциальное снижение уровня ЛГ, вероятно, создает условия для секреции маточного простагландина $F_{2\alpha}$.

Установлено, что желтое тело свиней реагирует на инъекции простагландина в период с 11-го по 12-й день цикла. Предовуляторный пик ЛГ обеспечивает овуляцию, морфологическое и функциональное развитие желтого тела с 14-го дня. При этом образуется прочное соединение ЛГ с рецептором и простагландин $F_{2\alpha}$ может вызывать регрессию желтого тела относительно позже, чем у жвачных.

Во время всего полового цикла наблюдаются очень тесные многообразные взаимосвязи между гонадотропинами, гормонами яичников и простагландином $F_{2\alpha}$ внутри яичника, которые составляют существенные элементы регуляции нейрогуморального цикла.

Исходя из этого, яичниковые экзогенные гормоны в рамках биотехнических мероприятий будут вызывать различные изменения в развитии фолликулов или желтых тел. Однако влияние их не должно оказывать отрицательного действия на сложный процесс внутряичниковой регуляции.

Отбор коров-доноров и коров-реципиентов. Донор — это корова высокой племенной ценности, от которой после гормонального вызывания суперовуляции и осеменения спермой выдающегося быка-улучшателя получают эмбрионы.

Реципиент — телка или корова по племенной ценности ниже донора. Реципиенту трансплантируют (пересаживают) в матку один или два эмбриона на определенной стадии развития.

Отбор доноров — целенаправленный выбор племенных коров, хорошо реагирующих на гормональную обработку и дающих биологически полноценные эмбрионы.

Метод трансплантации эмбрионов базируется на использовании в качестве доноров эмбрионов коров с высокой продуктивностью (7000 кг молока за лактацию и более).

Получение быков-трансплантатов от выдающихся родителей не снимает проблему их последующей оценки по качеству потомства, но значительно увеличивает вероятность отбора (в результате значительного повышения селекционного дифференциала матерей) выдающихся улучшателей для использования в племенных заводах.

Систематический отбор маток с высокой продуктивностью, подбор к ним производителей соответствующего качества, размножение их потомства методом трансплантации, отбор среди потомства и использование лучших обеспечивают получение животных более высокого качества из поколения в поколение.

Получением бычков с учетом их линейной принадлежности и последующей ротации методом трансплантации обеспечивается ускорение качественного совершенствования быков в линиях и соответственно усиливается влияние и приобретает постоянство улучшающего воздействия на крупные массивы животных товарных ферм.

При оценке быков-трансплантатов по качеству потомства снижается проблема негативного влияния на стада, поскольку в среднем качество оцениваемых производителей довольно высокое. Кроме того, телочки-трансплантаты, полученные от «заказных» спариваний, — хороший селекционный материал для выбора среди них рекордисток нового поколения и использования их в качестве матерей бычков.

Корову-донора выбирают из стада с относительно высоким уровнем молочной продуктивности, характерной для той или иной породы. Должны быть известны происхождение и группа крови животного, подтвержденные соответствующими документами.

Молочная продуктивность коров-доноров за ряд лактаций в среднем должна быть на 50—60% выше стандарта данной породы, а содержание жира в молоке — на 20% и более.

При отборе коров-доноров эмбрионов руководствуются комплексом селекционных признаков: породность, экстерьер, конституция, морфофункциональные свойства вымени, легкость отелов, жизнеспособность приплода и др. Коров, имеющих несколько лактаций, оценивают по данным бонитировки за лучшую лактацию. Предпочтение отдается животным с длительным сроком использования, а среди них — коровам, имеющим высокопродуктивных дочерей или положительно оцененных по качеству потомства сыновей.

Подбираемая для региона группа коров-матерей быков должна быть генеалогически дифференцирована не менее чем на 4 неродственных группы с учетом возможности ротации быков. В связи с высокой индивидуальной чувствительностью на гонадотропин при гормональном вызывании суперовуляции первоначальное число коров-доноров должно превышать потребность в них в 2—3 раза. Окончательный отбор проводят после установления реакции коров на гормональные препараты. Для сохранения генофонда редких и исчезающих пород с использованием метода криоконсервирования эмбрионов коров-доноров отбирают с учетом сохранения необходимого диапазона внутрипородного генетического разнообразия.

У коровы-донора при последнем отеле не должно быть осложнений (трудный отел, задержание последа, послеродовые заболевания половых органов). Состояние органов воспроизводства постоянно контролируют — ректальное исследование на 15—20-й день после отела и затем наблюдения в течение полутора-двух циклов охоты. Коровы с ненормальным половым циклом, кистами яичников к использованию в качестве доноров эмбрионов непригодны.

На каждое животное (или группу) оформляют ветеринарное свидетельство (форма № 1) с указанием состояния здоровья (по данным клинического обследования), благополучия хозяйства и животных по бруцеллезу, туберкулезу, вирусным респираторным заболеваниям, трихомонозу, вибриозу, инфекционному пустульному вульвовагиниту, ящуру и другим заболеваниям, передающимся эмбриону.

В качестве реципиентов можно использовать коров и телок. При составлении плана пересадок эмбрионов учитывают вероятность выбраковки 20—25% животных-реципиентов из-за непригодности к воспроизводству вообще или в конкретно намеченные сроки пересадки.

Коровы-реципиенты должны быть не старше 7 лет, клинически здоровыми без признаков нарушения обмена веществ, с ежегодными отелами без осложнений, хорошо выраженной охотой.

Телки-реципиенты по живой массе должны отвечать требованиям классов элита-рекорд и элита, иметь нормально развитые и хорошо функционирующие органы воспроизводства. Ми-

нимальный возраст телок 16—18 мес, живая масса — не ниже 350—380 кг. Воспроизводительные функции их постоянно регистрируются по показателям спонтанной охоты, данным клинического и ректального исследований. К телкам-реципиентам, отбираемым в хозяйствах (на фермах), предъявляют те же ветеринарные требования, что и к коровам-донорам.

Отбор быков-производителей. Для осеменения коров-доноров отбирают быков, положительно оцененных по качеству потомства. Пригодны лишь те быки, которые имеют положительную сочетаемость при спаривании с высокопродуктивными коровами. Для определения сочетаемости используют материалы оценки быка по качеству потомства. Устанавливают положительную (плюс варианты) и отрицательную (минус варианты) сочетаемость, превосходство дочерей над матерями по продуктивности (в кг и %) при положительной сочетаемости. При этом отбирают быков, имеющих более высокий показатель положительной сочетаемости с высокопродуктивными коровами. Быков с отрицательной сочетаемостью для получения потомков-трансплантатов использовать не рекомендуется. Отобранные быки не должны иметь хромосомных аномалий, а его потомство — наследственно обусловленных экстерьерно-конституционных недостатков.

Подбор быков-производителей к коровам-донорам строго индивидуальный с учетом получения генеалогически разобщенных групп быков и их ротации. Отдается предпочтение улучшателям по удою, содержанию в молоке белка и жира, а также по экстерьеру и конституции дочерей. Учитывают степень проявления признаков у дочерей, обуславливающих технологичность.

При осеменении коров-доноров в редких и исчезающих породах используют сперму быков, принадлежащих к генеалогически разобщенным группам, в соответствии с задачами сохранения генофонда и использования его в перспективе.

Подготовка коров-доноров и овец-доноров. Основное условие, определяющее нормальные воспроизводительные функции и получение хорошо развитого приплода, — полноценное сбалансированное кормление с учетом физиологического состояния и продуктивности животных. Особенно важно обеспечить кормление высокопродуктивных коров-доноров в период запуска и в первые 3—4 мес после отела, поскольку эти периоды совпадают с максимальным увеличением массы плода (на 18—25 кг) и наивысшей молочной продуктивностью, на что расходуется большое количество питательных веществ. Низкий уровень кормления, несбалансированность рационов по общей питательности и жизненно важным элементам ведут к нарушению обмена веществ, воспроизводительных функций, снижению качества эмбрионов.

Установлена тесная взаимосвязь состояния обмена веществ у коров-доноров и овец-доноров с селекционными и воспроизводительными функциями. Низкий уровень кормления отрицательно влияет на уровень суперовуляции, качество эмбрионов и их приживляемость после пересадки. Высокий уровень кормления оказывает позитивное влияние на эти показатели. Отмечена и определенная специфика в уровне гормонов в крови животных в зависимости от кормления и состояния коров-доноров и овец-доноров.

Гормональная обработка животных с нарушением обмена веществ для вызывания у них суперовуляции дает отрицательные результаты.

При нарушенном обмене веществ суперовуляцией реагируют только 36% коров с низким выходом нормальных эмбрионов (в среднем 1,6 эмбриона на одного донора). Коровы с нормальным обменом веществ реагируют суперовуляцией до 95% с выходом нормальных эмбрионов в среднем 5,8 на одного донора (Р. Rommel, 1986). Поэтому при подготовке коров для использования в качестве доноров эмбрионов целесообразно определять у них состояние обмена веществ по биохимическим показателям.

Для поддержания нормального обмена веществ и общего состояния животных рационы балансируют по энергии, протеину, углеводам, макро- и микроэлементам, биологически активным веществам. Для коров-рекордисток составляют индивидуальные рационы.

Коровы к отелу должны достигать уровня заводской упитанности, что обеспечивается своевременным запуском и полноценным кормлением их в сухостойный период. При высоких удоях в рационе коров ко времени запуска сокращают дозу или полностью исключают из него сочные, зеленые и концентрированные корма. Заменяют их сеном хорошего качества. Высокоудойных коров запускают постепенно в течение 6—14 дней. Прекращают доение при суточном удое менее 4 кг, после чего увеличивают рацион до нормы, предусмотренной для стельных сухостойных коров. Используют только высококачественные корма. Основной состав рациона и режим кормления должны быть постоянными. Чтобы не снижалась живая масса у новотельных коров в период наивысших удоев, уровень энергетического питания их увеличивают на 1,5—2 корм.ед. Для этого в рацион вводят высококачественную травяную резку, гранулы, брикеты, легкоусвояемые зерновые концентраты и корнеплоды. Оптимальную структуру рациона выдерживают правильным сочетанием кормов с учетом потребности животных в основных питательных веществах, на 1 корм. ед.: в переваримом протеине дойных коров — 95—105 г, стельных сухостойных — 110 г, в сахарах — из расчета 80—120 г на 100 г переваримого про-

теина. Высокая энергетическая питательность рациона обеспечивается содержанием в нем оптимального количества клетчатки, которое при суточном удое до 10 кг составляет 22—24%, до 20 кг — 20—22%, до 30 кг — 16—18% сухого вещества. Более половины клетчатки должно содержаться в грубоволокнистых кормах (величина резки не менее 5 см). При высоком уровне молочной продуктивности коров кормят (особенно концентратами) 4—5 раз в сутки; зерновые концентраты целесообразно давать плющенные, комбикорм — гранулированный. Одна дача концентратов составляет 30—50%. Скармливают их в смеси с кормами основного рациона. Дефицит макро- и микроэлементов, витаминов восполняют соответствующими минеральными добавками и премиксами. Поят животных из индивидуальных или групповых автопоилок. Содержат коров-доноров и реципиентов в светлых, сухих животноводческих помещениях, где соблюдаются необходимые параметры микроклимата. Для стельных сухостойных коров устраивают просторные стойла с обильной подстилкой. Высокоценных коров-доноров содержат в индивидуальных боксах (3,5×4 м).

Коров ежедневно чистят и выпускают (за исключением ненастных дней) на 3—4-часовую прогулку или организуют для них принудительный активный моцион по специально устроенному прогону на расстояние 2—3 км. В помещениях и на территории для содержания скота соблюдают высокую санитарную культуру и основные ветеринарные требования к животноводческим предприятиям закрытого типа. Основные условия кормления и содержания нетелей-реципиентов те же, что и для коров.

Точное выявление коров в охоте имеет важное значение для вызывания суперовуляции. Первый день охоты при отсчете полового цикла у коров и телок принимается за нулевой. Для правильного определения дня охоты учитывают стадии полового цикла — течку, общее возбуждение, половую охоту и овуляцию. Течка характеризуется набуханием и покраснением слизистых оболочек преддверия влагалища, влагалища и шейки матки. Канал шейки матки приоткрыт, из половых органов выделяется слизь. В начале течки слизь стекловидно-прозрачная, водянистой консистенции, в середине — выделяется тянущаяся прозрачная слизь, которая к концу течки мутнеет, количество ее уменьшается. Продолжительность течки — от 2 до 6 дней. Общее возбуждение наступает в основном через 24—36 ч после начала течки и проявляется в изменении поведения животного: беспокойство, снижение аппетита, удоя. Во время прогулки или пастбы животное прыгает на других животных и допускает прыжки на себя. Половая охота у самок проявляется в стремлении к самцу и готовности к спариванию. Коровы допускают прыжки на себя других самок, проявляя рефлекс неподвижности. При прыжках самок на животное в охоте оно отводит

хвост в сторону. Как правило, охота начинается утром и длится 18—24 ч. Овуляция (выделение яйцеклеток из фолликулов) происходит у коров через 10—15 ч после окончания охоты. При суперовуляции эта стадия растянута во времени с одновременным удлинением охоты.

Определяют животных в охоте по рефлексу неподвижности. Для контроля исследуют влагалище и ректально определяют состояние яичников. Выявление животных в охоте проводят дважды в день — утром и вечером.

В племенной работе с овцами различного направления продуктивности весьма важно целенаправленное и рациональное использование ценных генотипов. Решение этого вопроса позволит в значительной степени повысить результативность селекции, направленной на ускорение генетического прироста разнообразной продукции овцеводства.

Улучшение племенных и продуктивных качеств овец в значительной степени сдерживается довольно редкой встречаемостью в стадах ценных генотипов. Кроме того, от каждой ценной в генетическом отношении матки за период ее хозяйственного использования в стаде при обычных методах разведения можно получить только до 7 потомков. К тому же не от каждого барана, спаренного с такой маткой, можно получить генетически ценное потомство. Поэтому проблему ускоренного размножения ценных генотипов в племенных стадах широко распространенных пород, малочисленных генетически обособленных породных групп импортных животных, а также исчезающих отечественных генотипов можно решить путем гормонального вызывания суперовуляции у овец-доноров ценных генотипов и пересадкой их эмбрионов маткам-реципиентам. В качестве реципиентов наиболее целесообразно использовать овцематок многоплодных пород (романовская, финский ландрас и др.), способных вынашивать несколько плодов.

В зарубежном овцеводстве метод трансплантации эмбрионов успешно применяется для размножения импортных животных. В Англии таким способом размножают овец породы тексель, которые в ограниченном числе были завезены в страну для промышленного скрещивания. В полной мере это относится к породе драйедель, завезенной из Новой Зеландии.

Подготовка овец для использования в качестве доноров эмбрионов заключается прежде всего в создании хороших условий кормления и содержания. Овцы-доноры эмбрионов должны быть средней и выше средней упитанности.

Выбирают овец в охоте 3 раза в день с использованием хороших по активности баранов-пробников. При выборе овец-доноров в охоте обращают внимание на их половую активность, изменения в наружных гениталиях, наличие рефлекса неподвижности. Для гормонального вызывания суперовуляции ис-

пользуют овец как с естественным, так и с синхронизированным эстральным циклом. Обработывают овец гонадотропинами на 11-й день эстрального цикла.

ГОРМОНЫ ДЛЯ ВЫЗЫВАНИЯ СУПЕРОВУЛЯЦИИ У ЖИВОТНЫХ

Наступление беременности сопровождается активизацией образования гормонов, которое происходит несинхронно. Каждый гормон имеет свою специфику образования, накопления в крови и выделения на протяжении всей беременности. Специфика образования гормонов связана с видом животных, длительностью беременности, типом плаценты, зародыша.

Наиболее резко проявляется интенсивность образования гормонов полового цикла у лошадей. У кобыл выделение фолликулина в мочу в середине жеребости увеличивается в 1000 раз. Однако в этот период такой подъем фолликулина не имеет практического значения. Важнее значительное возрастание в начале второго месяца жеребости содержания в крови гонадотропного фактора — до 100—300 тыс. м. е. (мышинных единиц) в 1 л (А. Л. Падучева, 1965).

Для животноводства готовят и применяют гормональный препарат в виде цельной сыворотки крови (СЖК). СЖК — это гормональный препарат, представляющий собой нормальную стерильную сыворотку, получаемую из крови здоровых кобыл в период от 40 до 100 дней (и не позднее 110 дней) жеребости.

Для количественного определения активности гонадотропина чаще пользуются реакцией матки у инфантильных мышей. Реакцию матки на экзогенное введение гонадотропина определяют визуально по пятибалльной системе. За единицу принимается то минимальное количество препарата, которое вызывает увеличение матки с оценкой в 3 балла у 50% испытуемых инфантильных мышей массой 6,5—8 г через 72 ч после однократной инъекции. Эта единица по сравнению с международной в 2—2,5 раза меньше, и доза для овцы в 1000 или 1200 м. е. (мышинных единиц) соответственно равна 500 или 600 МЕ (международных единиц). Для вызывания суперовуляции у коров-доноров этим препаратом оптимальная доза его равна 5000 или 6000 МЕ. Главное препятствие использования СЖК для вызова суперовуляции — высокий процент тяжелых случаев анафилактики и нередко со смертельным исходом.

В нашей стране осваивается выпуск очищенного препарата СЖК (Всесоюзный научно-исследовательский институт технологии и биологической промышленности — ВНИИТиБП), который по результатам произведенного испытания не уступает стандартному препарату СЖК (фоллигон, интергонан, маротропин) по числу реагирующих суперовуляцией животных, числу овуляций и выходу нормальных эмбрионов. Оптимальная доза стандартного препарата высокой очистки 2500—3000 МЕ.

64
Гипофизарный фолликулостимулирующий гормон (ФСГ).
В настоящее время высокоочищенные препараты ФСГ получены из гипофиза всех основных видов сельскохозяйственных животных. По химическому строению ФСГ является глюкопротеидом, неотъемлемый компонент которого — сиаловая кислота, обеспечивающая сохранение активности препарата.

При биологическом тестировании все высокоочищенные препараты ФСГ из овечьего гипофиза имеют примесь лютеинизирующего гормона (ЛГ) в пределах 0,0025—0,06 ед/мг и 0,16 — в препаратах из гипофиза лошадей. Этим, вероятно, объясняется заметная ЛГ-активность в высокоочищенных препаратах ФСГ.

Основное действие ФСГ заключается в стимуляции множественного роста фолликулов и сопровождается пролиферацией клеток гранулезы. Однако фолликулы не достигают полного развития и не секретируют эстрогены под действием одного ФСГ. Установлено, что биологическое действие ФСГ происходит в результате совместного воздействия ФСГ и ЛГ. Они взаимно усиливают друг друга, что принято называть эффектом аугментации. Усиливающее действие ФСГ и ЛГ проявляется при раздельном их введении. Инъекции ФСГ совместно с антисывороткой к ЛГ, которая нейтрализует даже следы ЛГ в препарате ФСГ, не вызывают роста и развития фолликулов.

ФСГ подготавливает структуры яичников к биосинтезу половых гормонов, стимулирует активность ароматизирующих ферментов, которые осуществляют последний этап биосинтеза эстрогенов — их образование из андрогенов. Оптимальная доза ФСГ при суперовуляции в зависимости от схемы гормональной обработки составляет 32—50 мг. Для этого используют ФСГ из гипофиза свиней.

Лютеинизирующий гормон (ЛГ). По химическому строению ЛГ — глюкопротеид. Белковая часть молекулы ЛГ состоит из двух субъединиц, соединенных между собой нековалентной связью, которая легко разрывается в кислой среде или под воздействием соединений, нарушающих гидрофобные связи. В экстрактах гипофиза обнаружено несколько гетерогенных форм ЛГ, в том числе укрупненной его молекулы, являющейся, возможно, прогормоном.

Биологическое действие ЛГ заключается в осуществлении овуляции, превращении овуляторного фолликула в желтое тело и секреции им прогестерона, в развитии фолликулов и секреции эстрогенов, стимуляции развития интерстициальной ткани яичников. В яичниках половозрелых животных ЛГ во взаимодействии с ФСГ обеспечивают созревание фолликулов, которые становятся способными к овуляции. Овуляция у животных обычно вызывается преимущественным воздействием ЛГ. Под его влиянием происходит разрыв стенки фолликула, на месте

которого образуется желтое тело и поддерживается дальнейшее его функционирование. Роль ЛГ заключается не только в поддержании функции желтого тела и секреции прогестерона, но также и в развитии фолликулов, секреции эстрогенов и проявлении охоты. ЛГ оказывает непосредственное действие на активность стероидогенеза в яичниках. Точкой приложения ЛГ в процессе биосинтеза половых гормонов является этап превращения холестерина в прегненолон. Образование прогестерона в половых железах — следующий этап превращения прегненолона, что свидетельствует о наличии тесной связи в организме между продукцией ЛГ и синтезом прогестерона. ЛГ при гормональном вызывании суперовуляции у коров-доноров используют с ФСГ в объеме 20% от общей дозы ФСГ.

Гонадотропин — релизинг-гормон (Гн—Рг). Препарат применяется для регуляции половой функции у животных. Вызывает выделение из гипофиза ФСГ и ЛГ. Его называют также гонадолюберинном. Гн—Рг термостабилен, очень быстро инактивируется. Период распада меченого препарата составляет 5—10 мин. Значительное накопление экзогенного нейрогормона наблюдается в адено- и нейрогипофизе, эпифизе, почках и печени. Через 1 ч после внутривенного введения препарата с мочой выделяется лишь 15% общей дозы гормона. Главный фактор, снижающий уровень Гн—Рг, — пептидазы. Они обнаружены в гипоталамусе, и наибольшая их активность отмечена в местах продуцирования, выделения и месте действия Гн—Рг (гипоталамус, гипофиз). Таким образом, пептидазы включаются в механизм обратной взаимосвязи подавления функции Гн—Рг под действием ЛГ или эстрогенов. Основное место образования Гн—Рг — предоптическая область переднего гипоталамуса. В осуществлении стимуляции синтеза и выделения Гн—Рг активную роль играют простагландины, особенно группы Е. В общей схеме гормонального вызывания суперовуляции Гн—Рг применяют для улучшения процессов овуляции и вводят его при втором осеменении в объеме 2 мг (через 12 ч после первого осеменения).

Прогестерон. Развивающийся под действием гонадотропинов фолликул синтезирует в возрастающем количестве стероидные гормоны. Начальные этапы образования половых стероидов до уровня образования прогестерона протекают с одинаковой скоростью как в гранулезных, так и в текальных клетках стенки фолликула. После овуляции клетки гранулезы превращаются в лютеиновые. При этом резко увеличивается их кровоснабжение и интенсивность биосинтеза стероидов.

Источник образования половых гормонов — холестерин, который синтезируется в половых железах и приносится с кровью из других тканей. Половые стероидные гормоны оказывают многостороннее биологическое воздействие на органы половой сферы. Основная роль прогестерона заключается в сохранении

беременности посредством воздействия на матку. Он прекращает действие эстрогенов в отношении стимуляции пролиферативных процессов в эндометрии и вызывает в нем изменения, называемые прогестативной пролиферацией, что способствует нидации эмбриона и возникновению плацентарной реакции. Прогестерон способствует расслаблению мышечных волокон, уменьшает сократительную деятельность матки, что предотвращает изгнание зародыша из половых путей.

Прогестерон — белый кристаллический порошок, нерастворимый в воде, растворимый в спирте, эфире, жирах. Изготавливается синтетическим путем. Выпускается в ампулах по 1 мл 0,5% (5 мг), 1% (10 мг) и 2,5% (25 мг) раствора в масле. Применяется для синхронизации охоты и гормонального вызывания суперовуляции у коров-доноров и овец-доноров.

Антисыворотка на СЖК. Применение антисыворотки на СЖК при гормональном вызывании суперовуляции у коров-доноров позволяет снимать продолжительное действие СЖК (около 60 дней), что обычно считается причиной низкого выхода качественных эмбрионов, высокой изменчивости в числе и качестве овуляции.

Организм животных очень медленно вырабатывает антитела на инъекции экзогенного гонадотропина. Поэтому при получении антисыворотки применяют метод предварительной сенсибилизации внутрикожного введения антигена (СЖК). Для замедления рассасывания и продления срока действия СЖК применяют инъекции адьюванта Фрейнда. В качестве продуцентов антисыворотки можно использовать овец, коз, кроликов и индюков. Предпочтение отдается половозрелым козам. Животные должны быть клинически здоровыми, хорошей упитанности.

В связи с тем что для гормонального вызывания суперовуляции у коров-доноров применяют высокие дозы СЖК (2500—3000 или 5000—6000 МЕ), в качестве антигена используют препарат гонадотропина высокой очистки, поскольку нативная СЖК имела бы слишком большой объем (до 30 мл) и ввести ее внутрикожно животному было бы затруднительно.

Препарат СЖК (3000 МЕ) растворяют в 10 мл физраствора, добавляют в раствор 5 мл адьюванта Фрейнда, тщательно смешивают до получения однородной эмульсии и вводят внутрикожно в область спины в 50—70 точках. Область инъекции выбривают, тщательно моют водой с мылом, ополаскивают и дезинфицируют 70%-ным этиловым спиртом. Через каждые 2 недели антиген вводят повторно в той же дозе, но уже внутримышечно с внутренней стороны бедра. После трех аналогичных обработок у животных берут кровь (10 мл) для предварительного контроля активности ее сыворотки. После установления активности проводят еще две инъекции СЖК и через 2 недели от пятой обработки тотально берут кровь и затем

животное убивают, кожу снимают, а тушу со всеми внутренними органами утилизируют.

Для взятия крови используют стерильную посуду с закрытой системой, состоящей из иглы для взятия крови, соединительной резиновой трубки с двустенным полиэтиленовым пакетом, внутренняя полость которого смочена 2%-ным раствором цитрата натрия (15—20 мл), предохраняющего от свертывания крови. Кровь берут из яремной вены после соответствующей санитарной обработки операционного поля. Легким покачиванием пакета кровь тщательно перемешивают с цитратом натрия. Пакет с кровью переносят в прохладное помещение и оставляют в нем на 5—6 ч для отстаивания сыворотки. После отстоя сыворотку вливают в стерильные флаконы для дефибринирования, для чего добавляют стерильный 30%-ный раствор хлористого кальция из расчета 1,3 мл на 1 л сыворотки и ставят флаконы на качалку на 2—4 ч. Полученную дефибринированную сыворотку фильтруют через 4 слоя стерильной марли и консервируют 5%-ным раствором фенола (1 мл на 9 мл сыворотки), затем расфасовывают в ампулы по 10 мл и запаивают их. Хранят в темном месте, в холодильнике при температуре 5°C.

Активность антисыворотки определяют при одновременном введении с гонадотропином СЖК в антиединицах по связыванию 1 мл антисыворотки и выражают в мышинных или международных единицах. При этом если активность антисыворотки определена в мышинных единицах, а СЖК — в международных, то необходимо сделать пересчет. Одна международная единица в соответствии с ВОЗ равна 2,33—2,43 м. е.

Определение активности антисыворотки проводят на неполовозрелых самках белых мышей в возрасте 20—28 дней. Для этого готовят стандартный раствор СЖК, 1 мл которого должен содержать 15 МЕ активности. Препарат вводят мышам в область спины в дозе 0,2 мл разных разведений от 1:2 до 1:128. Для определения активности каждого разведения используют 5 мышей. Одновременно 5 контрольным мышам инъецируют 0,2 мл СЖК в смеси с 0,2 мл физраствора. Эффективность реакции оценивают по отсутствию увеличения массы матки. Увеличенной матка считается при массе 30—35 мг.

Пример расчета. Увеличение матки при введении 0,2 мл при разведении 1:32 и 1:64 не выявлено. Следовательно, антисыворотка при таком разведении связывает 3 и 6 МЕ гонадотропина СЖК ($3 \cdot 5 \cdot 32 = 480$ и $6 \cdot 5 \cdot 64 = 1920$ антиединиц). Активность полученной антисыворотки составляет 480 и 1920 антиединиц в 1 мл. В первом случае для нейтрализации дозы СЖК в 3000 МЕ необходимо ввести антисыворотки 6 мл, во втором — 1,5 мл. В общей схеме гормонального вызывания суперовуляции антисыворотку для нейтрализации СЖК применяют через 24 ч от начала охоты. Более раннее введение антисыворотки приво-

10. Схемы гормональной обработки коров-доноров для вызывания суперовуляции

День эстрального цикла	Название препарата	Доза
Схема 1		
2-й	Витамин А	150000 МЕ
	» Е	100 мг
	Калий йодистый	100—200 мг
10—12-й	ГСЖК	2500—3000 МЕ
	Витамин А	7500 МЕ
	» Е	50 мг
12—14-й	Простагландин	500 мкг — 30 мг
14—16-й	Охота и осеменение	
21—23-й	Нехирургическое извлечение эмбрионов	
Схема 2		
2-й	Витамин А	150000 МЕ
	» Е	100 мг
10—12-й	ГСЖК	2500—3000 МЕ
	Витамин А	75000 МЕ
	» Е	50 мг
12—14-й	Простагландин	500 мкг — 30 мг
14—16-й	Охота и осеменение	
21—23-й	Гонадотропин — рилизинг-гормон при втором осеменении	
	Нехирургическое извлечение эмбрионов	
Схема 3		
2-й	Витамин А	150000 МЕ
	» Е	100 мг
10—12-й	ГСЖК	2500—3000 МЕ
	Витамин А	75000 МЕ
	» Е	50 мг
12—14-й	Простагландин	500 мкг — 30 мг
14—16-й	Охота и осеменение, антисыворотка	2 мл
21—23-й	ГСЖК	
	Нехирургическое извлечение эмбрионов	
Схема 4		
8-й	ФСГ-п	10 мг
9-й	ФСГ-п	10 мг
10-й	ФСГ-п	10 мг
11-й	ФСГ-п	10 мг
	Простагландин	500 мкг — 30 мг
12-й	ФСГ-п	10 мг
13-й	Охота и осеменение	
20-й	Нехирургическое извлечение эмбрионов	
Схема 5		
8—10-й	ФСГ-п	12 мг
9—11-й	ФСГ-п	10 мг
10—12-й	ФСГ-п	6 мг
	Простагландин	500 мкг — 30 мг
11—13-й	ФСГ-п	4 мг
12—14-й	Охота и осеменение	

День эстрального цикла	Название препарата	Доза
19—21-й	Нехирургическое извлечение эмбрионов	
Схема 6		
8—10-й	ФСГ-п	15 мг
9—11-й	ФСГ-п	12 мг
10—12-й	ФСГ-п	10 мг
	Простагландин	500 мкг — 30 мг
11—13-й	ФСГ-п	5 мг
12—14-й	Охота и осеменение	
19—21-й	Нехирургическое извлечение эмбрионов	

дит к снижению реакции яичников на СЖК у коров-доноров. Доза вводимой антисыворотки должна связывать не менее одной трети применяемой дозы гонадотропина СЖК. Поскольку к началу введения антисыворотки (на пятые сутки после введения СЖК) активного гонадотропина остается около одной трети, то и доза антисыворотки должна быть меньше, и она будет равна 1—2 мл.

МЕТОДЫ ВЫЗЫВАНИЯ СУПЕРОВУЛЯЦИИ

Множественную овуляцию у коров-доноров вызывают инъекцией гонадотропина (СЖК) в сочетании с простагландинами и другими биологически активными веществами на 10—12-й день полового цикла. Один из недостатков этого способа — высокая степень вариабельности числа овуляций даже при использовании одной и той же дозы гонадотропина.

Процент животных, реагирующих множественным ростом фолликулов на введение экзогенного гонадотропина, находится в прямой зависимости от дозы препарата. Оптимальная доза стандартных препаратов СЖК высокой очистки (интергонан, маротропин, фолигон, серогонадотропин и др.) — 2500—3000 МЕ.

Для вызывания суперовуляции применяют несколько схем гормональной обработки (табл. 10).

Простагландин (эстрофан, эструмат) инъецируют в дозе 500 мкг по клопростенолу, простагландин $F_{2\alpha}$ (лютализ, энзопрост) — 30 мг, ФСГ-п (общая доза 50 мг) вводят внутримышечно в течение 5 дней, дважды в день — утром и вечером по 5 мг с интервалом строго через 12 ч. Желательно одним флаконом препарата ФСГ-п (50 мг) обрабатывать одновременно 5 коров-доноров. Оставшийся препарат хранят в холодильнике.

В практике животноводства хорошо известно влияние сезона года на проявление половой функции. Так, у коров половая

функция резко активизируется в ранние весенние и первый летний месяцы, чему способствуют удлинение светового дня и потепление. Эта зависимость у животных может меняться с изменением условий содержания и кормления.

Периодичность проявления клинических признаков и полового поведения, а также изменения, происходящие в половой системе самок, определяются взаимодействием всех систем организма в целом, а не воздействием одного или нескольких факторов.

Тонкость регулирования проявления клинических признаков и полового поведения вплоть до полного торможения говорит только о скорости реакции организма на изменение внутренней или внешней среды. Взаимоотношения организма и среды чрезвычайно многогранные и сложные. Рассматривая воздействия отдельных факторов на организм или на его систему, можно сказать, что организм животного является как бы единым комплексом самонастраивающихся систем.

Половая система до известной степени автономна. В то же время ее функция зависит от общей настроенности организма, которая складывается из ответных реакций на внешние условия. Эти общие положения, лежащие в основе всех систем, и в частности репродуктивной, должны учитываться при гормональной обработке коров и телок-доноров.

Изменения, происходящие в воспроизводительной системе коров-доноров при обработке гонадотропинами, связаны в определенной мере с сезоном. Осенью наблюдается более активная реакция животных на гонадотропин, чем в другое время года.

Снизить вариабельность и повысить эффективность гормональной обработки коров и телок-доноров по сезонам года можно при создании условий полноценного кормления, хорошего содержания. Поэтому в зимне-весенний и в другие периоды года, когда возможны нарушения в кормлении животных-доноров, целесообразно вызывать суперовуляцию путем инъекции гонадотропина на 10—12-й день полового цикла с введением через двое суток простагландина при 3-кратном осеменении с интервалом 12 ч замороженной спермой и извлечении эмбрионов на 7—8-е сутки после первого осеменения. Для повышения выхода эмбрионов животным-донорам в начале проявления охоты внутримышечно инъектируют витамины А и Е соответственно в дозах 120—150 тыс. МЕ и 80—100 мг. При этом одновременно дают с кормом (один раз в сутки в течение 18—25 дней) калий йодистый в дозе 100—200 мг на одну голову, а с введением гонадотропина дополнительно инъектируют витамины А и Е в половинной дозе от первоначальной, применяемой в период проявления охоты.

При указанном способе можно получить реакцию яичников на гонадотропин у 95—97% животных, число овуляций в сред-

нем — 11,9, нормальных эмбрионов — 6,2 на одного донора. Оплодотворяемость овулировавших яйцеклеток у суперовулировавших животных достигает 87%. Характерная особенность данной схемы гормональной обработки — четкая синхронизация охоты у коров-доноров (95,5%).

Относительно высокий эффект реакции яичников у доноров, особенно в группе телок, объясняется, вероятно, тем, что под влиянием витамина А и Е, а также калия йодистого повышается реактивность организма животных на гонадотропин.

Локализация желтого тела цикла в правом и левом яичниках перед обработкой гонадотропином не влияет на число индуцированных к росту фолликулов и на уровень овуляций. У животных с коротким половым циклом, удлиненной охотой и заметной отечностью наружных половых органов после обработки гонадотропином увеличивается число неовулировавших фолликулов в яичниках. Неовулировавшие фолликулы при множественной овуляции в большом количестве нежелательны, поскольку снижается оплодотворяемость яйцеклеток и повышается уровень дегенерированных зародышей.

Важный показатель эффективности гормональной обработки — процент овуляций созревших фолликулов. Значение этого показателя обусловлено прежде всего стремлением добиться увеличения выхода яйцеклеток и получения большого числа эмбрионов. Кроме того, неовулировавшие фолликулы — потенциальный источник образования кист. Наши наблюдения показали, что образование кист после гормональной обработки — явление очень редкое, а наличие неовулировавших фолликулов при умеренной (до 10) и высокой (до 20) овуляциях не оказывает существенного влияния на оплодотворяемость яйцеклеток, число и качество эмбрионов.

Эффективность метода вызывания множественной овуляции определяется в конечном счете выходом эмбрионов на одного обработанного донора. Число положительных доноров, у которых были извлечены эмбрионы, составило 89,5%. Вполне удовлетворительные результаты можно получить также по числу нормальных эмбрионов, пригодных для пересадки или для закладки их на длительное хранение в эмбриобанк после глубокого замораживания.

Между числом овуляций и числом извлеченных зародышей существует достоверная прямая зависимость. Коэффициент корреляции между названными показателями равен +0,79. Коэффициент корреляции между числом овуляций и числом нормальных эмбрионов составляет 0,11, что свидетельствует об отсутствии зависимости числа нормальных эмбрионов от числа овуляций.

Гонадотропин (СЖК) содержит в своем составе ФСГ и ЛГ, и это дает основание предполагать, что соотношение этих ком-

понентов в различных типах СЖК может влиять на ответную реакцию яичников.

Чтобы снизить число неовулировавших фолликулов у коров-доноров, предложен способ получения зародышей, включающий вызывание суперовуляции путем внутримышечной инъекции гонадотропина СЖК и гормонов, оказывающих лютеинизирующее действие, на 10—12-й день полового цикла с последующей (через двое суток) инъекцией простагландина и 2—3-кратное осеменение животных. В качестве гормона, вызывающего лютеинизирующее действие, используют релизинг-гормон гипофизарных гонадотропинов, который инъецируют коровам в дозе 2 мкг на 1 кг живой массы при втором осеменении. Введение гонадотропина — релизинг-гормона — способствует регуляции физиологических процессов в яичнике и матке, что выражается в повышении уровня овуляции в 4,3 раза, оплодотворяемости яйцеклеток — в 2,1 раза по сравнению с другими известными способами.

Увеличение гонадотропинов (ФСГ и ЛГ) в периферической крови происходит непосредственно после инъекции Гн—Рг и удерживается примерно в течение 2—3 ч. Применение его при втором осеменении обеспечивает поддержание высокого уровня ЛГ, что по времени совпадает с оптимальным сроком овуляции. При множественном росте фолликулов после введения СЖК овуляция, как правило, растягивается до 36 ч. Более раннее применение в этих условиях релизинг-гормона блокирует дальнейшую овуляцию остальных фолликулов и вызывает образование желточных кист.

Снизить в 2 раза затраты на одну гормональную обработку и в 1,5 раза — ее себестоимость по сравнению с вызыванием суперовуляции гипофизарным препаратом ФСГ-п и достичь удовлетворительных результатов можно при применении стандартных препаратов СЖК в сочетании с антисывороткой на гонадотропин. При гормональной обработке по этой схеме реагируют суперовуляцией 82% животных, а эмбрионы получают у 70% коров-доноров от числа обработанных. Эти показатели несколько ниже, чем при обработке ФСГ-п (95 и 84%), но они выше, чем при вызывании суперовуляции одной СЖК (72 и 47%).

Среднее число овуляций достигает 10 с выходом в среднем 6 нормальных эмбрионов на каждого обработанного донора.

Однако следует учесть, что при многократной обработке ФСГ-п число овуляций не снижается (9,8), а число нормальных эмбрионов (5,8) даже несколько возрастает (до 6,9).

При использовании СЖК и антисыворотки стабильные результаты получают при двух повторных обработках. Дальнейшее увеличение числа обработок по этой схеме не снижает уровня суперовуляции, но уменьшает число коров, реагирующих

суперовуляцией (до 50% при третьей обработке), и выход нормальных эмбрионов (до 3). Следовательно, СЖК и антисыворотку можно применять не более 2 раз. В последующем таких коров-доноров обрабатывают гипофизарным гормоном ФСГ-п.

При повторных и многократных гормональных обработках коров-рекордисток с использованием гипофизарного гормона (ФСГ) применяют схемы 5 и 6 с началом инъекции препарата с 8-го или 10-го дня эстрального цикла.

СИНХРОНИЗАЦИЯ ОХОТЫ У ДОНОРОВ И РЕЦИПИЕНТОВ

Синхронизация охоты у крупного рогатого скота, особенно у телок, ускоряет наступление стельности, активизирует половую функцию у животных и позволяет программировать всю работу по воспроизводству и пересадке эмбрионов. В молочном скотоводстве уже широко используются различные схемы применения биологически активных препаратов для улучшения воспроизводства.

Представляет определенный интерес получение эмбрионов у доноров, предварительно обработанных прогестагеном. Однако методы с использованием прогестагенов для синхронизации охоты у доноров и реципиентов не получили широкого распространения. По-видимому, это связано не столько с отрицательным влиянием прогестагенов на оплодотворяемость яйцеклеток, сколько с появлением новых, более эффективных способов синхронизации охоты.

Наиболее перспективным оказался простагландин, применение которого дало возможность вызывать синхронную охоту у животных, в яичниках которых имеются активные желтые тела. При однократной инъекции простагландина приход животных в охоту не превышает 65%, что, по-видимому, связано со стадией развития желтых тел, в период которой простагландин не оказывает лютеолитического действия. Для преодоления этого фактора применяют 2-кратное введение препарата с интервалом в 10—12 дней между инъекциями. При 2-кратной обработке с 11-дневным интервалом проявляют признаки охоты до 90% телок. Особенно широко используется простагландин для синхронизации охоты у доноров и реципиентов при трансплантации эмбрионов. Охота у донора и реципиента должна приходиться на один и тот же день.

Синхронизация охоты у донора и реципиента должна быть такой, чтобы обеспечить максимум животных в охоте в течение 24-часового периода, при 2-кратной выборке с интервалом 12 ч и постоянном интервале между окончанием обработки и началом охоты.

Несмотря на относительно высокую эффективность метода, у некоторых животных наблюдается тихая охота. Тем не менее в настоящее время для синхронизации охоты у доноров и ре-

ципиентов в большинстве случаев используется только простагландин или его аналоги как наиболее результативные и несложные. При 2-кратной обработке охота обнаруживается у 85% животных через 48 ч и только у 5% — через 72 ч, остальные 5% животных в охоту не приходят длительное время. Применение простагландина эффективно при наличии в яичниках активного желтого тела и нормальной половой цикличности. В период анэструса лютеолитическое действие простагландина значительно снижается.

В связи со значительной вариабельностью результатов при использовании простагландина используют комбинированную схему обработки коров-доноров и телок-реципиентов. Вначале без учета фазы полового цикла всех отобранных животных обрабатывают прогестагеном и затем вводят простагландин.

Для снижения отрицательного влияния стадии полового цикла на эффект синхронизации охоты в конце применения прогестагена инъецируют ГСЖК и через 48 ч после этого вводят простагландин. Большинство животных (86,8%) при этой схеме обработки приходят в охоту в течение 60 ч.

Регуляцию функции воспроизведения у крупного рогатого скота затрудняют многие факторы. Главным из них является физиологическое состояние животных на день гормональной обработки. Например, анэструс без лактации и при наличии ее, проявление полового цикла у лактирующих и нелактирующих коров и др. Большое влияние на результаты синхронизации охоты у лактирующих животных в анэструсе оказывает предварительная их подготовка. Прогулки коров, дополнительное введение витаминов А и Е, микроэлементов позволяют получать высокие результаты.

Действие простагландина более эффективно у телок, чем у коров. Несколько хуже его действие у лактирующих коров в первые 40 дней после отела. Вызывание синхронной охоты с помощью простагландина представляет особую трудность у высокопродуктивных коров в состоянии анэструса.

После однократного введения простагландина не все телки, имевшие в яичниках желтые тела, проявляют признаки охоты. Около 13—15% животных не приходят в охоту. В некоторой степени причиной этому могут быть ошибки в определении возраста и качества желтых тел перед инъекцией простагландина. Возможно, у животных была недостаточная функциональная активность желтых тел. Более высокие показатели прихода телок в охоту получают при обработке их простагландинами в период с 11-го по 12-й день полового цикла. Обработка препаратами животных раньше и позже этого срока снижает процент прихода их в охоту. Применение простагландина раньше 10-го дня во всех случаях сопровождается снижением процента прихода телок в охоту.

При введении простагландина на 9-й день эстрального цикла число животных, пришедших в охоту, составляет около 80%, а на 8-й и 14-й — соответственно 69 и 64%. Обработка простагландином на 8-й и 14-й день полового цикла снижает результаты синхронизации охоты на 30—35%. Поэтому простагландин или его аналоги применяют для обработки телок на определенных стадиях полового цикла. Это дает возможность использовать такие препараты для синхронизации охоты у нормально циклирующих животных. Поскольку основную роль в механизме лютеолиза играет снижение концентрации рецепторов в яичнике в конце лютеальной фазы эстрального цикла, то простагландин оказывается в роли лютеолитического агента и его концентрация зависит от уровня эстрогенов и прогестерона.

Высокая концентрация прогестерона способствует высвобождению эндогенного простагландина. В период полового цикла повышение уровня эстрогенов соответствует интенсивному росту фолликулов. Первый пик повышения уровня эстрогенов совпадает с днем начала охоты, второй — с серединой полового цикла (10—12-й день). При втором подъеме уровня эстрогенов начинается секреция эстрогена, что связано с началом регрессии желтого тела и ростом овulatoryных фолликулов. Такой механизм обуславливает благоприятные условия синхронизации охоты и гормонального вызывания множественной овуляции при введении препаратов на 10—12-й день эстрального цикла.

Необходимо подчеркнуть, что обработка животных до 10-го дня цикла, даже при наличии хорошо выраженных желтых тел, не у всех животных обеспечивает их лютеолиз под действием простагландина.

Вероятно, внутрияичниковые механизмы, обеспечивающие переход от лютеотропного к лютеолитическому функциональному состоянию, создают условия устойчивости молодого желтого тела к действию эндогенного (маточного) и экзогенного простагландина. Считается доказанным, что морфологическая регрессия и спад активности желтого тела к концу полового цикла вызываются повышенным выделением маточного простагландина, действие которого усиливается синергическим влиянием яичниковых гистогенов и эстрогенов.

Предполагается, что происходит нарушение кровоснабжения желтого тела вследствие сосудосуживающего действия маточного простагландина и антагонизма в действии простагландина и ЛГ в рецепторах мембраны клеток гранулезы. При обработке простагландином раньше 10-го дня эстрального цикла рецепторы яичников значительно насыщены ЛГ предовуляторной концентрации, и только потенциальная убыль соединений ЛГ создает условия для проявления маточного действия экзогенного простагландина. В этом случае образуется прочное соединение ЛГ с рецепторами и желтые тела оказываются нечувствитель-

ными к экзогенному простагландину. Кроме того, подавляется секреция маточного эндогенного простагландина.

Снижение результатов синхронизации охоты у телок при обработке простагландином позже 12-го дня обуславливается, вероятно, «истощением» гипоталамо-гипофизарной системы у некоторых животных, а также неполноценностью желтых тел, которые выделяют недостаточно прогестерона для сенсibilизации гипоталамических центров к действию яичника.

Комплексное применение СЖК и простагландинов коровам-донорам с активным желтым телом в яичнике в период с 10-го по 12-й день полового цикла дает возможность четко синхронизировать охоту у значительной части обработанных животных в течение 48 ч. Применение простагландина для синхронизации охоты у телок-реципиентов с наличием желтых тел разного функционального состояния позволяет получать приемлемые результаты при обработке их с 10-го по 13-й день полового цикла. Обработка животных на 8-й и 14-й дни полового цикла дает низкие показатели синхронизации охоты у телок-реципиентов. Введение простагландина на 9, 10 и 13-й дни повышает индекс синхронизации охоты, но на более низком уровне, чем при обработке на 11-й и 12-й дни полового цикла.

ПОВТОРНЫЕ ГОРМОНАЛЬНЫЕ ОБРАБОТКИ КОРОВ-ДОНОРОВ

В экономическом отношении более эффективно использование коров в качестве доноров несколько раз в год. Однако при этом возникает вопрос о чувствительности яичников к повторным инъекциям гонадотропина, а также об устойчивости органов воспроизведения к многократному извлечению эмбрионов нехирургическим методом.

Применение биотехнического метода трансплантации эмбрионов увеличивает промежуток времени получения телят от доноров после гормональной обработки. Организму нужно определенное время для восстановления нормального полового цикла после суперовуляции. Кроме того, ограничивающим фактором могут быть накапливающиеся нарушения в половом тракте коровы при повторных обработках животных и извлечениях эмбрионов.

Наблюдаются незначительные различия в уровне суперовуляции при повторных гормональных обработках. У некоторых коров, не реагировавших на первую гормональную обработку, при повторных получают хорошие результаты суперовуляции.

Известны экспериментальные данные, когда животных с успехом обрабатывали СЖК до 5 раз в год с интервалом в 45—65 дней, включая первую охоту после обработки. При этом число овуляций у повторно обработанных коров достигает 9,4 по сравнению с 9,1 после первой гормональной обработки, яйце-

клеток и эмбрионов — соответственно 5,8 и 6. Однако индекс оплодотворяемости яйцеклеток после повторных обработок СЖК в 2 раза меньше (41 по сравнению с 82%), чем после первой обработки. Это указывает на то, что внутриовариальные, фолликулярные условия являются причиной снижения оплодотворяемости яйцеклеток после повторных обработок.

При первой обработке гонадотропином перегуливающие бесплодные коровы реагируют суперовуляцией до 85% со средним уровнем овуляции 8,9 на каждого положительного донора. Вторая обработка у некоторых животных (до 3%) сопровождается появлением кист в яичниках.

Наибольшее число неоплодотворенных яйцеклеток наблюдается у «проблемных» коров (до 40%), а также у коров после второй гормональной обработки (до 25%).

Причины разной оплодотворяемости пока неизвестны. По-видимому, они могут быть связаны с различными внешними факторами, гормональной обработкой, возрастом и лактационным статусом, содержанием и кормлением, дозой и качеством спермы, техническим исполнением искусственного осеменения, временем осеменения в период охоты.

Подлинную причину снижения оплодотворяемости яйцеклеток у многократно перегуливающих коров установить трудно, но определенные морфологические и биохимические дефекты, возникающие в процессе роста ооцитов, могут быть одной из причин отсутствия их оплодотворяемости после овуляции, а если они и оплодотворяются, то ухудшается качество эмбрионов при последующем развитии.

Неоплодотворяемость яйцеклеток обычно бывает у животных с частыми перегулами. Поэтому коров с нормальной оплодотворяемостью яйцеклеток целесообразнее использовать в качестве доноров эмбрионов.

Установлено, что СЖК вызывает в отдельных случаях нарушение эстрального цикла, а это ведет к повторным осеменениям и удлинению межотельного периода. В основном же процедура нехирургического извлечения эмбрионов представляет малый риск для последующей воспроизводительной способности высокопродуктивных коров.

ОСЕМЕНЕНИЕ КОРОВ-ДОНОРОВ

Организация искусственного осеменения животных-доноров с вызванной у них суперовуляцией не разработана.

Для осеменения коров-доноров используют замороженно-оттаянную сперму только хорошего качества и высокой оплодотворяющей способности. Процент спермиев с активным поступательным движением должен быть в дозе спермы не менее 50.

Установлено, что осеменение коров-доноров спермой высокой оплодотворяющей способности не влияет на число и процент извлеченных эмбрионов, хотя процент жизнеспособных эмбрионов всегда меньше у коров-доноров, осеменяемых спермой средней оплодотворяющей способности. Большая часть яйцеклеток оказывается неоплодотворенными после осеменения такой спермой. При осеменении коров в первый день охоты извлекают больше эмбрионов, чем при осеменении их на следующий день от начала охоты. Однако процент неоплодотворенных яйцеклеток всегда больше, если первое осеменение проводят только в первый день охоты. При этом разница приближается к достоверной величине.

Оплодотворяемость яйцеклеток повышается на 20% при осеменении коров-доноров спермой с содержанием в дозе 50—70 млн спермиев. Лучшие результаты оплодотворяемости яйцеклеток достигаются при 3-кратном осеменении в одну охоту. Увеличенное число спермиев в дозе спермы несколько повышает оплодотворяемость яйцеклеток. Число вводимых спермиев при осеменении животных-доноров с суперовуляцией имеет определенное значение, и этот фактор нельзя не учитывать при осеменении. Однако даже при хорошо выраженных признаках охоты, многократных осеменениях, увеличении числа спермиев в дозе спермы нельзя добиться высокой оплодотворяемости яйцеклеток при суперовуляции без предварительного отбора животных-доноров, контроля физиологического состояния органов их воспроизведения.

Для осеменения доноров применяют ректо- и маночервикальный способы введения спермы. При осеменении животных руководствуются Инструкцией по искусственному осеменению коров и телок. Осеменение доноров проводят стерильными инструментами одноразового использования. Наиболее предпочтителен ректоцервикальный способ, позволяющий контролировать состояние половых органов коров. В каждой дозе спермы должно быть не менее 50 млн подвижных спермиев. При применении глубокозамороженной спермы для осеменения одной коровы-донора используют две гранулы. Осеменение проводят дважды в день с интервалом в 10—12 ч на протяжении всей половой охоты (3—4 раза).

За сутки до вымывания эмбрионов проводят ректальный контроль реакции яичников на введение гонадотропина. При этом ограничивают до минимума все манипуляции с маткой и яичниками. Непосредственно перед нехирургическим вымыванием проводят подсчет желтых тел и неовулировавших фолликулов. Если при хирургическом извлечении эмбрионов определить уровень суперовуляции легко (визуально), то при нехирургическом — затруднительно. Полноценное желтое тело при ректальной пальпации представляет собой «грибок», твердый на ощупь,

а неовулировавшие фолликулы — флюктуируют и не так резко выступают над яичником. Ошибка при ректальном подсчете числа желтых тел (овуляций) может быть в пределах 10—15%, особенно при высоком уровне овуляции (15 и выше), когда яичники увеличены в своей массе в десятки раз.

ГОРМОНАЛЬНОЕ ВЫЗЫВАНИЕ СУПЕРОВУЛЯЦИИ У ОВЕЦ

В большинстве случаев суперовуляцию у овец вызывают инъекцией гонадотропина СЖК в сочетании с простагландином на 11—12-й день эстрального цикла. Кроме СЖК, для этого используют экстракты из гипофиза овец.

У овец большинства пород сезонный характер размножения. Поэтому основная работа по трансплантации эмбрионов приурочивается к этому периоду. Для гормонального вызывания суперовуляции отбирают овец с естественным эстральным циклом при 2-кратной выборке (утром и вечером) с использованием активных баранов-пробников. Гормональную обработку овец начинают с 11-го дня эстрального цикла. Широкое применение получили следующие схемы гормонального вызывания суперовуляции у овец: на 11-й день эстрального цикла инъектируют гонадотропин СЖК внутримышечно в дозе 1000—1200 МЕ и через 48 ч — простагландин в дозе 250 мкг.

После введения простагландина у животных через 48 ч проявляется четко выраженная охота. Овец с наличием охоты покрывают подобранным бараном-производителем 3—4 раза (двойные садки за одно покрытие) с интервалом в 10—12 ч между покрытиями. На 5-й день после начала охоты (наличие рефлекса неподвижности) извлекают эмбрионы. Первый день охоты принимают за нулевой.

В случной сезон овцы с естественным эстральным циклом перед гормональной обработкой обычно все (100%) приходят в охоту после введения СЖК и простагландина и реагируют суперовуляцией. Среднее число овуляций составляет около 10 на каждого обработанного донора при лимите от 3 до 36 овуляций. Нормальные эмбрионы получают у 70% животных при лимите от 4 до 24. В среднем на одного положительного донора число нормальных эмбрионов составляет 8,4 при незначительном числе дегенерированных эмбрионов (4,5%) и неоплодотворенных яйцеклеток (6,2%). Оплодотворяемость яйцеклеток при этой технологии осеменения составляет 94%.

Между числом овуляций и извлекаемых эмбрионов имеется прямая зависимость. Так, от овец с числом овуляций от 4 до 10 можно получить в среднем по 4,7 эмбриона, с числом овуляций от 11 до 19 — 11, с числом овуляций 36 — до 24. С увеличением числа овуляций несколько снижается оплодотворяемость яйцеклеток. Так, при числе овуляций от 4 до 10 и от 11 до 13 опло-

дотворяемость яйцеклеток составляет 100%, от 14 до 19 овуляций — 91,6% и от 19 до 36 — 84,6%. От числа овуляций зависит количество нормальных эмбрионов (89,4; 90; 87,5 и 76,9%) соответственно указанному выше (С. А. Мазепкин и др., 1983). Имеющиеся различия в реакции яичников на гонадотропин, оплодотворяемости яйцеклеток, в числе нормальных эмбрионов, вероятно, в основном обусловлены индивидуальными особенностями животных. Указанная схема может быть рекомендована для вызывания суперовуляции у овец-доноров в случной сезон.

Аналогичные результаты можно получить у овец в случной сезон при использовании ФСГ из гипофиза лошадей, крупного рогатого скота, овец и свиней. При этом применяют те же схемы, что и у коров (5- или 4-дневное введение препарата). Доза ФСГ — 25 мг, простагландин — 250 мкг. Из-за большой трудоемкости и высокой себестоимости препарата ФСГ эта схема вызывания суперовуляции у овец применяется реже, чем у коров.

Суперовуляция у овец может быть индуцирована СЖК в неслучной сезон (анэструс) после предварительной обработки животных прогестагенами. В анэстральный период самое трудное — вызывать охоту у овец-доноров. Были попытки вызвать охоту введением СЖК в дозе 1000 МЕ. Однократная инъекция СЖК вызвала охоту у 60% овец. Однако у подавляющего числа животных не было зарегистрировано овуляции.

На результаты гормонального воздействия существенно влияет сезон года. При одинаковой обработке прогестероном (76% против 48) летом заметно больше овец приходят в охоту, чем весной.

Следующий метод вызывания охоты у овец — применение внутривагинальных pessaries. Это мелкопористые полиуретановые губки, пропитанные этаноловым или пропиленгликолем раствором прогестагенов (прогестерон, кронолон и др.). Pessaries, пропитанные 500 мг прогестерона или 30 мг кронолона, оставляют во влагалище на 16 дней. В первом случае охота наступает у 67% овец, во втором — у 79%.

Овец-доноров с синхронизированной охотой обрабатывают для вызывания суперовуляции гормонами по приведенной схеме. В анэстральный период у овец-доноров с предварительно синхронизированной охотой результаты суперовуляции в 2 раза ниже (от 0 до 12 овуляций на донора). Оплодотворяемость яйцеклеток составляет в среднем 40% (от 0 до 57%), выход нормальных эмбрионов — 4,6 на обработанного донора.

В фолликулярную фазу секреция эстрогенов повышается с увеличением размера фолликула при постоянной интенсивности секреции гипофизарных гормонов. Это противоречие может быть объяснено изменением концентрации рецепторов гонадотропных гормонов. Потеря развивающимся фолликулом чув-

ствительности на гонадотропин прерывает его дальнейшее развитие. Этим, по-видимому, объясняется отсутствие овуляции у некоторых животных с множественным ростом фолликулов. Рост ооцитов начинается с образования вторичных ооцитов и протекает параллельно с ростом фолликула до определенной стадии. В последующем размер ооцитов остается постоянным, несмотря на дальнейшее увеличение объема фолликула, что связано с наличием в фолликулярной жидкости мейозотормозящего фактора.

Полагают, что под влиянием ЛГ понижается активность мейозотормозящего фактора, и по мере созревания фолликула и перед овуляторным пиком ЛГ его активность полностью исчезает и наступает мейоз, что положено в основу механизма стимулирования роста ооцитов в атрезированных фолликулах при гормональном вызывании полиовуляции. Ооциты после пика ЛГ остаются в фолликуле до полного физиологического созревания в течение 6—8 ч. Яйцеклетки, овулировавшие раньше этого срока, не оплодотворяются. Подобное явление наблюдается у большинства животных с множественной овуляцией.

Во время всего полового цикла проявляются очень тесные и многообразные взаимосвязи между гонадотропинами гипофиза, гормонами яичников и простагландинами внутри яичника, которые составляют существенные элементы нейрогуморальной регуляции полового цикла.

Исходя из этого, яичниковые экзогенные гормоны в рамках биотехнических мероприятий будут вызывать различные изменения в развитии фолликулов и желтых тел. Однако влияние их не должно оказывать отрицательного действия на сложный процесс внутрияичниковой регуляции при синхронизации охоты и вызывании множественной овуляции с использованием различных гормональных препаратов.

При вызывании суперовуляции у овец в анэстральный период инъецируют минимум три гормональных препарата, что отрицательно сказывается на результатах гормональных обработок и еще в большей степени увеличивает вариабельность проявления множественной овуляции в яичниках, индуцированных гонадотропином.

ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ГОРМОНАЛЬНОГО ВЫЗЫВАНИЯ СУПЕРОВУЛЯЦИИ И ОПЛОДОТВОРЯЕМОСТЬ ЯЙЦЕКЛЕТОК

Коровы-доноры с множественной овуляцией, у которых в яичниках были зарегистрированы только желтые тела и отсутствовали неовулировавшие фолликулы, по сравнению с коровами, имеющими в яичниках и неовулировавшие фолликулы, отличаются наличием большого числа эмбрионов с дегенеративными изменениями (75,8% против 24,2%). Это, вероятно, свя-

зано с уровнем прогестерона в крови коров-доноров. Чем больше его в молоке на 4—6-й день после осеменения, тем выше уровень дегенерации клеток.

По-видимому, у суперовулировавших животных создаются неблагоприятные условия маточной среды, оказывающие сильное влияние на качество зародышей при выходе их из яйцевода в матку. Качество зародышей находится в прямой зависимости от дозы гонадотропина.

Стадия лактации коровы (менее 90 дней после отела и более 90 дней) не влияет на число овуляций, уровень извлечения или жизнеспособность зародышей. Чем лучше общее состояние животного, тем больше число жизнеспособных зародышей. Лактирующие коровы имеют овуляторную реакцию ниже, чем нелактирующие.

При специальном отборе коров-доноров получают значительно больше (до 87%) эмбрионов, пригодных для пересадки, от числа овуляций. Установлена прямая связь оплодотворяемости яйцеклеток с серией гонадотропина СЖК. Процент оплодотворяемости яйцеклеток при использовании разных серий СЖК варьирует (от 8 до 94%). Причины этой связи пока не установлены.

Овуляторная реакция при введении СЖК на 9—12-й день эстрального цикла достоверно не различается. Однако при обработке животных на 9-й день цикла снижается число овуляций и повышается коэффициент изменчивости. Введение гонадотропина на 14-й день дает низкие результаты с резким падением числа овуляций.

Наблюдается определенная зависимость индекса множественной овуляции от сезона года. При гормональной обработке животных-доноров летом и осенью процент реагирующих животных суперовуляцией выше, чем весной и зимой (соответственно 87,9 и 93,6% по сравнению с 79,8 и 81,9%). Число неовулировавших фолликулов меньше летом и осенью (1,45—2,2%), чем весной и зимой (20,4 и 22,1%), соответственно от общего числа индуцированных к росту фолликулов. Среднее число овуляций в зимне-весенний период составляет 6,9 и 6,6 на каждого обработанного донора. Вариабельность по числу неовулировавших фолликулов бывает значительной во все сезоны года, что свидетельствует о большом проявлении индивидуальных особенностей животными независимо от сезона года.

Сезон года не имеет существенной связи с числом эмбрионов. Среднее число извлекаемых зародышей на одного оперированного донора практически одинаково и в среднем весной составляет 5,1, летом — 5, осенью — 4,9 и зимой — 4,3. Однако нормальных эмбрионов у животных, обработанных осенью, всегда больше, а число неоплодотворенных яйцеклеток меньше, чем у животных, обработанных в другие сезоны года.

На эффективность гормональной обработки оказывают определенное влияние и другие факторы — возраст, уровень кормления, условия содержания, лактационный статус, всевозможные стрессы и др. Трудно подобрать даже двух идентичных животных, у которых влияние перечисленных факторов было бы аналогичным. Многие факторы, влияющие на уровень множественной овуляции, еще не установлены.

ПОЛУЧЕНИЕ ЭМБРИОНОВ У КОРОВ, ОВЕЦ И СВИНЕЙ

Извлечение яйцеклеток и эмбрионов у животных-доноров — одна из важнейших составных частей общей технологии трансплантации эмбрионов, которая требует тщательного и безошибочного осуществления.

Техника получения эмбрионов у животных одних видов отличается от техники извлечения их у животных других видов. Однако при этом цель одна — получить максимальное число зародышей и обеспечить сохранение их жизнеспособности до пересадки.

Широкие исследования по разработке методов извлечения эмбрионов были начаты после того, как Хартману в 1931 г. удалось впервые извлечь жизнеспособные эмбрионы из яйцеводов убитой коровы.

На первых этапах разработки метода трансплантации эмбрионы получали после убоя животных. Разрабатывались способы и прижизненного извлечения эмбрионов путем промывания рогов матки с помощью различных приспособлений. Применяемые способы получения зародышей отличались друг от друга по числу получаемых зародышей. В обоих случаях извлекают довольно высокий процент яйцеклеток и эмбрионов (71,4) от числа овуляций. Однако при этом наблюдается высокая вариабельность в числе извлекаемых эмбрионов по каждому животному.

В мясном скотоводстве и в настоящее время получение эмбрионов после убоя животных имеет широкое распространение. При этом в среднем на каждого донора получают по 10,1 зародыша. Из них 56,5% — нормальные, 17,9% — отставшие в развитии и 25,6% — дегенерированные и неоплодотворенные яйцеклетки. В итоге пригодных для пересадки зарегистрировано в среднем по 5,3 эмбриона на каждого донора (J. M. Gordon, 1979). Такой способ получения эмбрионов от животных, предназначенных на мясо, — самый дешевый и экономически выгодный.

На протяжении многих лет разрабатывается наиболее приемлемая техника извлечения эмбрионов для получения двоен у мясного скота. В качестве доноров используют мясных телок,

которых убивают после гормонального вызывания полиовуляции и осеменения на 8—9-й день. Стельность двойнями наблюдается у 70% коров-реципиентов.

ХИРУРГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИЗВЛЕЧЕНИЯ ЭМБРИОНОВ

В начале 70-х годов наибольшее распространение получила хирургическая техника извлечения зародышей. При этом использовали способ лапаротомии по белой линии живота под общим наркозом с промыванием рогов матки в положении животного лежа на спине.

При использовании хирургического метода вентральной лапаротомии лучше эмбрионы вымывать из матки, то есть с 4-го дня после овуляции. На 5-й и 6-й день после осеменения большинство зародышей находятся в верхней трети рога матки.

В среднем на одного донора при применении вентральной лапаротомии получают 4,5 эмбриона, при повторных операциях — 3,9 и от отдельных доноров после третьей — 3,2. Доноры сохраняют нормальную воспроизводительную функцию после одной или двух операций, и она заметно снижается после трех и более вымываний. Однако имеются сведения, когда 3-кратное хирургическое извлечение зародышей у телок-доноров не оказало существенного влияния на их последующую репродуктивную функцию. У коров-доноров хорошие результаты извлечения хирургическим методом бывают в том случае, если эмбрионы извлекают на 7-й день. При первой хирургической операции получено в среднем по 11,2 зародыша на каждого донора, при второй — по 9,2, при третьей — по 8,2 и при четвертой — по 5,4, что в целом составило 66 и 82% от общего числа овуляций (Н. И. Сергеев, 1980).

Снижение эффективности повторных извлечений при использовании хирургической техники вентральной лапаротомии в основном объясняется снижением уровня полиовуляции и повреждением половых путей во время операции. Вероятно, хирургическим методом можно получать эмбрионы не более 2 раз.

На первом этапе использования хирургической техники промывную жидкость собирали катетером Фолли, что давало возможность извлекать 51,3% зародышей от общего числа овуляций, или в среднем 7,8 эмбриона на одного донора. Затем были внесены в хирургическую технику небольшие изменения. Для оттока промывной жидкости стали применять резиновый, а также латексный урологический катетер с надувной манжеткой, позволяющий одновременно промывать яйцеводы и матку.

На эффективность извлечения эмбрионов при хирургическом методе оказывает существенное влияние направление тока промывной жидкости. Вымывание эмбрионов направлением тока жидкости в сторону ампулярной части яйцевода оказалось не-

эффективным, особенно у крупного рогатого скота. Этот прием используют для получения ранних эмбрионов у овец.

Несколько лучшие результаты извлечения зародышей получают при промывании рогов матки через ампульную часть яйцевода с направлением тока жидкости в сторону шейки матки (36,6%). Наиболее результативным оказался прием промывания от верхушки рога матки в сторону шейки матки (87%).

При хирургическом извлечении эмбрионов у коров через разрез по белой линии живота возникают затруднения. У животных с сильно развитой молочной железой трудно подтягивать рога матки в просвет разреза, и особенно яичники с ампульной частью яйцеводов. Манипулировать с рогами матки при вымывании эмбрионов необходимо очень осторожно, особенно при их фиксации. Частично эти затруднения снимаются фиксированием рогов матки в просвете разреза путем наложения либо широкой лигатуры, либо специального зажима у бифуркации рогов матки.

Все технические приемы по промыванию рогов матки прямо влияют на конечный результат.

При хирургическом извлечении возникают и физиологические осложнения. Так, уровень извлечения эмбрионов тесно связан с индексом множественной овуляции. Процент извлеченных зародышей всегда меньше при низком уровне овуляции, чем при высоком. Количество дегенерированных эмбрионов и неовулировавших фолликулов при высоком индексе полиовуляции больше, чем при низком. Число полноценных эмбрионов при извлечении их в более поздние сроки (на 8—9-й день) заметно снижается. Потери яйцеклеток могут происходить вследствие преждевременной овуляции и более раннего попадания зародышей в матку. При значительном числе овуляций яичник в несколько раз увеличивается в объеме. В этих условиях не все яйцеклетки захватываются бахромкой яйцеводов, и часть из них может попадать в брюшную полость.

Хирургическая техника получения эмбрионов, как правило, не сопровождается какими-либо осложнениями. Однако у 10% коров и телок-доноров снижается плодовитость, а при повторных операциях примерно 10% животных-доноров оказываются бесплодными из-за воспаления эндометрия матки и яйцеводов.

Используют три основных оперативных метода, обеспечивающих доступ к внутренним половым органам:

- 1) через разрез верхнего свода влагалища с использованием специального прибора (эффеминатора) и без него;
- 2) лапаротомия по белой линии живота с применением общего наркоза;
- 3) лапаротомия в области голодной ямки с использованием местной анестезии.

Наиболее распространены второй и третий способы (лапаротомия). Оперативный способ вымывания эмбрионов через

разрез верхнего свода влагалища может быть применен однократно у донора, предназначенного на мясо.

Сущность этого метода заключается в следующем: перениальную область тела животного тщательно моют мыльным раствором и дезинфицируют 70%-ным этанолом, затем инъецируют внутримышечно 0,7 мл рампуна и эпидурально 5 мл 2%-го раствора новокаина. Через 5—7 мин после инъекции препаратов фиксируют хвост и орошают внутреннюю часть влагалища 2%-ным раствором диоксида (200—250 мл на одно орошение). Подготовленную руку вводят во влагалище и скальпелем делают перфорацию верхнего его свода. Во избежание травм при введении во влагалище скальпель зажимают пальцами и прикрывают сжатой ладонью. Разрез свода влагалища делают дорсально от шейки матки и несколько сбоку (на 1—2 см). Длина разреза не должна превышать 2—3 см. В разрез вводят сначала два пальца, а затем — поочередно остальные до тех пор, пока рука не проникнет в брюшную полость. Специальной тупой иглой прокалывают у бифуркации один из рогов матки. В отверстие вводят двухходовой резиновый уретральный катетер с надувным баллончиком. Затем в манжету подают воздух и делают промывание.

После промывания одного рога матки аналогично промывают второй. На промывание одного рога затрачивается 10—15 мин. Этот способ перспективен при однократном использовании выбракованных коров в качестве доноров эмбрионов.

Можно получить до 67% зародышей от общего числа овуляций, или в среднем 5,1 эмбриона на оперированного донора.

Частичную гистерэктомию осуществляют на животном в положении стоя через разрез верхнего свода влагалища. Перениальную область дезинфицируют, влагалище промывают и верхний свод влагалища разрезают так же, как и при первом способе извлечения эмбрионов.

Рукой охватывают головку эффеминатора и медленно вводят через влагалище и разрез в брюшную полость. Захватывают рукой яичник и яйцевод, брыжейку яичника и один рог матки до бифуркации, открывают эффеминатор и вкладывают органы в головку прибора. Легким натяжением на себя прибор закрывают и проверяют правильность расположения отсекаемых участков (яичники, яйцевод и рог матки) выше зажима.

После этого, быстро завинчивая барашковую часть гайки, отделяют отобранные участки половых органов. Рукой зажимают отверстие отделившегося участка рога матки и удаляют из брюшной полости, просвет рога закрывают кровоостанавливающим зажимом, контролируют целостность удаленных частей, подсчитывают число желтых тел и неовулировавших фолликулов. Точно такие же манипуляции осуществляют при удалении второго рога матки.

Каждый удаленный рог матки передают в стерильный бокс для промывания, а эффеминатор оставляют закрытым на 5 мин и затем снимают. По окончании операции через разрез влагалища в брюшную полость вводят смесь антибиотиков (пенициллин и стрептомицин) по 500 тыс. ед. в 50 мл 0,5%-ного раствора новокаина и 50 г растворимого стрептоцида в порошке. Оперированные животные находятся под наблюдением в течение восьми дней.

Яйцеводы и рога матки в стерильном боксе дважды промывают средой в количестве 20 мл в направлении от яйцевода к матке при строгом соблюдении стерильности. Промывную жидкость собирают в стерильный сосуд объемом до 100 мл.

С помощью этого способа можно извлечь до 75% зародышей от общего числа овуляций, или в среднем 6,7 эмбриона на оперированного донора.

При втором способе хирургического извлечения эмбрионов делают разрез брюшной стенки по белой линии. Доноров-коров и телок предварительно выдерживают 36—48 ч до операции на голодной диете. Премидикацию выполняют введением внутримышечно 2 мл рампуна или 4 мл комбелена, затем животное фиксируют на специальном операционном столе и дают общий наркоз внутривенным введением 10%-ного раствора хлоралгидрата из расчета 100 мл на 100 кг живой массы. Операционное поле обмывают, удаляют шерсть, кожу дезинфицируют 70%-ным этанолом и затем 10%-ной настойкой йода.

По белой линии, непосредственно возле верхнего края таза, делают разрез длиной до 15 см, через который осторожно извлекают рога матки и яичники с яйцеводами. Гениталии фиксируют широкой лигатурой, осматривают и подсчитывают число желтых тел в яичниках.

В одном из рогов матки делают прокол у бифуркации, через который вставляют катетер. Используют гибкие 2-канальные пластмассовые или резиновые катетеры с надувным баллончиком (рис. 7). Применяют два варианта промывания: 1) маточное, при котором тупую иглу с оливой вставляют в верхушку рога матки и через нее подают шприцем промывную жидкость в направлении к бифуркации; 2) маточно-трубное, при котором в ампульную часть яйцевода вставляют тонкую иглу с эластичным шлангом и шприцем нагнетают жидкость (рис. 8). На промывание каждого рога матки расходуется 100—140 мл среды Дюльбекко. Промывную жидкость собирают в стерильные пробирки емкостью 140—150 мл. При этом способе эффективность извлечения зародышей достигает 87%, или в среднем 5,8 эмбриона на донора.

Маточно-трубное промывание рогов матки в модификации ВИЖа в отдельных случаях обеспечивает 100%-ное извлечение зародышей.

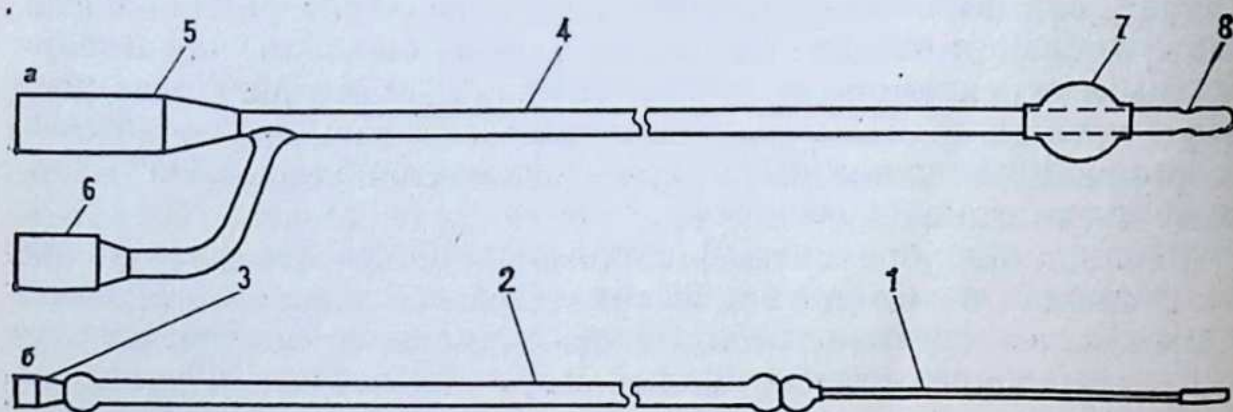


Рис. 7. Устройство для хирургического извлечения эмбрионов:

a — двухканальный катетер; *б* — приспособление для введения промывной жидкости; 1 — игла с оплавленным концом; 2 — латексная трубка; 3 — переходник для соединения со шприцем; 4 — трубка катетера; 5 — расширенный проксимальный конец катетера; 6 — клапан для нагнетания воздуха в баллончик; 7 — баллончик для воздуха; 8 — дистальный рабочий конец катетера с двумя отверстиями

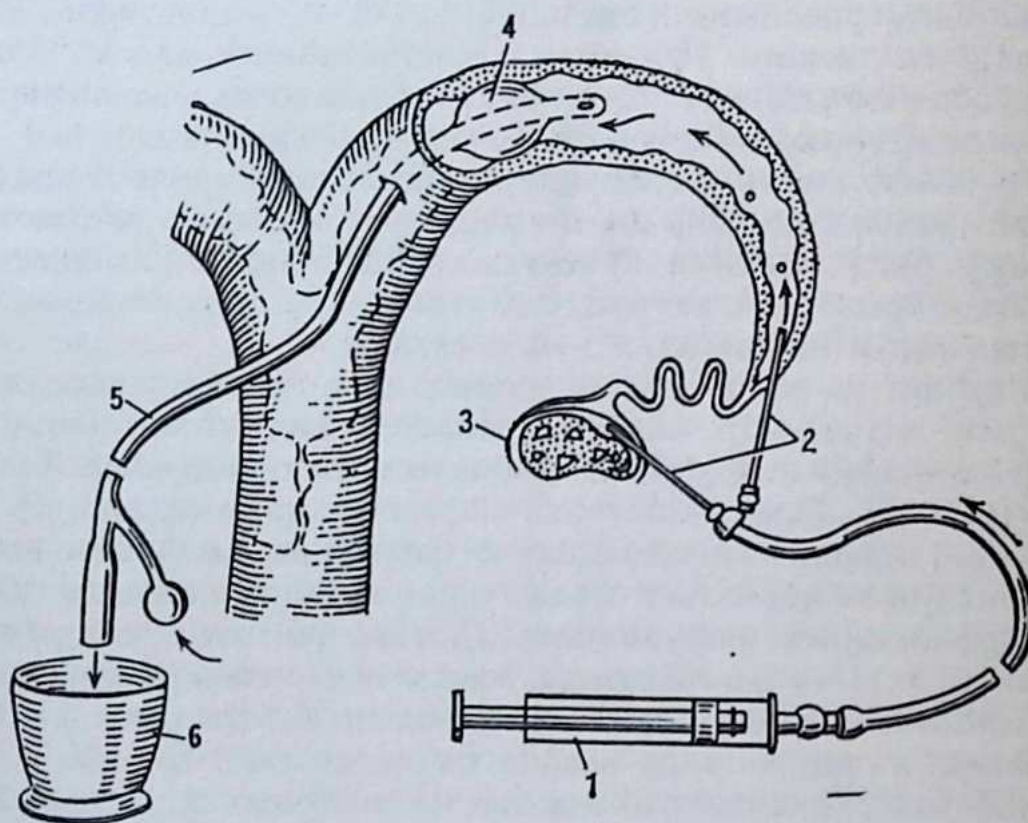


Рис. 8. Схема промывания рогов матки хирургическим методом:

1 — шприц с пластиковым шлангом на 20 мл; 2 — тупая игла; 3 — ампульная часть яйцевода; 4 — баллончик катетера; 5 — катетер; 6 — емкость для сбора промывной среды

У коров-доноров одноразового использования эмбрионы можно извлекать по третьему способу — через разрез брюшной стенки в области голодной (люмбальной) ямки справа или слева. Данный способ ограничивается применением 2%-ного раствора рампуна в дозе 0,7 мл внутримышечно, 2%-ного раствора новокаина в дозе 5 мл сакрально и 2%-ного раствора новокаина в дозе 140 мл по линии разреза инфильтрационно. Операцию выполняют на животном в положении стоя. Делают вертикальный разрез кожи длиной около 15 см несколько впереди коленного сустава с последующим рассечением остальных тканей брюшной стенки. При этом наружную косую мышцу рассекают скальпелем по ходу мышечных волокон, внутреннюю мышцу расслаивают рукой. Брюшину захватывают кровоостанавливающим зажимом, выводят в просвет разреза и надсекают ножницами (1—2 см), а затем раздвигают рукой до нужного размера.

После этого подсчитывают число овуляций и неовулировавших фолликулов, подтягивают в просвет разреза за основание рога матки, делают прокол стенки рога матки у основания, через который вставляют двухходовой катетер и проводят промывание так же, как и через ventральный разрез брюшной стенки. При этом способе удается извлечь более 60% зародышей от общего числа овуляций.

Промывание рога матки, удаленного от разреза в области голодной ямки затруднено — неудобно его подтягивать и фиксировать в просвете разреза. У телок такой метод извлечения эмбрионов малоприменим из-за небольших размеров рогов матки. У овец и свиней эмбрионы извлекают только методом ventральной лапаротомии. Техника вымывания эмбрионов аналогичная.

Несмотря на относительную простоту хирургической техники получения эмбрионов, необходима достаточно высокая квалификация хирурга, а сама операция должна проводиться в операционном зале с применением современного оборудования и средств асептики.

Преодоление некоторых технических и физиологических ограничений, связанных с хирургической техникой, привело к широкому развитию нехирургических методов получения эмбрионов. В настоящее время метод бескровного получения эмбрионов у крупного рогатого скота получил широкое распространение.

НЕХИРУРГИЧЕСКАЯ ТЕХНИКА ПОЛУЧЕНИЯ ЭМБРИОНОВ У КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Первые сообщения об успешном применении нехирургического метода извлечения эмбрионов у коров-доноров относятся к 1949 г. Вначале результаты по сравнению с хирургическим

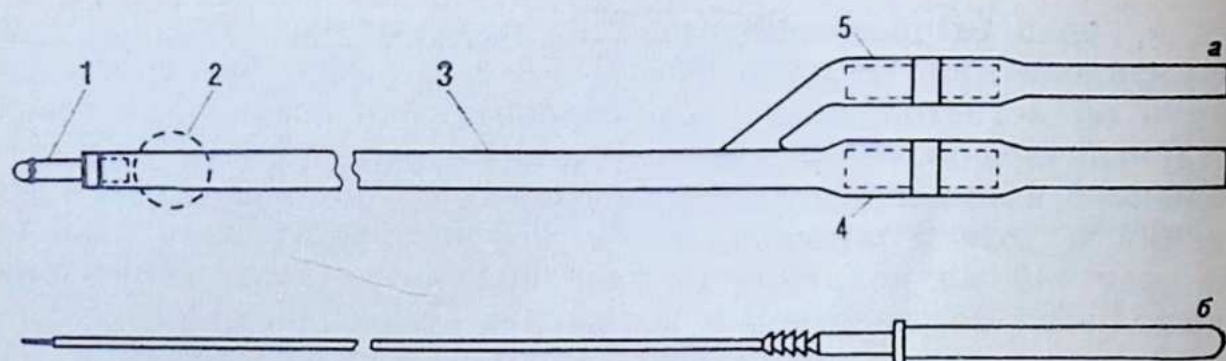


Рис. 9. Катетер Ламптера для нехирургического извлечения эмбрионов:
 а — катетер; б — металлический стилет с ручкой; 1 — металлическая канюля съемная с четырьмя отверстиями; 2 — баллончик для воздуха; 3 — латексная трубка; 4 — проксимальный конец катетера с переходником и удлиненной трубкой; 5 — клапан для нагнетания воздуха в баллончик

методом были значительно хуже. В последующем для этой цели были усовершенствованы старые и разработаны новые инструменты.

Был сконструирован жесткий металлический катетер из нержавеющей стали с внешним диаметром 4 мм и внутренним диаметром 2 мм, длиной 50 см, с надувным баллончиком на конце катетера. Такая конструкция катетера обеспечивала 100%-ное прохождение канала шейки матки у коров, а также у крупных телок. Процент извлечения зародышей от числа овуляций составил 56,4, или в среднем по 6,5 эмбриона на каждого донора.

Биотехнический метод бескровного получения эмбрионов должен быть простым и надежным, позволяющим с высоким результатом получать эмбрионы в условиях ферм. Был предложен каучуковый 2-канальный катетер длиной 52 см с отверстиями для введения и вывода жидкости. Катетер имеет металлический наконечник с четырьмя отверстиями и шаровидным окончанием, что обеспечивает более легкое прохождение канала шейки матки и уменьшает травмирование ее слизистой. Для придания жесткости в полость катетера вставляют металлический упругий стилет (рис. 9). Такая конструкция прибора дает возможность получать до 7 эмбрионов на донора с хорошей суперовуляцией, или 63% от числа овуляций.

По мнению большинства исследователей и практиков, наиболее удобны резиновые катетеры. Они дают возможность получать от 4 до 6 эмбрионов, пригодных к пересадке. Однако такие катетеры иногда трудно проходят через цервикальный канал. Даже после прохождения шейки матки встречаются затруднения в проведении его глубоко в рог матки и контроле состояния баллончика. Тем не менее у резиновых катетеров имеются определенные преимущества по сравнению с жесткими металлическими. При их использовании снижается вероятность повреждения эндометрия. Жесткий катетер срав-

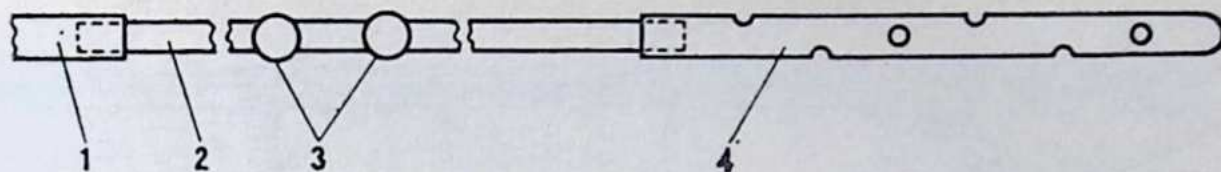


Рис. 10. Катетер Прокофьева:

1 — латексная трубка; 2 — металлическая трубка; 3 — пугочные утолщения для фиксации катетера в шейке матки; 4 — съемный пластмассовый наконечник с несколькими отверстиями

нительно легко проникает в канал шейки матки, но и может повредить эндометрий. При этом в промывную среду попадает кровь, что затрудняет поиск эмбрионов.

В 1980 г. был модифицирован металлический жесткий катетер, который состоит из трубки из нержавеющей стали и съемного гибкого наконечника из пластика с несколькими отверстиями. Жесткая трубка имеет два пугочных утолщения для фиксации трубки в канале шейки матки. Для придания жесткости съемному пластиковому наконечнику вовнутрь трубки вводят упругий стальной стилет (рис. 10).

Такая конструкция катетера обеспечивает удаление введенной среды из рогов матки на 93—96%, а извлечение эмбрионов — на 56,6% от числа овуляций и получение в среднем 6,2 зародыша на донора. Недостаток катетера — отсутствие надувного баллончика, фиксирующего вытекание промывной среды через канал шейки матки. Поэтому оператору приходится постоянно пережимать рукой основание рога матки во время промывания, а это не всегда удается, особенно у коров с высокой ригидностью ректального канала.

Наиболее подходящий по конструкции оказался прибор, состоящий из металлического цилиндра диаметром 5 мм и длиной 49,5 см. Вовнутрь цилиндра с помощью специального крючка проводят катетер Фолли № 14, в верхушке которого сделано 2 отверстия. В верхушку катетера вставляют открытую металлическую упругую спираль диаметром 2,5 мм и длиной 5,5—6 см. К наружному концу катетера Фолли прикрепляют три конца пластиковых трубок с двумя двухходовыми краниками для регулирования введения и оттока промывной жидкости. Для придания верхушке катетера упругости вставляют жесткий металлический стилет. Упругая спираль предохраняет от проникновения стилета через боковые отверстия верхушки катетера и стабилизирует рабочую часть верхушки после удаления стилета. Общая длина прибора — 60 см (рис. 11).

После расположения катетера в роге матки стилет удаляют и в баллон нагнетают воздух, к катетеру присоединяют систему шлангов с двумя 60-миллиметровыми шприцами. Один из них предназначен для нагнетания, второй — для отсасывания промывной жидкости.

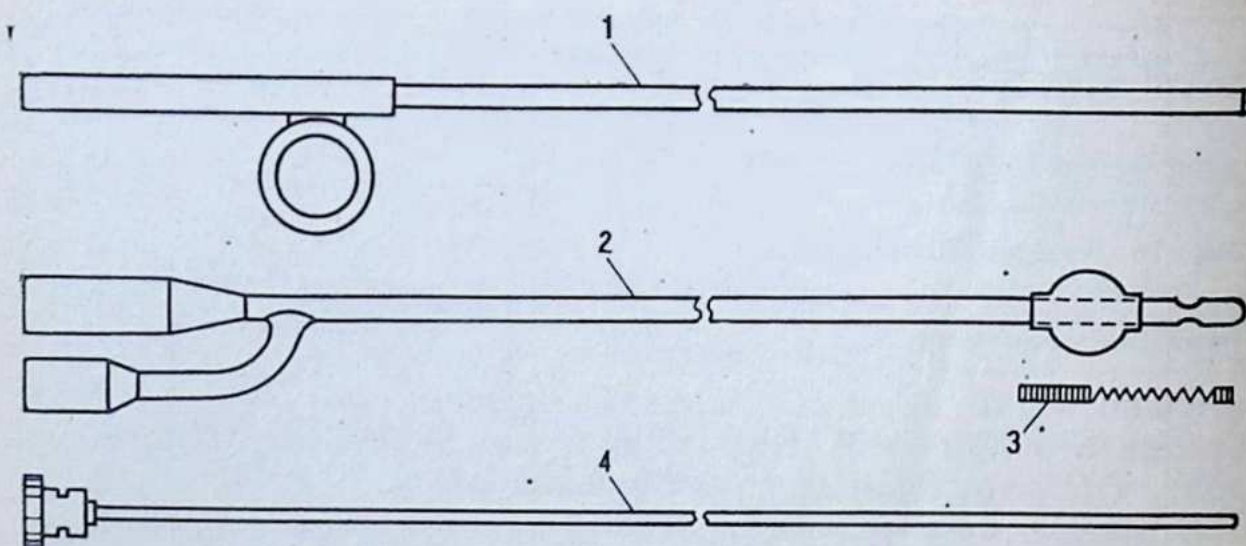


Рис. 11. Катетер Расбега:

1 — металлическая трубка; 2 — катетер Фоллея № 4; 3 — стальная пружинка; 4 — металлический стилет

Сбор промывной жидкости с помощью этого прибора составляет 92%, извлечение эмбрионов и яйцеклеток — до 69% от общего числа овуляций. Лучшие результаты получены при извлечении эмбрионов на 8-й день с начала охоты (76%) и несколько хуже — на 6-й и 10-й день (54 и 43% соответственно). В среднем этим прибором извлекают по 6,3 эмбриона на донора с вариациями от 0 до 29. Такая вариабельность связана прежде всего с навыком оператора и днем извлечения эмбрионов после первого осеменения. Так, на 6-й день извлекают 54% эмбрионов, на 7-й — 74, на 8-й — 76 и на 10-й — 43% от общего числа овуляций.

Нагнетание и удаление промывной жидкости с помощью шприца облегчают процедуру промывания. Фракционное промывание рогов матки обеспечивает извлечение около 69% эмбрионов от числа овуляций. Процедуру фракционного промывания рогов матки повторяют до 10—15 раз. Процент извлечения после первых пяти вымываний составляет 57, после восьми — 62. Выяснено, что уровень извлечения эмбрионов не зависит от числа предыдущих вымываний. Основная масса зародышей находится в первых трех фракциях промываний среды, но это при условии четкого выполнения всей процедуры промывания рогов матки. Даже при малых затруднениях возникает необходимость повторять процедуру фракционного промывания до 15 раз.

В настоящее время для вымывания эмбрионов из рогов матки широко используют 2-канальные катетеры из резины или эластичной полихлорвиниловой пластмассы (рис. 12). Они состоят из трубки 1, конец ее (рабочая часть) имеет надувной баллончик 2 и шесть отверстий 3, расположенных друг от друга на разных расстояниях, обеспечивающих оптимальную поверх-

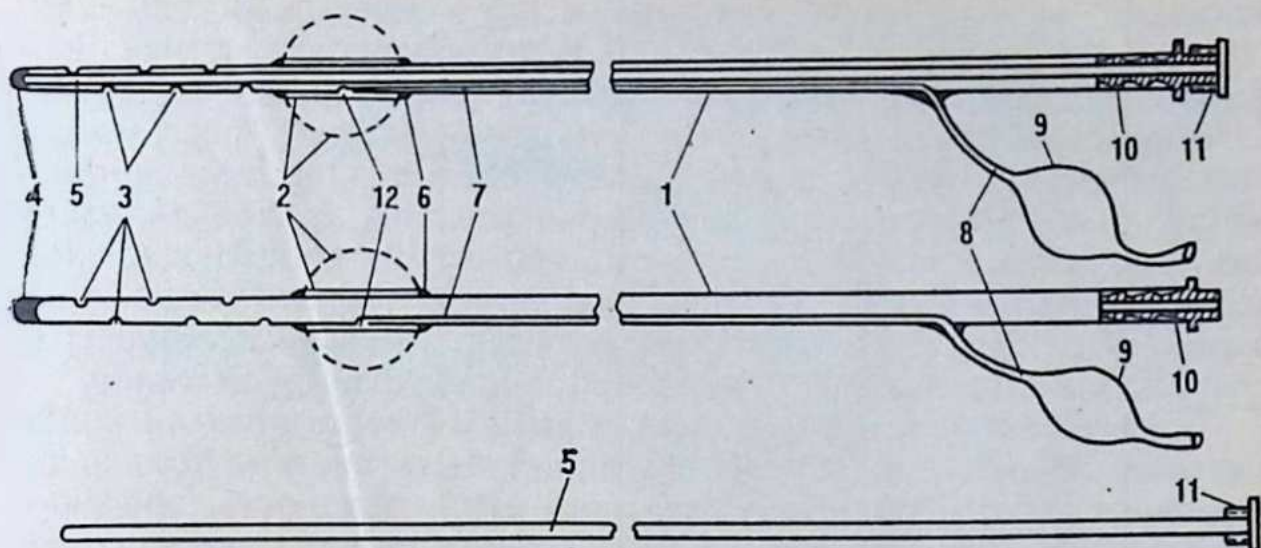


Рис. 12. Катетер Сергеева и Никояна:

1 — резиновая трубка; 2 — баллончик; 3 — отверстия рабочей части катетера; 4 — уплотнитель дистального конца катетера; 5 — канал для фиксации конца стилета; 6 — припайка концов баллончика; 7 — канал баллончика; 8 — наружная часть канала баллончика; 9 — расширенная часть канала для воздуха; 10 — металлический переходник; 11 — головка стилета; 12 — отверстия канала для воздуха

ность введения и выведения промывной среды. Кончик рабочей части трубки 1 залит резиной 4, внутри которой имеется канал для фиксации кончика стилета 5 и предотвращения возможного прокола стенки закрытой части катетера. Надувной баллончик 2 (рабочее состояние показано пунктиром) помещается на резиновой трубке с припайкой в концах 6 и с надувным каналом 7, имеет вывод наружу 8. Конечная часть надувного канала выполнена в виде расширенной формы 9. Наружный конец резиновой трубки конусообразно расширен, и в него вставляется металлический переходник 10, который имеет замковый узел для фиксации стилета в резиновой трубке с помощью резьбового соединения головки стилета (11) с конечной частью металлического переходника, вставленного в трубку.

Приведение в рабочее состояние устройства состоит в следующем: в наружный конусообразный конец резиновой трубки 1 вставляют металлический переходник 11. Затем через этот переходник вводят металлический стилет 5, продвигают его до конца и фиксируют в кончике рабочей части в отведенном канале залитой резины 4. Наружный конец стилета 5 поворотом на пол-оборота фиксируют в металлическом переходнике 11, вставленном в трубку 1. Перед работой все составные части устройства стерилизуют кипячением в дистиллированной воде в течение 30 мин. Внутренний канал трубки прополаскивают промывной средой. Катетер в собранном виде смазывают нейтральным маслом (например, стерильным вазелиновым маслом) или смачивают силиконовой аэрозолью.

Успешное извлечение ранних эмбрионов зависит от глубины

введения рабочей части катетера в рог матки, величины орошаемой поверхности ее слизистой и интенсивности оттока промывной жидкости. Удлиненная рабочая часть трубки обеспечивает проникновение устройства глубоко в верхушку рога матки, что позволяет включить и эту часть органа в процесс промывания. Равномерное расположение отверстий в рабочей части катетера увеличивает поверхность промывания, исключает накопление жидкости в недостижимых участках верхушки рога матки, обеспечивает отток промывной жидкости по всей поверхности рога самотеком с одинаковой гидростатической силой.

Если рабочая часть короткая с двумя отверстиями на конце (катетер Фолли), то устройство может быть введено только до середины рога матки. Вводимая промывная жидкость, протекая по рогу, накапливается в его верхушке и теряет гидростатическое давление, что затрудняет ее отток, отчего значительно снижается индекс извлечения эмбрионов. При этом возникает необходимость в дополнительных манипуляциях с рогом матки — легкий массаж, поднятие его и др.

Известно, что не всегда можно получить зародыши от любого донора (в среднем у 30% животных). Это объясняется многими причинами: задержкой яйцеклеток в яйцеводе на 6—8-й день извлечения, дегенерацией и рассасыванием их, отсутствием овуляции, неправильным расположением катетера при промывании рогов матки и т. д.

Процент извлечения эмбрионов на 7—8-й день после осеменения обычно составляет 70—76, а на 5—6-й день — 54. Техника нехирургического получения эмбрионов на 5—6-й день после осеменения менее эффективна, чем хирургическое вымывание из матки и яйцеводов.

Имеющиеся различия в эффективности извлечения эмбрионов на 5—6-й и 7—8-й день объясняются, вероятно, тем, что часть зародышей в этот период задерживается в яйцеводах и они оказываются недоступными при нехирургической технике промывания рогов матки.

При нехирургическом извлечении эмбрионов голодная диета животным обязательна. Извлекают эмбрионы, как правило, на 7—8-й день после начала охоты. Непосредственно перед извлечением животное фиксируют в станке, освобождают прямую кишку от содержимого. Наружные половые органы и перинеальную область тщательно моют теплой водой с мылом, осушают салфетками, дезинфицируют аэрозолем «Септонекс» или 70%-ным этанолом. Для снятия напряжения прямой кишки проводят сакральную анестезию 2%-ным раствором новокаина в дозе 5 мл. Новокаин инъецируют между крестцовой костью и первым хвостовым позвонком. Строптивым коровам вводят внутримышечно миорелаксант (рампуны) 0,5—0,7 мл или комбелен 0,7—1 мл.

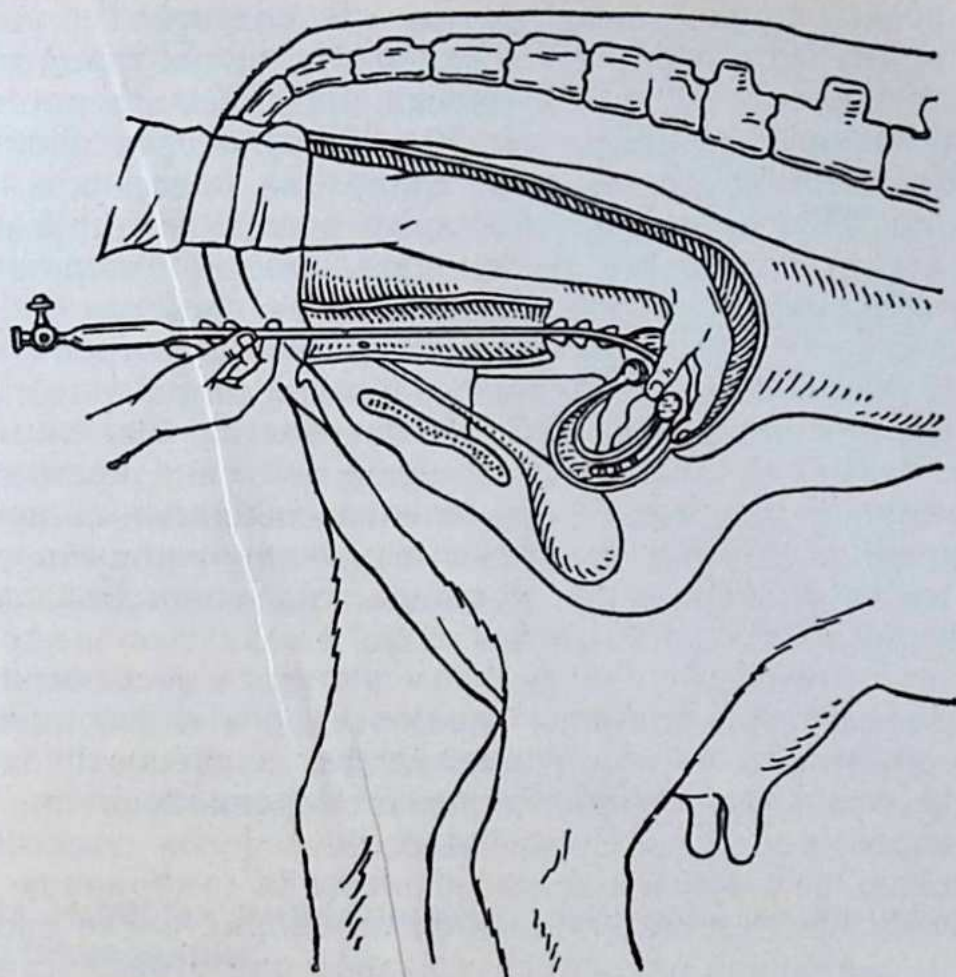


Рис. 13. Схема расположения катетера в роге матки коровы при нехирургическом извлечении эмбрионов

Подготовленный катетер вводят во влагалище и рукой ректально контролируют его продвижение через канал шейки матки. Убедившись, что катетер вставлен в цервикальный канал шейки матки, осторожно продвигают его по каналу, вводят в тело матки и размещают в одном из ее рогов (рис. 13). Стиллет постепенно удаляют и продолжают продвигать катетер в рог на нужную глубину, в баллон нагнетают 15—20 см³ воздуха и полностью удаляют стиллет. К дистальному концу с помощью тройника прикрепляют систему шлангов. В свободный конец одного из шлангов вставляют иглу и соединяют с флаконом со средой, а второй шланг опускают в мерный цилиндр емкостью 500 мл. Промывную жидкость подают в рога матки с помощью шприца емкостью 60 мл и более.

Свободное поступление промывной жидкости из флакона, поднятого на определенную высоту (для крупной коровы на 50—60 см) от крупа, и отток ее из рога матки регулируют зажимами. Наполнение рога матки жидкостью и отток ее контролируют ректально рукой. Необходимо строго контролировать количество введенной и собранной промывочной жидкости, не

допуская переполнения рогов матки. В качестве промывной жидкости применяют среду Дюльбекко. На промывание одного рога затрачивают до 700 мл жидкости. Ее подают в рог матки и удаляют из него порциями по 50—60 мл. После окончания промывания одного рога удаляют воздух из баллона и извлекают катетер. Для промывания второго рога берут другой стерильный катетер и в той же последовательности повторяют процедуру извлечения эмбрионов. По окончании промывания в рог матки вводят смесь антибиотиков (пенициллин+стрептомицин по 500 тыс. МЕ в 20 мл 0,5%-ного раствора новокаина).

Успех извлечения зародышей обеспечивается хорошими техническими навыками оператора (умелое введение инструмента в канал шейки и рог матки, применение специальных приемов манипулирования с ними во время вымывания, навыки распознавания места расположения катетера, состояния баллончика, наполнения рога матки жидкостью и др.).

Наиболее оптимальным вариантом является введение головки жесткого катетера ближе к верхушке рога и фиксация его в области маточного изгиба. Манипуляции включают поднятие рога за его верхушку и оттягивание его краниально в глубь брюшной полости, а также легкий массаж.

Технологию нехирургического извлечения эмбрионов часто применяют на предполагаемых коровах-донорах после спонтанной охоты с одиночной овуляцией в период подготовки их к гормональному вызыванию суперовуляции с целью выявления скрытых эндометритов и других отклонений от нормы в шейке и рогах матки. Извлечение эмбрионов при спонтанной охоте — один из обязательных этапов при отборе коров для использования в качестве доноров эмбрионов.

При использовании безбаллонного катетера техника вымывания может быть значительно осложнена и малоэффективна, если недостаточно проявляется сакральная анестезия. В этом случае применение катетеров с надувным баллоном более надежно, поскольку фиксируется промывная среда в маточном роге без его пережатия.

Техника введения наконечника катетера до верхушки рога матки, специальные приемы манипулирования с ним оказывают решающее влияние на эффективность вымывания зародышей. При нехирургической технике вымывания эмбрионов могут возникать различные затруднения: неправильное расположение катетера в просвете рога матки из-за спаек в нем, когда невозможно выделить дистальную часть рога; у телок иногда не удается пройти шейку матки; не извлекается стилет после введения катетера. В этом случае удаляют воздух из надувного баллона или вынимают катетер и подбирают к нему новый стилет; иногда возможна закупорка отверстий наконечника цервикальной слизью, которая препятствует вытеканию промывной

жидкости. Такое явление наблюдается у телок при использовании катетера малого диаметра.

При неумелой манипуляции с маткой и низкой квалификации оператора могут быть проколы или разрывы эндометрия из-за чрезмерного или очень быстрого наполнения баллона воздухом. В этом случае среда попадает под миометрий и отток ее затруднен. Поэтому воздух надо вводить медленно и в ограниченных количествах (15—20 см³). Повреждения слизистой матки возможны в результате интенсивных манипуляций при промывании рогов матки, сжатии их рукой, при использовании безманжетных катетеров. На повреждения указывает кровь, появляющаяся в промывной среде.

Следует учитывать, что во время промывания катетеры любой конструкции (особенно безманжетные) сокращениями мышц матки постепенно перемещаются из рога к ее телу. Поэтому необходим постоянный ректальный контроль за правильностью расположения катетера.

Нехирургическое извлечение эмбрионов, проводимое в лютеальную фазу, когда эндометрий наиболее чувствителен, может быть причиной цервикальных и эндометриальных повреждений, снижающих воспроизводительную способность коров-доноров.

ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ЭМБРИОНОВ, КРАТКОВРЕМЕННОЕ ИХ ХРАНЕНИЕ И КУЛЬТИВИРОВАНИЕ

Четких критериев для оценки качества получаемых зародышей пока нет. Морфологическая оценка состояния зародышей является одним из методов комплексной их оценки. Она служит для отбора неоплодотворенных яйцеклеток и определения стадии развития зародышей, а также выявления повреждений отдельных бластомеров или всего зародыша.

Решающее значение в оценке качества пересаживаемых зародышей имеет их жизнеспособность, проверяемая *in vivo* или *in vitro*. Нормальное развитие, заканчивающееся рождением нового организма,— окончательное свидетельство полноценности испытуемого зародыша.

Однако при пересадке зародышей требуется определять их жизнеспособность постоянно и исключительно по морфологическим признакам. При этом учитывают следующие основные морфологические признаки полноценности зародышей: целостность и равномерность развития бластомеров, прозрачность перивителлинового пространства, целостность зоны пеллюцида, соответствие стадий развития возрасту зародыша.

Для определения полноценности и жизнеспособности зародышей применяют следующие методы: а) визуальную морфологическую оценку, б) прижизненное окрашивание, в) культивирование вне организма в течение 24—48 ч, г) цитологическую и цитогенетическую оценку. Наиболее распространена визуаль-

ная морфологическая оценка под микроскопом в проходящем свете или через фазовый контрастный.

Морфологическая разнокачественность — выражение внутренней скрытой физической, биологической и физиологической неравноценности зародышей. При этом особое значение придается колебаниям объема зародышей, их форме, целостности, состоянию прозрачной оболочки и протоплазмы. Они должны соответствовать по уровню дробления возрасту от оплодотворения до их извлечения. Отставание в дроблении свидетельствует в 90% случаев о начальных этапах дегенерации зародыша.

При оценке по морфологическим показателям поздних зародышей не всегда удается точно определить их полноценность из-за большого числа клеток (морула, бластоциста). Например, крайне сложно визуально отличить партеногенетически дробящиеся яйцеклетки или зародыши с фрагментацией протоплазмы от нормальных поздних морул. Именно морулы на поздней стадии своего развития являются наиболее подходящими для пересадок или для криоконсервирования.

Предложено несколько методик проверки полноценности зародышей путем окрашивания синькой Эванса, эозином, раствором нейтрального красного, метиленовой сини и др. Прижизненное окрашивание ранних зародышей основано на свойстве красителей проникать через прозрачную оболочку и окрашивать протоплазму погибающих или погибших клеток.

Однако методы прижизненного окрашивания из-за низкой результативности не нашли пока широкого применения. Нередко зародыши, отнесенные по окраске к полноценным, оказывались впоследствии дегенерированными. Возможно, это связано с неблагоприятным действием на зародыш самого красителя.

Определение качества зародышей культивированием их вне организма — очень трудоемкий и сложный метод, требующий соблюдения полной стерильности. Культивируют зародыши в капле питательной среды, помещенной в пластиковые чашки, под слоем минерального масла с определенной газовой средой. Зародыши, проявившие признаки деления в течение 24—48 ч, считаются жизнеспособными.

При культивировании темпы развития зародышей несколько замедляются, и за непродолжительный срок (24—48 ч) не все потенциально жизнеспособные клетки успевают разделиться. Кроме того, условия вне организма не вполне соответствуют индивидуальной потребности развивающихся зародышей, и вследствие этого часть их может прекратить деление.

Существуют также методы определения качества зародышей на фиксированных препаратах. Ценность этих методов состоит в том, что они позволяют выявить тонкие особенности основных структур (цитоплазма, ядро), определяющих биологическую

ценность любой клетки. Кроме того, с помощью этих методов можно в ряде случаев установить причины гибели зародышей.

В настоящее время широко используют метод тотальных препаратов и воздушно-сухой метод получения хромосомных препаратов, которые позволяют оценить состояние структур зародышей, а также состояние хроматина в интерфазных ядрах бластомеров.

Цитологический и цитогенетический анализ ранних зародышей можно использовать для подсчета точного количества бластомеров по числу ядер, для выявления аномалий кариотипа и отдельных хромосом, изучения вопросов биологии размножения, например формирования гамет и закономерностей процесса оплодотворения, исследования причин эмбриональной смертности. Но эти методы неприменимы для изучения зародышей, предназначенных для трансплантации.

В целом ни один из существующих методов определения полноценности и жизнеспособности зародышей не является универсальным.

Очень мало известно о промежуточном метаболизме эмбрионов или их основных потребностях при культивировании. Понимание основного эмбриологического механизма таких явлений, как исчезновение впоследствии зоны пеллюцида, образование бластополости, установление сроков, когда и как осуществляется гистосовместимость белков, может улучшить результаты пересадок.

Обычное микроскопическое определение качества морулы — трудный и в некоторых случаях безрезультатный процесс. Тем не менее существующая микроскопическая технология позволяет все же определять жизнеспособность эмбрионов непосредственно перед пересадкой. По этому методу жизнеспособность эмбрионов определяют по разрушению эмбриональных тканей и задержке развития эмбрионов и классифицируют их как отличные, хорошие, посредственные и плохие. При такой классификации зародышей уровень стельности составляет соответственно 63, 58, 31 и 12%.

Число дегенерированных зародышей повышается по мере увеличения сроков извлечения, начиная с 3-го дня после осеменения (23,5% на 6-й день и 52,3% — на 8-й). Это указывает на то, что отклонения от нормы, не обнаруживаемые при световой микроскопии, могут быть у животных-доноров, подвергнутых воздействию высоких концентраций овариальных стероидов. В результате большинство зародышей подвергаются дегенерации на стадии морулы. Кроме того, на качество эмбрионов может оказывать вредное воздействие маточная среда.

По морфологическим особенностям все эмбрионы, извлеченные на 6—10-й день, можно разделить на 4 класса, на 11—12-й день — только на 2 класса. Если в день пересадки у зародышей

имелась прозрачная оболочка, то 60% их развиваются нормально, 26% отставших в росте делятся в замедленном темпе при культивировании вне организма. Процент нормальных зародышей снижается с 6-го дня, и к 10-му дню их остается минимальное число. Индекс дегенерированных зародышей возрастает к 7-му дню и затем остается стабильным.

Аномальности в развитии зародышей могут возникать еще при продвижении их по яйцеводам, но морфологически это выявляется на более поздних стадиях при продвижении их в матке, состояние которой у животных с суперовуляцией также оказывает негативное влияние на их качество. Число дегенерированных и отстающих в развитии зародышей на 5—8-й день после осеменения составляет в среднем 25—30% и варьирует от 17 до 53%. Больше оплодотворенных и жизнеспособных зародышей получают от коров без суперовуляции (до 70%).

Коровы с нормальной воспроизводительной функцией при суперовуляции выделяют достаточное число жизнеспособных зародышей (до 89%), и результаты их трансплантации лучше результатов трансплантаций зародышей коров с нарушенной функцией органов размножения.

Для усовершенствования метода микроскопической оценки предложена шкала определения качества морул (7-й день) и бластоцист (11-й день) по их внешнему виду с учетом трех показателей: 1) симметричное расположение бластомеров и отсутствие деформации прозрачной зоны, 2) бластомеры, неравные по размеру, расположены несимметрично, и наличие повреждений прозрачной зоны, 3) промежуточное состояние между первым и вторым морфологическими признаками исследуемого зародыша.

По степени развития различают ранние и поздние морулы, бластоцисты ранние и бластоцисты с растянутой полостью, бластоцисты без прозрачной зоны. Наблюдаются большие вариации в состоянии бластоцист не только у разных, но даже у одного и того же донора. Поэтому нельзя сделать точного заключения по морфологическому состоянию пригодности каждой отдельной морулы или бластоцисты для пересадок. Приживаются после пересадки около 44% бластоцист, получивших низкую оценку по предложенной шкале, и только 65% бластоцист, получивших наивысшую оценку. Таким образом, единственным приблизительным ориентиром жизнеспособности зародыша может быть степень развития бластоцист. Чем лучше развита бластоциста, тем у нее больше возможностей выжить.

ПОМЕЩЕНИЕ И ОБОРУДОВАНИЕ ДЛЯ РАБОТЫ С ЭМБРИОНАМИ

Работа проводится с эмбрионами в стерильных условиях. Необходимо иметь бокс с предбоксом и необходимое оборудование для работы с эмбрионами.

В предбокснике устанавливают следующее оборудование: мойку, лабораторный стол, сушильный шкаф, шкаф для посуды, шкаф для реактивов, холодильник для хранения питательных сред и препаратов; также приборы: настольную центрифугу, лабораторные и аналитические весы, рН-метр, осмометр, устройство для фильтрации жидкостей, баллоны с газом (O_2 , CO_2 , N_2), снабженные редукторами, смесителем и дозиметром.

В боксе устанавливают один или несколько биологических термостатов, бинокулярные лупы, инвертированный микроскоп (желательно с фотокамерой), настольный бокс с терморегуляцией и встроенной бинокулярной лупой. Общая площадь бокса с предбоксником должна быть не менее 20—25 м².

Из мелкого оборудования и реактивов необходимы: стерилизатор, эксикатор, спиртовка, устройство для отсасывания промывной жидкости, штативы для пробирок, подставки под пипетки, биологические термометры, бактерицидные лампы, ножницы, пинцеты анатомические и хирургические, зажимы кровоостанавливающие, шприцы на 60, 20, 10, 5, 2 и 1 мл и иглы к ним, колбы с притертыми пробками на 50, 100, 250, 500, 1000 мл, стаканы на 100, 400, 600, 1000 мл, бюксы на 10, 15, 30 мл, пипетки, градуированные на 1, 2, 5, 10 мл, цилиндры на 10, 25, 50, 100, 500, 1000 мл, часовые стекла диаметром 5, 6, 7 см, пробирки с притертыми пробками, стекла предметные и покровные, воронки, стеклянные палочки, пробирки диаметром 50×6 мм для культивирования эмбрионов, чашки Петри пластиковые и стеклянные (малые и большие), капиллярные пипетки для манипуляций с эмбрионами, флаконы из-под пенициллина для приготовления растворов красителей, спирт этиловый, компоненты среды Дюльбекко (натрий хлористый, калий хлористый, натрий фосфорнокислый двузамещенный безводный, калий фосфорнокислый однозамещенный, кальций хлористый безводный, магний хлористый 6-водный, глюкоза, натрий пировинограднокислый, сыворотка крови овцы или фетальная сыворотка теленка, или альбумин бычьей сыворотки), среда Дюльбекко, пенициллин, стрептомицин, двууглекислый натрий, уксусная, соляная, серная кислоты, щелочь натрия, калий двуххромовокислый, вазелиновое масло, вода бидистиллированная и тридистиллированная, красители для прижизненной оценки качества зародышей [акридиновый оранжевый, флуоресцеинди-ацетат (ФДА), 2,7-диамино-10-этил-9-фенилфенантридиум бромид (ЭБ), хлорамин], моющие средства — «Чистоль», «Новость».

Стерильность в боксе и предбокснике поддерживается бактерицидными лампами и обязательным использованием персоналом специальной стерильной одежды и сменной обуви. До и после манипуляций с эмбрионами проводят тщательную влажную обработку помещений. Кроме того, 96%-ным этиловым

спиртом обрабатывают поверхность рабочих столов, приборов и используемых инструментов. Для поддержания стерильности воздуха в боксе можно применять специальные противобактериальные фильтры.

Хорошая обработка посуды необходима при работе с эмбрионами крупного рогатого скота. Посуда должна быть из нейтрального стекла. В качестве моющих средств применяют «Чистоль», стиральный порошок «Новость», слабые растворы соляной или серной кислоты, раствор двуххромовокислого калия в серной кислоте (хромпик). При очистке посуды от загрязнения наиболее часто применяют обработку ее ершами и моющим веществом типа «Чистоль». После этого посуду тщательно ополаскивают теплой проточной водопроводной водой и дважды — бидистиллированной водой. Посуду сушат в сушильном шкафу, вниз горлышками, после высушивания ее заворачивают в алюминиевую фольгу или пергаментную бумагу и стерилизуют при 150°C в течение 2 ч в сушильном шкафу. Новую стеклянную посуду моют ершами, ополаскивают проточной водой, после чего кипятят в течение 1 ч в растворе с моющим веществом (30 г порошка «Новость» на 10 л воды) или обрабатывают хромпиком. Затем не менее 10 раз посуду ополаскивают проточной и бидистиллированной водой. Инструменты (скальпели, ножницы, зажимы и т. д.) промывают в воде с моющим средством, ополаскивают водопроводной и бидистиллированной водой, высушивают и для стерилизации помещают на 20—30 мин в 96%-ный этиловый спирт. Шприцы, иглы, резиновые пробки, поливиниловые трубки промывают водопроводной и бидистиллированной водой и стерилизуют кипячением в течение 20 мин в бидистиллированной воде. При работе с эмбрионами применяют сбалансированный солевой раствор Дюльбекко, который выпускается в готовом виде и в сухом — в 2 ампулах на 2 л воды. Среду Дюльбекко можно приготовить и в условиях лаборатории.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ СРЕДЫ ДЮЛЬБЕККО

Для приготовления солевого раствора используют тридистиллированную воду, в которой в нижеприведенной последовательности растворяют все реагенты марки х. ч.: натрий хлористый (NaCl) — 8,00 г, калий хлористый (KCl) — 0,20 г, натрий фосфорнокислый двузамещенный безводный (Na_2HPO_4) — 1,15 г, калий фосфорнокислый однозамещенный (KH_2PO_4) — 0,20 г, магний хлористый, содержащий 6 молекул воды ($\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$), — 0,10 г, кальций хлористый безводный (CaCl_2) — 0,10 г, натрия пируват — 0,036 г, глюкоза — 1,00 г.

Каждый последующий компонент вносят в раствор после полного растворения предыдущего. Объем раствора доводят

до 1 л, рН его должен соответствовать 7,2—7,3. Если необходимо довести рН раствора до требуемого уровня, то используют раствор децинормальной щелочи или раствор децинормальной соляной кислоты. Осмотическое давление раствора порядка 290 миллиосмолей. Готовый раствор стерилизуют фильтрацией через стерилизующие пластины, например ЕКС-2 фирмы Зейтц (ФРГ). Сохраняют его при комнатной температуре.

Перед работой с эмбрионами в раствор добавляют следующие компоненты: альбумин сыворотки крови крупного рогатого скота (лиофилизированный) — 4 мг/мл, пенициллин (натриевая соль) — 100 МЕ/мл.

Альбумин сыворотки крови крупного рогатого скота можно заменить сывороткой крови овцы или эмбриональной сывороткой теленка. Для кратковременного хранения эмбрионов количество сыворотки должно составлять 20%, для культивирования — 30%. Промышленность выпускает лиофилизированный сухой бычий альбумин и фетальную сыворотку теленка. При отсутствии этих компонентов их можно заменить сывороткой крови овцы или северного оленя.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ СЫВОРОТКИ КРОВИ ОВЦЫ

В практической и исследовательской работе с эмбрионами возникают определенные трудности из-за недостатка или полного отсутствия фетальной сыворотки крови теленка. Ее с успехом можно заменить сывороткой крови овцы.

Сыворотку получают из крови клинически здоровых овцематок в операционной с соблюдением стерильности. Перед взятием крови животное надежно фиксируют в боковом положении, наклонно, вниз головой. На операционном поле (область наружной сонной артерии) бритвой удаляют шерстный покров, тщательно моют кожу теплой водой с мылом, дезинфицируют 70%-ным раствором этанола, а затем 5%-ным раствором йода. Кровь берут из сонной артерии иглой для взятия крови, соединенной поливиниловым шлангом с цилиндром на 500 мл. Цилиндр держат наклонно, чтобы кровь поступала в него по стенке во избежание гемолиза эритроцитов. После максимального получения крови животное забивают. Для отделения сыворотки кровь выдерживают при комнатной температуре в течение 30 мин, затем обводят сгусток стерильной спицей и оставляют в холодильнике при температуре 4°C в течение 12—14 ч. После этого сыворотку сливают в стерильные центрифужные пробирки и центрифугируют в течение 10 мин при 2000—3000 мин⁻¹. Сыворотку расфасовывают в стеклянные пробирки с притертыми пробками, инактивируют в течение 20 мин в ультратермостате при температуре 56°C и хранят в холодильнике в замороженном состоянии. Объем сыворотки в пробирке не должен превышать 20 мл (разовая доза на 0,5 л среды).

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ЭМБРИОНОВ

Эмбрионы оценивают путем определения стадий развития, состояния оболочек и внутренних структур. Биологически полноценными принято считать эмбрионы, имеющие правильную шарообразную форму, гомогенную светлую цитоплазму, неповрежденную прозрачную оболочку, одинакового размера blastomeres с плотным межклеточным контактом. Они должны соответствовать по уровню дробления возрасту от оплодотворения до извлечения.

Качество эмбрионов оценивают в следующей последовательности. После промывания рогов матки коровы-донора цилиндры или пробирки с промывной жидкостью переносят из операционного зала в стерильный бокс. Осаждение эмбрионов происходит в течение 20 мин в термостате при температуре 37°C. Верхнюю часть жидкости из каждой емкости удаляют при помощи сифона или шприца с длинной иглой, оставляя 60—100 мл. Отстой переносят в 2—3 чашки Петри из пластмассы, дно которых для удобства поиска эмбрионов расчерчено на квадраты размером 1×1 см. Эмбрионы обнаруживают под бинокулярной лупой при 15—20-кратном увеличении. Найденные эмбрионы пипеткой переносят в малое часовое стекло в 1 мл питательной среды для кратковременного хранения и морфологически оценивают на инвертированном микроскопе при увеличении в 100 раз.

При оценке выделяют неоплодотворенные яйцеклетки без признаков развития и с дегенеративными изменениями оболочки или цитоплазмы, без первого полярного тельца, но с наличием в ядре диктиотен, метафазы, анафазы, телофазы. Отмечают набухание перивителлинового пространства, гомогенное распределение цитоплазматических телец, включений и органелл. Перивителлиновое пространство маленькое, с небольшим количеством плазмы, плотность прозрачной оболочки яйцеклетки нормальная.

Дегенерированные неоплодотворенные яйцеклетки имеют сморщенное перивителлиновое пространство неправильной формы. Наблюдаются центральная агглютинация цитоплазматических телец, включений и органелл, разрушение перивителлинового пространства большим количеством плазмы в нем, растягивание (расширение) прозрачной оболочки (рис. 14*). Может быть и другая форма фрагментации неоплодотворенных яйцеклеток — фрагментированное перивителлиновое пространство. Диаметр фрагментов приблизительно одинаков. Иногда дегенерированные неоплодотворенные яйцеклетки можно отличить от оплодотворенных только по состоянию ядра. Часто наблюдаются разрыв оболочки клетки, центральная часть, освобож-

* Рисунки 14—28 и 42 см. в конце книги.

денная от плазмы. При небольшом увеличении такую клетку можно спутать с бластоцистой.

Нередко прозрачная зона разрушается и зародышевые клетки на 4—6-й день после осеменения доноров оказываются свободными, что, видимо, связано с серьезными отклонениями от нормального их развития. В промывной жидкости обнаруживаются лопнувшие сферы прозрачных зон, лишенные внутреннего содержимого. Этим, вероятно, можно объяснить несоответствие между числом овуляций и числом получаемых зародышей при извлечении эмбрионов у большинства коров-доноров.

Нормальные эмбрионы имеют неповрежденные, равномерные по ширине опалесцирующие оболочки и ядерный материал в состоянии дробления, соответствующем возрасту эмбриона. На 4—7-й день развития эмбрионы обычно достигают стадии морулы (рис. 15).

Оплодотворенные яйцеклетки характеризуются наличием анафаз и телофаз с метаморфозами головки спермиев, первого полярного тела, двух пронуклеусов и второго полярного тела. Ядро находится в интерфазе митоза.

Стадия развития оплодотворенных яйцеклеток определяется количеством бластомеров. У морул и бластоцист различают ранние и поздние фазы развития в зависимости от формы скопления бластомеров (подобно округлой форме морулы) и размера полости бластоцист (табл. 16).

Количество бластомеров у оплодотворенных яйцеклеток всех стадий может быть точно определено после прижизненного флюорохромирования акридиноранжем путем подсчета клеточных ядер. Точность подсчета числа бластомеров у морул под стереомикроскопом составляет 78,5%, бластоцист — 52,4%, под инвентированным микроскопом — соответственно 59,5 и 46,3%.

Прозрачная зона нормальных морул имеет форму сферы. Удваивание числа бластомеров в морулах происходит приблизительно через каждые 24 ч. Различия в степени дробления эмбрионов в ранний период их развития могут быть обусловлены растянутостью овуляции. Бластомеры морул необязательно должны иметь одинаковую величину, что зависит от возможной асинхронности процесса их деления. У некоторых морул отдельные клетки выпячиваются в перивителлиновое пространство, на их поверхности допустимы небольшие цитоплазматические вздутия и пузырьки.

Непригодны к трансплантации эмбрионы, резко отстающие от нормального развития, с выраженным неравномерным дроблением бластомеров, с явлениями их дегенерации (рис. 17, 18).

Условно пригодными для трансплантации можно считать эмбрионы с небольшими морфологическими изменениями: невыраженной неравномерностью дробления бластомеров, неболь-

шим их сжатием, включениями в перивителлиновое пространство (рис. 19).

Формы дегенерации зародышей различны. Наиболее часто встречались нарушения цитолеммы клеток с выходом цитоплазмы в перивителлиновое пространство, фрагментация цитоплазмы с выделением ложных шаров, смещение цитоплазмы к одному полюсу клетки, потемнение цитоплазмы и уплощение тела зародыша, конденсация внутриклеточного материала, огрубление его структуры, появление везикул, крупных гранул, нарушение целостности прозрачной зоны.

На 7—8-й день после осеменения коров-доноров в промывной жидкости обнаруживаются бластоцисты. Нормальная ранняя бластоциста имеет толщину прозрачной оболочки примерно 12 мкм, число бластомеров может быть в пределах от 80 до 120, просматривается небольшая полость бластоцисты, поверхность клеточной массы гладкая, равномерная, что указывает на наличие соединительного комплекса между клетками трофобласта, перивителлиновое пространство маленькое (рис. 20).

У полноценного зародыша, находящегося на стадии дробления, соответствующей сроку оплодотворения яйцеклетки, бластомеры умеренно уплотнены, структура их цитоплазмы однородна, цитоплазма не повреждена, перивителлиновое пространство прозрачно на всем протяжении. Бластомеры необязательно должны иметь одинаковую величину, что зависит от процесса их деления. Часто отдельные клетки выпячиваются в перивителлиновое пространство, на поверхности их могут быть цитоплазматические вздутия, пузырьки. Прозрачная зона имеет форму сферы, бластомеры часто сжимаются при помещении зародыша в среду ФБС, однако при этом не теряют своей жизнеспособности (рис. 21).

На рисунке 22 показаны зародыши, имеющие компактную форму бластомеров, где просматриваются направительные тельца, прилегающие к одному из полюсов компактных зародышей. Пересадка этих и подобных им зародышей дает отрицательные результаты.

По-видимому, особенности структуры и функции направительных телец в описанных случаях предрасполагают к низкой физиологической активности зародышей, что впоследствии обуславливает неприживание их в матке коровы-реципиента. Вероятно, гладкая и компактная форма зародышей может служить признаком неспособности их к росту и формированию бластоцеля.

У морфологически нормальной поздней (экспандированной) 8-дневной бластоцисты прозрачная оболочка утончена, растянута, имеет форму правильной сферы, полость бластоцисты большая, перивителлиновое пространство отсутствует (рис. 23). На 9-й день развития бластоциста сбрасывает прозрачную оболочку

11. Стадия развития эмбрионов на день извлечения
после осеменения коров-доноров

День из- влечения	Число эмбрионов, %				
	Морулы		Бластоцисты		
	ранние	поздние	ранние	поздние	без зоны пеллюцида
6-й	27,4	69,3	3,3	—	—
7-й	9,0	10,2	79,5	1,3	—
8-й	—	1,5	1,5	97,0	—
9-й	—	—	—	2,3	97,7

с сохранением бластополости, клетки четко выражены (рис. 24).

Бластоцисты с небольшим сжатием бластополости и незначительными деформациями прозрачной оболочки считаются условно пригодными для трансплантации (рис. 25).

Бластоцисты со значительными разрывами, расслоением прозрачной оболочки для трансплантации непригодны (рис. 26).

На 6—7-й день извлечения встречаются зародыши почти на всех стадиях развития, что связано с неодновременным выходом яйцеклеток при суперовуляции и многократностью осеменения. На 6-й день зародыши чаще всего находятся на стадии поздней морулы (69,3%), на 7-й день преобладают ранние бластоцисты (79,5%), на 8-й — поздние бластоцисты (97%) и на 9-й — бластоцисты без зоны пеллюцида (97,7%).

Наблюдаются большие вариации в состоянии морул и бластоцист не только у разных доноров, но даже у одного и того же животного. Не всегда точно удается определить морфологическую полноценность 7—8-дневных эмбрионов из-за наличия в них большого числа клеток (морула, бластоциста). Крайне сложно под микроскопом отличить партеногенетически дробящиеся яйцеклетки или эмбрионы с явлениями фрагментации от нормальных поздних морул. Для этого необходим большой практический опыт работы с эмбрионами разных стадий развития.

Ранние морулы после нехирургической пересадки вызывают стельность в среднем 48,8%; морулы поздние с неравномерно развитыми бластомерами — около 60%; бластоцисты, получившие низкую оценку по морфологическим признакам, — 44%, а из числа с наивысшей оценкой — 70%. Очевидно, что наиболее развившиеся эмбрионы имеют лучшие возможности выжить после трансплантации.

Морфологическое исследование стадии развития эмбрионов, состояния их оболочек и внутренних структур является экспресс-методом по оценке их жизнеспособности, который может быть широко использован в практике трансплантации и крио-

12. Стадия развития эмбрионов овец в зависимости от дня хирургического извлечения после осеменения (по Н. И. Сергееву и С. А. Мазепкину)

Стадия развития эмбрионов	Процент эмбрионов в зависимости от дня извлечения		
	5-й	6-й	7-й
Морулы:			
ранние	62,5	21,3	3,9
поздние	12,5	40,0	11,7
Бластоцисты:			
ранние	25,0	28,0	11,7
поздние	—	4,0	25,6
без зоны пеллюцида	—	29,4	11,2
Пустые прозрачные оболочки	—	6,7	17,7
В том числе:			
нормальные эмбрионы	87,5	82,7	70,6
неоплодотворенные яйцеклетки	12,5	10,6	11,7
дегенерированные разрушенные эмбрионы	—	6,7	17,7

консервирования эмбрионов крупного рогатого скота и овец.

Эмбрионы овец на ранних стадиях также развиваются неодинаково. Так, в 6-суточном возрасте встречаются ранние морулы (21,3%) и даже бластоцисты (28%). Разнообразие по стадиям развития наблюдается и в 7-суточном возрасте. Существует закономерность в числе эмбрионов по стадиям развития, соответствующим их возрасту. Например, в 5-суточном возрасте чаще встречаются ранние морулы (62,5%), в 6-суточном — поздние морулы (40%) и ранние бластоцисты (28%), в 7-суточном — поздние бластоцисты (25,6%) и бластоцисты, покинувшие зону пеллюцида (29,4%).

На рис. 27 показаны эмбрионы овец разного возраста. По морфологической оценке у овец (в отличие от коров) при суперовуляции почти все яйцеклетки оплодотворяются и отсутствуют дегенерированные эмбрионы. В среднем оплодотворяемость яйцеклеток составляет 89,8%. С увеличением возраста эмбрионов наблюдается полное разрушение зародышей, от которых остаются только пустые прозрачные оболочки без клеточного материала.

При извлечении эмбрионов на 6-й день число их составляет 67% и на 7-й — 17,7%. В зависимости от срока извлечения уменьшается и число нормальных эмбрионов, %: на 5-й день — 87,5, на 6-й — 82,7 и на 7-й — 70,6. С увеличением срока извлечения повышается число разрушенных эмбрионов. У овец наиболее благоприятный срок извлечения эмбрионов — 5-й день (Н. И. Сергеев и др., 1984) (табл. 12).

Наблюдения показывают, что обработка животных гонадотропином на 10—11-й день эстрального цикла способствует улучшению качества эмбрионов, на 12—13-й день и в более поздние сроки сопровождается увеличением числа дегенерированных эмбрионов. Так, при гормональной обработке доноров на 10—11-й день полового цикла дегенерированных зародышей зарегистрировано 25,9%, на 12—13-й день — 39% от общего числа извлеченных зародышей.

У лактирующих коров по сравнению с нелактирующими извлекают меньше нормальных (41,5 против 51,9%) и больше дегенерированных (36,7 против 26,7%) зародышей.

Зимой и весной наблюдается больше дегенерированных зародышей, чем осенью (37,2 и 39,1 против 18%). Однако зарегистрированной связи между качеством зародышей и сезоном года не найдено.

Применение рилизинг-гормона гонадотропинов не оказывает влияния на уровень оплодотворяемости яйцеклеток и на снижение числа зародышей с дегенеративными изменениями.

У коров-доноров при наличии в яичниках только желтых тел бывает меньше нормальных зародышей (45,3%) и значительно больше дегенерированных (34,9%), чем у коров с наличием желтых тел и фолликулов (60,3 и 26,8%). Однако это не относится к животным, у которых наряду с желтыми телами имелись кистозные фолликулы.

Жизнеспособность и физиологическое состояние зародышей зависят от степени полиовуляции. Так, больше всего неоплодотворенных яйцеклеток, пустых прозрачных зон и меньше нормальных зародышей было при 16 овуляциях на оба яичника. С увеличением овуляций снижается число нормальных зародышей с 54% при числе овуляций от 3 до 5 до 22,4% при числе овуляций более 16. Получают больше нормальных зародышей (47,4%) от доноров с умеренной полиовуляцией от 6 до 10.

Необходимо отметить, что одинаково успешно могут приживаться как ранние зародыши (4—6-дневные), так и морулы и бластоцисты. Среди пересаживаемых зародышей бывают и такие, у которых дробление бластомеров происходит неравномерно, встречаются бластомеры, отставшие в делении. Последние бывают в 2—4 раза крупнее окружающих. Это в основном зародыши до 16 шаров дробления и ранние морулы (16—32 бластомера). Такие зародыши вполне жизнеспособны и развиваются до полноценного теленка.

Для удобства учета и простоты регистрации качества эмбрионов предложена 5-балльная шкала оценки по морфологическим признакам (табл. 13).

В шкале предусмотрены идентификация стадии развития зародышей, морфологическая характеристика по форме, целостности оболочек бластомеров, характер их связи, состояние ци-

13. Шкала оценки морул и бластоцист коров и овец

Стадия развития	Морфологическая характеристика	Эмбрионы	Баллы	Условные обозначения
<i>Морулы</i> ранняя (Мо I) и поздняя (Мо II)	Округлая форма, целая прозрачная оболочка, перивителлиновое пространство прозрачное, бластомеры четкие, одинакового размера, с наличием полигональной связи, цитоплазма имеет зернистый вид, равномерно заполняет цитоплазматическую оболочку	Отличные	5	++
	Наличие гранул, включений в перивителлиновом пространстве, бластомеры неодинаковые по размеру, расположены несимметрично, немного сжаты	Хорошие	4	+
	В перивителлиновом пространстве гранулы, включения, частичный зародыш, незначительное сжатие бластомеров, единичные разрушения клеток	Удовлетворительные	3	+—
	Деформация прозрачной оболочки, частичное разрушение бластомеров, нарушение связи между ними, фрагментация цитоплазмы, сжатие бластомеров	Условно годные	2	+— —
	Несоответствие стадии развития возрасту эмбрионов, дефекты прозрачной оболочки (трещины, сколы), распад бластомеров, сильное их сжатие	Непригодные	1	— —
<i>Бластоцисты</i> ранняя (БЛ I) и поздняя (БЛ II)	Округлая форма, прозрачная оболочка имеет одинаковую толщину на всем протяжении, перивителлиновое пространство узкое, прозрачное, четкая дифференциация клеток трофобласта и эмбриобласта, хорошо различима бластоцель	Отличные	5	++
	Зона пеллюцида утончена, полость бластоцисты большая, занимает все перивителлиновое пространство, имеет гладкую поверхность, четкую дифференциацию клеток, бластоцель не выражена, в перивителлиновом пространстве гранулы, включения, клетки трофобласта сжаты незначительно	Хорошие	4	+

Стадия развития	Морфологическая характеристика	Эмбрионы	Баллы	Условные обозначения
	Перивителлиновое пространство увеличено, имеет включения, гранулы, бластополость не выражена, нет дифференциации между клетками трофобласта и эмбриобласта	Удовлетворительные	3	+ —
	Дефект прозрачной оболочки (трещины, сколы), наличие гранул, клеточных фрагментов в перивителлиновом пространстве, частичное разрушение клеток, сжатие бластополости	Условно годные	2	+ — —
	Значительный дефект прозрачной оболочки, распад бластомеров, рыхлое их соединение	Непригодные	1	— —

топлазмы, бластополости, выраженность клеток трофо- и эмбриобласта, а также оценка в баллах с условными обозначениями. По морфологическим особенностям отбирают неоплодотворенные яйцеклетки, нормально развитые эмбрионы с частичной дегенерацией, а также зародыши, состояние которых проверяют другими методами.

ОЦЕНКА ЭМБРИОНОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ КРАСИТЕЛЕЙ

Этот метод основан на различной степени проницаемости красителей через прозрачную оболочку живых или погибших эмбрионов. Для окрашивания эмбрионов используют акридиноранж (АО), флуоресцеиндиацетат (ФДА), 4,6-диамино-2-фенилиндол (ДАПИ), 2,7-диамино-10-этил-9-фенилфенантридиум бромид (ЭБ), 1-анилино-нафталин-8-сульфонат (1,8-АНС).

Прижизненную оценку эмбрионов выполняют следующим образом: эмбрион помещают на предметное стекло, добавляют соответствующий краситель и при комнатной температуре проводят инкубацию, а затем исследуют его под люминесцентным микроскопом.

Для окраски готовят акридиноранж на растворе Локка в концентрации 1 : 40 000. Эмбрионы инкубируют в темноте 10 мин. После этого краситель отмывают раствором Локка, в каплю этого раствора помещают эмбрион и накрывают покровным стеклом. Оценку жизнеспособности проводят под люминесцентным микроскопом, затрачивая на этот анализ не более 1,5 мин. У живых клеток красноватое свечение, у погибших — зеленое.

Применяют краситель ФДА в концентрации 1 : 600 000 в растворе Дюльбекко. В качестве растворителя ФДА используют ацетон (1 мг на 1 мл среды ФБС). Эмбрионы инкубируют в этой среде в течение 3 мин. Краситель флуоресцирует при контакте с гидролазами (ферментами, активными только в живых клетках). Погибшие эмбрионы или отдельные бластомеры не флуоресцируют. Живые эмбрионы флуоресцируют полностью или частично зеленым цветом. Кратковременная инкубация с ФДА не оказывает отрицательного влияния на жизнеспособность эмбрионов. Жизнеспособность эмбрионов определяют в отраженном свете люминесцентного микроскопа.

ДАПИ является чувствительным реагентом на ДНК. Для окрашивания эмбрионов 0,1 мг ДАПИ растворяют в 1 мл физраствора и далее разбавляют раствором Дюльбекко для получения окончательной концентрации 1 : 100 000. Продолжительность окрашивания 10 мин при температуре 22 °С. Эмбрионы, у которых ядра проявляют желтую флуоресценцию, являются нежизнеспособными. У нормальных эмбрионов ядра не окрашиваются и они не флуоресцируют. Эмбрионы оценивают в отраженном свете люминесцентного микроскопа.

Метод окраски ЭБ и АНС основан на определении жизнеспособности эмбрионов с использованием синтетической питательной среды с флуорохромом, медленно проникающим в живые клетки. Для окрашивания ЭБ и АНС готовят два раствора. Для первого берут 3 мг красителя и растворяют в 3 мл дистиллированной воды, для второго — 0,1 мл первого и вносят в 9,9 мл солевого раствора (Хэнкса или Дюльбекко). Эмбрионы помещают в две капли солевого раствора и добавляют одну каплю раствора красителя. Продолжительность окрашивания эмбрионов 1 мин, оценка при люминесцентном свечении не более 10 с. Фильтры те же, что и при окрашивании ФДА. У нежизнеспособных эмбрионов клеточная мембрана проницаема для красителей. Краситель ЭБ связывается в клетке с нуклеиновыми кислотами и люминесцирует красно-малиновым свечением. АНС соединяется внутри клетки с белками и дает голубоватую люминесценцию. Живые эмбрионы не окрашиваются и не дают люминесцентного свечения.

ОЦЕНКА ЭМБРИОНОВ МЕТОДОМ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

У биологически полноценных эмбрионов в оптимальных условиях культивирования продолжается развитие. Для культивирования эмбрионов применяют питательные среды: ТС-199, Хэм F-10, Игла, солевые растворы Дюльбекко, Бринстера с различными биологическими и синтетическими добавками. Осмотическое давление питательных сред или растворов для культивирования эмбрионов должно быть порядка 300 миллиосмолей,

pH 7,2—7,4. Культивирование эмбрионов можно проводить в каплях питательной среды на часовых стеклах под слоем вазелинового масла, помещенных в чашки Петри. Используемая газовая среда содержит 90% азота, 5% кислорода и 5% диоксида углерода. Культивировать эмбрионы можно в пробирках или соломинках (паеттах).

При культивировании эмбрионов на часовых стеклах их стерилизуют, после чего переносят пипеткой 25 капель стерильного вазелинового масла, затем в шприц набирают 0,1 мл питательной среды, которую тонкой иглой подпускают под вазелиновое масло. Часовые стекла помещают в чашки Петри и устанавливают в эксикатор, помещенный в термостат при температуре 37°C. В течение 10—20 мин через эксикатор пропускают газовую смесь. Затем из находящихся в эксикаторе часовых стекол пипеткой удаляют питательную среду и в свежей порции питательной среды помещают эмбрион под вазелиновое масло. Часовое стекло в чашке Петри снова переносят в эксикатор и вновь в течение 10—20 мин пропускают газовую смесь, предварительно фильтруя ее и увлажняя. Для этого используют стеклянные фильтры (производство ЧССР) типа «Кавалиер» с пористостью 15 мкм.

Эксикатор после смазывания соприкасающихся поверхностей крышки и корпуса вазелином плотно закрывают, шланги для ввода и вывода газовой смеси герметично перекрывают зажимами и оставляют в термостате на заданное время инкубации. Для контроля pH в эксикатор помещают бюксу с питательной средой, в которую добавлен индикатор pH-феноловый красный. При pH 7,2—7,3 феноловый красный в растворе имеет оранжево-красный цвет. При защелачивании контрольная среда окрашивается в малиновый цвет, при закислении — в оранжевый.

Более простой способ — культивирование эмбрионов в пробирках или соломинках. Эмбрионы пипеткой переносят в пробирку с 1 мл питательной среды и после добавления 3 капель стерильного вазелинового масла закрывают алюминиевой фольгой. В соломинки эмбрионы вводят шприцем в 0,25 мл среды и помещают в термостат при температуре 37°C. Эмбрионы, культивируемые в соломинках, можно транспортировать на дальние расстояния и их удобно пересаживать.

Перед культивированием эмбрионы морфологически оценивают на инвентированном микроскопе МБИ-13 при увеличении в 100 раз. Продолжительность культивирования эмбрионов без потери биологических потенций возможна до 95 ч.

Эмбрионы различных стадий развития, находящиеся в культуре, продолжают развитие в 90% случаев, и только незначительная их часть остаются интактными (около 10%). Не наблюдается различий в переживаемости эмбрионов в зависимости от продолжительности времени их культивирования. Одинаково

успешно в культуре развиваются как ранние, так и поздние эмбрионы. Стельность от пересадки прокультивированных на разных стадиях развития эмбрионов составляет более 50%.

ПЕРЕСАДКА ЭМБРИОНОВ ЖИВОТНЫМ-РЕЦИПИЕНТАМ

Первая успешная пересадка зародышей крупного рогатого скота была осуществлена хирургическим методом в 1951 г.

В дальнейшем было показано (1972), что при хирургической пересадке зародышей можно получать не только оптимальный уровень стельности у реципиента, но и превзойти обычный индекс оплодотворяемости коров, получаемый от осеменения при спонтанной охоте (91 против 65%). Столь высоких результатов можно достичь при пересадке двух зародышей в оба рога матки каждому реципиенту.

Фактически таких результатов приживляемости эмбрионов после хирургической пересадки долгое время не удавалось достичь, и они оставались на уровне 15—20%. Поэтому разработке надежных и более эффективных методов пересадки зародышей придается большое значение.

ХИРУРГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ПЕРЕСАДКИ ЭМБРИОНОВ

Широко используются два способа хирургической пересадки (аппликации) эмбрионов. Первый способ — лапаротомия по белой линии живота с использованием общего наркоза в положении животного лежа на спине. При этом применяют специальный наклонный операционный стол. Этот метод можно использовать только на телках. Телок-реципиентов предварительно выдерживают двое суток на голодной диете.

Премидикацию осуществляют внутримышечным введением 2 мл рампуна и 4 мл 0,1%-ного раствора атропина с последующей фиксацией животного на операционном столе и внутривенным введением 10%-ного раствора хлоралгидрата из расчета 100 мл на 100 кг живой массы. Операционный участок тщательно моют теплой водой с мылом, удаляют шерстный покров, дезинфицируют вначале 70%-ным этанолом, а затем обильно орошают 10%-ной настойкой йода.

На подготовленном операционном поле делают разрез длиной до 10—15 см. Определяют яичник с желтым телом, выводят верхушку рога матки. Стенку рога матки прокалывают тупой иглой и стеклянную пипетку с оливой, содержащую зародыш, проводят в приготовленное отверстие; с помощью резинового наконечника на праксимальном конце пипетки апплицируют зародыш. Дистальный конец пипетки направляют в сторону верхушки рога матки как можно ближе к месту соединения его с яйцеводом (рис. 28). При аппликации необходимо, чтобы

зародыш был помещен на слизистую матки, а не суб- или интра-эндометрально. Для получения двойни второй зародыш аналогичным образом переносят в контрлатеральный рог матки.

После проведенной операции использованную пипетку проверяют под микроскопом, поскольку возможно прилипание зародыша к ее стенке. После успешной пересадки накладывают послойно швы из кетгута сначала на брюшину, потом на мышцы и подкожную клетчатку и затем на кожу. Реципиент находится под послеоперационным наблюдением в течение 14 дней.

Второй способ пересадки — более простой и менее трудоемкий. Делают разрез брюшной стенки в области голодной ямки справа или слева со стороны желтого тела в яичнике реципиента с применением анестезии — 5 мл 2%-ного раствора новокаина сакрально и 0,6 мл комбелена — внутримышечно; по линии разреза послойно — 140 мл 2%-ного раствора новокаина. Оперированное животное находится в положении стоя.

Операционное поле предварительно готовят по общепринятой хирургической методике для операции подобного типа. Делают вертикальный разрез кожи длиной около 15 см несколько впереди тазобедренного сустава с последующим рассеканием подкожной клетчатки и прямой наружной мышцы брюшной стенки. Косую брюшную мышцу прокалывают по ходу мышечных волокон, а затем раздвигают рукой на необходимую ширину. Аналогичным образом расслаивают и внутреннюю прямую мышцу.

Открывшуюся брюшину подхватывают кровоостанавливающим зажимом, подтягивают в просвет разреза и надрезают ножницами. Затем рукой раздвигают брюшину до нужного размера. Руку через разрез вводят в брюшную полость, большим и указательным пальцами за маточную связку осторожно извлекают верхушку рога матки и производят пересадку зародыша так же, как и при операциях по белой линии живота.

После пересадки зародыша рог матки отпускают и контролируют рукой правильность его расположения. После этого на разрез накладывают три слоя швов — на брюшину и прямую внутреннюю мышцу, на косую наружную мышцу и подкожную клетчатку кетгутом № 4 и 5 и на кожу — лавсановой нитью или шелком. Через 14 дней наружные кожные швы снимают. При операциях по белой линии живота используют только кетгут № 5 и 6, чтобы избежать повторной фиксации животного для снятия швов с кожи.

Эмбрионы овец пересаживают только хирургическим методом под местной анестезией в положении животного лежа на спине по общепринятой методике с применением технологии аппликации эмбриона в просвет рога матки, как и у коров. Половой цикл у реципиентов должен быть синхронным с возрастом эмбрионов. Через небольшой вентральный разрез (до

15 см) по белой линии живота обеспечивается свободный доступ к рогам матки. Поочередно рог матки выводят в просвет разреза, делают тупой иглой прокол в области верхушки в 3—5 см от места его соединения с яйцеводом. Через этот прокол вводят пипетку с эмбрионом в просвет рога матки и апплицируют его. В пипетку эмбрион помещают в следующем порядке: вначале столбик среды (1 см по узкому концу пипетки), потом столбик воздуха, затем среда с эмбрионом, опять воздух и на кончике пипетки столбик среды.

После пересадки эмбрионов сначала на брюшную стенку и затем на кожу накладывают швы по общепринятой методике для такого типа операций. Для наложения швов используют кетгут № 4 и 5.

Успешное получение нормальных жизнеспособных телят от пересадки зародышей реципиенту включает несколько технологических процессов, и они должны быть проведены с предельной аккуратностью.

Возможны отдельные ошибки во время оценки качества зародышей и исполнения техники их пересадки, что служит причиной снижения результативности эмбриопересадок на первых этапах освоения техники трансплантации.

При хирургическом методе пересадки через боковой разрез или по белой линии живота иногда удается получить до 90,4% стельности. Однако в большинстве случаев приживляемость эмбрионов составляет 50—60%.

Степень стельности на 90-й день после пересадки 6-суточных зародышей составляет в среднем 46,4%, 7-суточных — 54,1%, 8- и 9-суточных — 50%. В итоге по результатам отела уровень стельности несколько снижается и составляет в среднем около 50%.

Результаты стельности повышаются при двойневых пересадках по сравнению с пересадкой одного зародыша, и они выше у реципиентов с синхронизированной охотой и составили соответственно возрасту зародыша 50 и 69,2% (в среднем 61,9%), а при асинхронном половом цикле минус 1 день — 75 и 60% (в среднем 69,2%), при асинхронном половом цикле плюс 1 день — 52,6 и 40%. Двойневых отелов при пересадке двух эмбрионов в разные рога матки получают до 70% у коров мясных пород (G. B. Anderson и др., 1979) и около 50% — у телок-реципиентов молочного направления (Н. И. Сергеев, 1986).

Меняющиеся результаты пересадки (уровень стельности, эмбриональная выживаемость, растянутые эстральные циклы после пересадки и др.) требуют осторожного объяснения по двум причинам. Во-первых, естественный уровень оплодотворяемости в стадах из года в год меняется, и на результаты пересадки могут оказывать влияние скрытые, неизвестные факторы, как и при естественном осеменении.

Во-вторых, от одного или двух доноров зародыши имеют разный уровень приживляемости, и, вероятно, это оказывает существенное влияние на результаты пересадки. Соотношение количества полученных зародышей на одного донора и результатов пересадки реципиентам различно. Так, от одной высокопродуктивной коровы получают до 10 стельностей при пересадке 14 эмбрионов, а от другой получают одну стельность при пересадке 10 зародышей. По статистике различных центров по трансплантации средний уровень стельности после пересадки хирургическим методом колеблется от 48 до 70% и число телят — от 2,5 до 4 на одного донора.

Техника пересадки эмбрионов приемлема для многих видов животных. Однако для каждого вида имеются свои особенности в операциях.

При пересадках эмбрионов очень большое влияние на результативность оказывает степень синхронности эстральных циклов. Важно, чтобы эстральный цикл реципиента был синхронен с циклом донора.

Существует ряд технических трудностей в осуществлении пересадок эмбрионов — реактивность животных при стимуляции сверховуляций, число пригодных для пересадки зародышей, влияние самой техники пересадки, послеоперационные спайки, возможные у донора, и др. Кроме отбора зародышей по оплодотворяемости, придается большое значение их возрасту и соответствию срокам от осеменения животных до извлечения эмбрионов.

НЕХИРУРГИЧЕСКИЙ МЕТОД ПЕРЕСАДКИ ЭМБРИОНОВ

Первая попытка трансцервикальной пересадки эмбрионов была сделана в 1949 г. (Д. Довллинг). Результаты оказались отрицательными, но они породили новые идеи, которые были реализованы в последующих экспериментах. Так, было выяснено, что матка в лютеальную фазу полового цикла очень чувствительна к инфекции и внешним раздражителям, и при неосторожном введении инструментов во время пересадки возникают травмы, сопровождающиеся воспалительными процессами слизистой шейки и эндометрия.

Установлено, что искусственные яйцеклетки (резиновые шарики), пересаженные в рога матки через цервикальный канал в начале лютеальной фазы, вскоре изгоняются во влагалище вследствие нарушения цервикального барьера и усиления подвижности рогов матки. Выбрасывание искусственных яйцеклеток не удается предотвратить даже медикаментозными средствами.

Применением антибиотиков как компонентов сред можно контролировать развитие микрофлоры в рогах матки после

трансцервикальной пересадки зародышей. Однако и в данном случае результаты нехирургической пересадки были отрицательными.

В связи с этим возникла гипотеза, что введение катетеров через цервикальный канал при пересадке стимулирует выделение окситоцина, вызывающего сокращение миометрия матки, что сопровождается изгнанием из нее зародыша после пересадки. Действительно, инъекции окситоцина вызывают усиление сокращений матки во все фазы полового цикла. Делались попытки блокировать действие окситоцина с помощью адреналина, папаверина. В дальнейшем испытывалось влияние слабой и более полной эпидуральной анестезии и обработки слизистой цервикального канала более сильными анестетиками. При этом маточные сокращения полностью снимались. Однако и это оказалось недостаточно эффективным.

При нехирургической пересадке вагинальное и цервикальное раздражение в течение ранней лютеальной фазы у коров происходит без увеличения уровня окситоцина в крови животных. Был сделан вывод, что эндометрий матки в лютеальную фазу очень чувствителен к инфекции и это может служить причиной низкой результативности нехирургической пересадки зародышей.

Результаты исследования бактериальной обсемененности рога матки и инструментов после нехирургической пересадки были неоднозначны. Однако было показано, что занос микроорганизмов при пересадке не является решающим фактором, против которого надо принимать специальные меры.

Если пересадку зародышей производить на 5-й день эструса, то миометральная активность при прохождении цервикального канала не повышается. Спонтанная активность миометрия наблюдается до 5-го дня. Возникающие вагинальные и цервикальные раздражения при введении катетера после 5-го дня не вызывают повышения уровня окситоцина в крови животных. При экзогенном введении окситоцина значительно повышался уровень простагландина на 3-й день и не изменялся при окситоциновой обработке на 6-й день эструса.

Л. Роусон в 1966 г. получил 3 стельности от пересадки эмбрионов нехирургическим методом. Общая стельность после пересадки составила 14%. При этом зародыши находились в среде с добавлением сыворотки крови крупного рогатого скота и после пересадки их в рога матки через цервикальный канал нагнетали CO_2 . Однако повторные эксперименты дали отрицательные результаты.

Позднее была применена простая методика пересадки зародышей с помощью инструментов для искусственного осеменения длиной 45 см, в которые вкладывалась паетта сечением 0,25 см с эмбрионом. При пересадке соблюдались обычные меры пред-

осторожности в отношении асептики. Стельность реципиентов составила 10%. Причиной низкой результативности было, по-видимому, изменение рН среды матки вследствие введения CO_2 .

Большинство сообщений относительно применения нехирургической техники пересадки зародышей крупного рогатого скота свидетельствуют о низкой результативности этого метода. Кроме того, данная техника включает ряд сложных манипуляций — введение CO_2 в полость матки или использование приборов для введения зародыша через влагалище в обход шейки матки.

Расбех в 1976 г. предложил три типа металлических катетеров. Один из них приспособлен для введения зародыша до середины, другой — до верхушки рога матки, третий — универсальный, обеспечивающий введение зародыша в любой участок рога матки. Стельность при использовании таких катетеров составляла 31%. Результаты оказались намного ниже, чем при нехирургической пересадке эмбрионов осемененным коровам в противоположный рог матки с желтым телом в яичнике. Отелов двойнями получено 83,3%. Это дает основание считать, что высокая чувствительность матки к инфекции в лютеальную фазу и ее повышенная физиологическая активность — не основные причины низкой приживляемости зародышей при нехирургической пересадке.

Для выяснения причин неудовлетворительных результатов при нехирургической пересадке эмбрионов в 1975 г. были проведены оригинальные эксперименты. В строго асептических условиях телкам вводили в рога матки специальные приспособления через систему катетеров, чтобы имитировать стельность. Контролем служили осемененные телки. В контроле стельность от первого осеменения составила 54%, а у телок с ложными пересадками — 48%. Ложная пересадка через цервикальный канал не влияла на результаты осеменения. На основании этого сделано предположение, что основная причина низкой результативности нехирургической пересадки — не занесение инфекции, а особенность метода и техника исполнения процедуры пересадки.

Высокие результаты стельности от хирургической пересадки в рог матки на стороне желтого тела в яичнике, вероятно, не влияют на приживляемость зародышей, пересаженных в контрлатеральный рог матки трансцервикальным методом. Трудно объяснить причины плохой выживаемости зародышей при нехирургической их пересадке. При этом способе зародыши редко помещают далее середины рога матки, тогда как при хирургической пересадке их помещают вблизи верхушки рога. Место аппликации зародыша в матке имеет весьма существенное значение, что, возможно, и является причиной неудовлетворительных результатов. Однако многие исследователи к главной причине неудач относят усиление миометральной подвижности мат-

ки, яйцеводов и яичников при трансцервикальной пересадке эмбрионов.

В связи с этим возникли новые теории относительно подвижности генитальных органов самки. Подвижность матки обусловлена тремя факторами: сокращением мышечных волокон и стромы, сокращением маточных связок и локальными вариациями кровотока. Подвижность стромы и мышечных волокон матки значительно варьирует в течение эстрального цикла: максимальная — во время эструса и в 4—5 раз ниже — в лютеальную фазу.

Матка чрезвычайно быстро изменяет чувствительность к химическим и механическим факторам. Менее чем за 48 ч действие окситоцина на матку может меняться от 1 до 100. Механические раздражения стенки матки вызывают аналогичные вариации в реакции. Поэтому при нехирургической пересадке зародышей надо избегать чрезмерно медленного и слишком быстрого введения инструмента в рог матки. Пересадка эмбрионов с предварительным введением препаратов, понижающих сократительную деятельность матки (маточный релаксант или изокеупринлактин — изодрин), дают возможность вызывать стельность у реципиентов от 40 до 55%.

Сравнительное изучение выживаемости зародышей при одновременной пересадке их хирургическим и трансцервикальным методами показало, что пересадка 7-суточных эмбрионов хирургическим методом в рог матки с желтым телом в яичнике, нехирургическим — в контрлатеральный рог обеспечивала стельность соответственно у 85 и 35% животных. После нехирургической пересадки в рог матки с желтым телом в яичнике и хирургической — в контрлатеральный рог выживаемость зародышей соответственно составляла 20 и 30%. Нехирургическая пересадка в контрлатеральный рог не ухудшает результаты хирургической пересадки. Однако приведенные результаты стельности были получены при убое животных на 30—42-й день после пересадки, что не отражает полностью результативность нехирургического метода пересадки.

Низкие результаты стельности — общая проблема при использовании нехирургического метода пересадки. При этом в лучших вариантах приживляемость эмбрионов достигает 50—55%.

Обработка полости влагалища антибиотиками перед пересадкой, овуляция в правом или левом яичнике также не влияют на уровень стельности. Установлено, что применяемая техника нехирургической пересадки зародышей вызывает преждевременную регрессию желтого тела у некоторых реципиентов, но, возможно, это связано с эмбриональной смертностью. Низкий уровень стельности при нехирургической пересадке часто обусловлен иммунологической несовместимостью.

При использовании новых приборов (фирма «Кассу», Франция) для нехирургической пересадки стельность реципиентов достигает 47%, а после контрлатеральной пересадки зародышей предварительно осемененным реципиентам уровень приживляемости эмбрионов достигает 60%. Это дает основание предположить, что нормальная стельность может быть достигнута и при нехирургической пересадке зародышей даже на 9—13-е сутки их развития, но при условии аппликации эмбрионов глубоко в рог матки.

Результат пересадки нехирургическим методом во многом зависит от качества пересаживаемых зародышей. Так, после пересадки эмбрионов с оценкой «отличные» получают до 63% стельностей, «хорошие» — 58, «посредственные» — 31 и «плохие» — 12% (R. P. Elsdon и др., 1978). На результаты пересадки оказывает влияние и качество желтого тела у животных-реципиентов.

Приживляемость зародышей, пересаженных от доноров, не обработанных гормонами, составила 71% против 59% от доноров, обработанных гормонами с целью вызывания суперовуляции (I. M. Sreenan, 1978). Наибольшая эмбриональная смертность наблюдается после 17-го дня нехирургической пересадки. Преодоление этого фактора можно обеспечить инъекцией хориогонина или прогестерона. Использование сравнительно небольшого объема среды при аппликации зародыша в матку может стать также положительным фактором, обеспечивающим стельность после нехирургической пересадки.

Синхронизация охоты у реципиентов, возраст эмбрионов, среда для пересадки, место аппликации в роге матки и другие факторы, обеспечивающие высокий процент стельности при хирургической пересадке, не дают аналогичных результатов при пересадке трансцервикальным путем.

Повышения уровня стельности при нехирургической пересадке можно добиться увеличением возраста зародышей. Поскольку 7—8-суточные эмбрионы являются наиболее подходящими для длительного хранения в жидком азоте, то и нехирургическая пересадка должна проводиться на этой стадии развития эмбрионов. Уровень стельности после нехирургической пересадки достоверно выше при размещении эмбриона в верхней части, чем у основания рога матки. Результаты нехирургической пересадки во многом зависят от квалификации операторов. При хирургической пересадке эмбрионов в основание рога матки результаты стельности ниже (W. B. Christie и др., 1980), чем при пересадке в верхушку рога (44,8% против 73,3). Причина этого неясна, и вряд ли она связана с техникой пересадки, которая в обоих случаях была одинаковой. По-видимому, месторасположение эмбриона имеет прямое влияние на его способ-

ность выделять лютеотрофный и лютеолитический сигнал на яичник, который в норме настроен на лютеолизис.

Вероятно, главным фактором низкой приживляемости эмбрионов является наличие микроповреждений в слизистой шейки и рога матки, которое сопровождается выпотеванием сыворотки крови в месте аппликации зародыша. Возможно, что присутствие крови, обрыв ткани слизистой матки вокруг пересаженного зародыша вредно влияют на локальный маточный процесс, а значит, и на развитие зародыша.

При нехирургической пересадке по сравнению с хирургической из-за меньшей контролируемости места аппликации зародыша нанесение травмы может вызвать субклинические эндометриты. Кроме того, цервикальная слизь, заносимая в матку, может также оказать неблагоприятное влияние на развитие зародыша.

Оптимальное местонахождение эмбриона в ходе пересадки должно быть обусловлено местом, на котором бы он находился при естественном зачатии. Поэтому была разработана и предложена конструкция прибора, позволяющая апплицировать эмбрион как можно более краниально в ипсилатеральном участке рога матки (рис. 29—32).

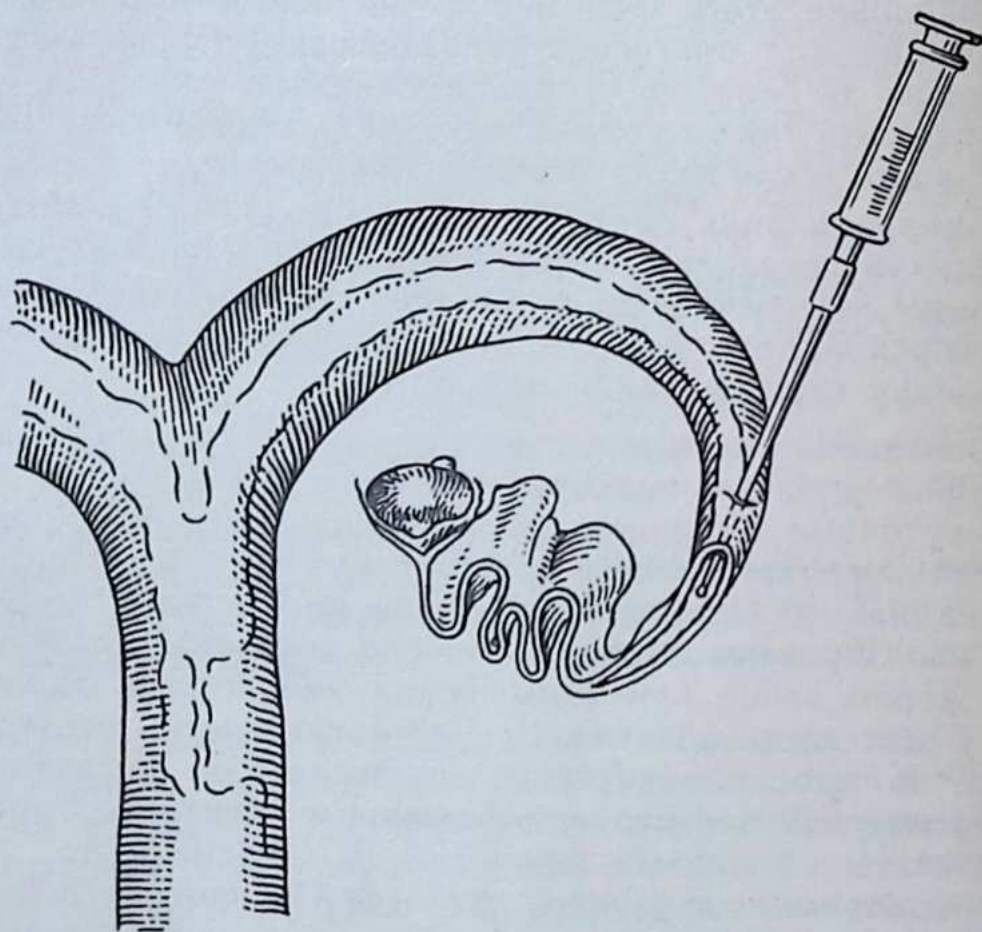


Рис. 29. Схема пересадки эмбрионов хирургическим методом

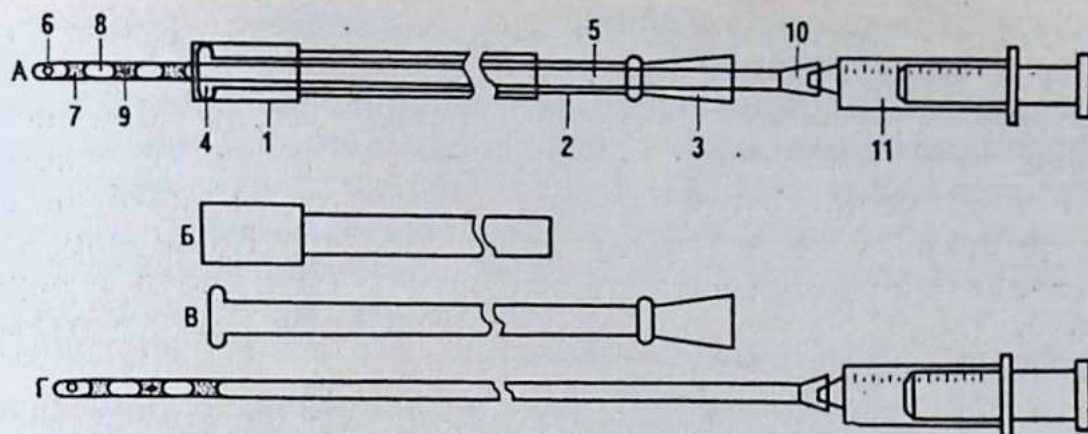


Рис. 30. Катетер для нехирургической пересадки эмбрионов:

А — катетер в сборе; Б — санитарный чехол; В — трубка из нержавеющей стали; Г — уретральный катетер с 1-миллиметровым шприцем для выталкивания эмбриона; 1 — санитарный чехол; 2 — металлическая трубка; 3 — воронкообразное расширение трубки; 4 — дистальный конец трубки; 5 — пластиковый уретральный катетер; 6 — отверстие катетера; 7, 8, 9 — расположение среды и эмбриона в рабочей части катетера; 10 — переходник соединения со шприцем; 11 — пластиковый шприц на 1 мл

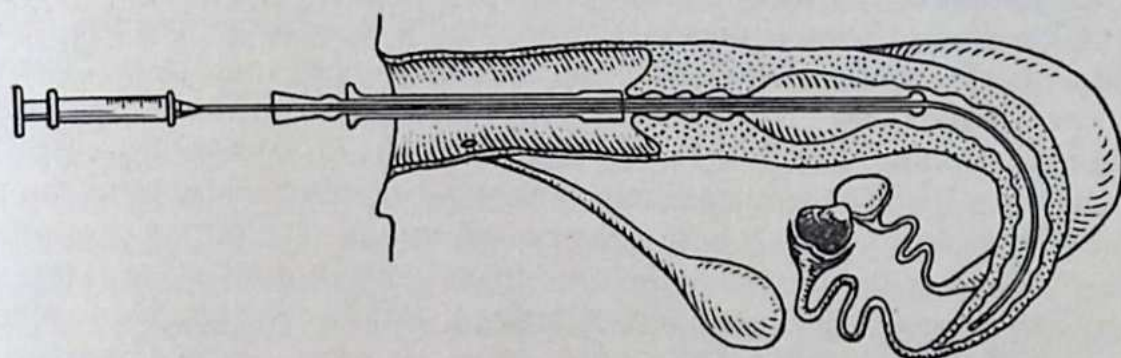


Рис. 31. Схема расположения катетера в роге матки при нехирургической пересадке

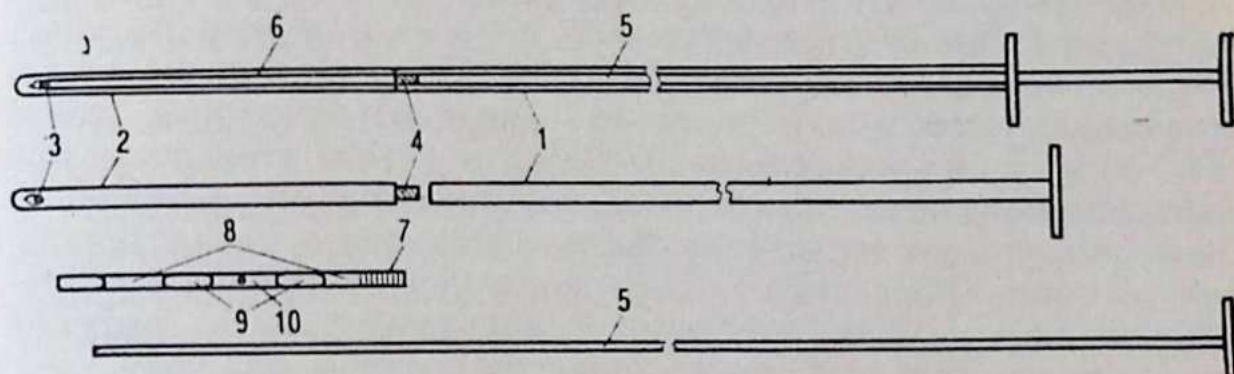


Рис. 32. Металлический катетер для нехирургической пересадки эмбрионов крупного рогатого скота:

1 — металлическая трубка; 2, 4 — съемный наконечник катетера; 3 — отверстие съемного наконечника; 5 — стилет; 6 — паета в наконечнике; 7 — пробка паеты; 8 — среда; 9 — воздух; 10 — среда с эмбрионом

Подготовка животных-реципиентов аналогична подготовке доноров для нехирургического извлечения зародышей. Животное фиксируют в станке, наружные гениталии и перинеальную область тщательно моют теплой водой с мылом, дезинфицируют 70%-ным раствором этанола, делают эпидуральную анестезию 2%-ным раствором новокаина (5 мл). В отдельных случаях сильно возбудимым животным вводят мышечный релаксант (комбелен) в дозе 0,5 мл. Вместо эпидуральной анестезии можно пользоваться маточным релаксантом. Его вводят внутримышечно в объеме 20 мл за 15—20 мин до пересадки.

Стерильный инструмент очень мягко и осторожно вводят в канал шейки матки и через нее в один из маточных рогов. При этом положение округлой головной части катетера постоянно контролируют ректально (см. рис. 30).

При нехирургической пересадке прослеживается зависимость индекса стельности от стадии развития эмбрионов. Наиболее подходят для пересадки поздние морулы на стадии развития 7-го дня, ранние и поздние бластоцисты в возрасте 7—8-го дня. Наивысший процент приживляемости зарегистрирован при пересадке ранних и поздних бластоцист с морфологической оценкой «отличные», «хорошие» (60,8 и 64,7% соответственно). Несколько ниже приживляемость поздних морул (54,8%). Стельность от пересадки эмбрионов на стадии ранней морулы составляет только 17,6% (Н. И. Сергеев, В. И. Букарова, 1983).

Подсадка эмбрионов предварительно осемененным реципиентам обеспечивает 60% двойнености от числа стельных реципиентов и 36% — от числа пересаженных эмбрионов. Стельность или приживляемость эмбрионов после ипсилатеральной нехирургической пересадки такая же, как и при искусственном осеменении. Приживляемость эмбрионов при контрлатеральной пересадке меньше (36%), чем при ипсилатеральной (57,1%). Однако 36% эмбрионов, трансплантированных в контрлатеральный рог, развиваются у нормальных телят. При этом необходимо подчеркнуть, что 40% и более двойневых стельностей при контрлатеральной нехирургической пересадке можно получить при высокой оплодотворяемости (60—70%) телок после искусственного осеменения. При низкой оплодотворяемости телок (45—50%) получают только 20—25% двойневой стельности при подсадке эмбрионов предварительно осемененному реципиенту. Доказано, что лютеотропный эффект эмбриона в ипсилатеральном роге благоприятствует развитию второго эмбриона в контрлатеральном роге, но для этого необходимо иметь высокий индекс оплодотворяемости реципиентов в целом по стаду.

Таким образом, зародыши можно получать путем гормонального вызывания множественной овуляции и извлекать нехирургическим методом, пересаживая их в матку реципиентов также с использованием нехирургической техники. Однако результаты

пересадки полностью зависят от правильного выполнения этапов метода, особенно суперовуляции и синхронизации эстральных циклов у доноров и реципиентов. Особое препятствие на пути повышения результативности трансцервикальных пересадок — качество и возраст зародышей, получаемых от разных коров-доноров. Место расположения зародыша в просвете рога матки также может обуславливать их приживляемость при нехирургической пересадке.

ПОЛУЧЕНИЕ ДВОЕН МЕТОДОМ ПЕРЕСАДКИ ЭМБРИОНОВ

Двойни у крупного рогатого скота, особенно у животных молочных пород, при благоприятных условиях окружающей среды, хорошем кормлении и содержании — явление нередкое. Так, из 3000 отелов в молочном стаде зарегистрировано рождение 2,7% двоен. Попытки индуцировать двойневые овуляции у крупного рогатого скота уровнем кормления, в отличие от индуцирования у овец, оказались малоэффективными.

Финские исследователи после анализа 600 тыс. отелов пришли к выводу о возможности создания в течение 10 лет породы, у коров которой будет 20% двойневых отелов. Однако селекция по двойневому признаку трудна и потребует значительного времени.

Кроме того, двойни, развивающиеся в одном роге матки, могут создавать ряд трудностей во время отела. Этого можно избежать целенаправленным индуцированием двоен, например применением гонадотропинов. Основной проблемой остается значительная вариабельность в овулирующей реакции яичников, что неизбежно ведет к рождению троен и даже большего числа телят. В таких случаях высока смертность телят после рождения.

Английскими учеными было выявлено, что у коров как одноплодных животных в отличие от многоплодных (например, овец) даже при выделении двух яйцеклеток в виде реакции на экзогенный гонадотропин рождается обычно один теленок, если обе овуляции происходят в одном яичнике. Это связано с тем, что у коров зародыши из одного рога матки в другой редко мигрируют, у овец и свиней — это обычное явление.

Доказано, что животные определенных пород и даже линий внутри породы по-разному реагируют на одинаковую обработку гонадотропином. Можно получить от 10 до 20% двоен у коров от первого осеменения после обработки низкими дозами ГСЖК (750—800 МЕ).

Первостепенное значение при многоплодной стельности, индуцированной гонадотропином, имеет ограничение числа развивающихся плодов максимум до двух. Коровы, имеющие три и более плодов, обычно abortируют раньше пятого месяца стель-

ности. Отмечаются также преждевременные роды или осложнения во время отела, или коровы приносят потомство с высокой смертностью в родовой и послеродовой периоды (до 40%).

Делались попытки ограничить число овуляций путем применения однократной небольшой дозы частично очищенного экстракта гипофиза на 16-й день полового цикла. В день охоты инъецируют небольшую дозу хорионического гонадотропина. Такая схема гормональной обработки позволяет значительно снизить число коров с многоплодной стельностью (3 теленка и более).

Однако наиболее регулируемый метод индуцирования двоен может быть достигнут путем пересадки двух эмбрионов по одному в каждый маточный рог подходящих реципиентов. Для этого требуются соответствующие приемы получения и пересадки эмбрионов и их кратковременного хранения.

Метод получения двойневыости включает в себя пересадку по одному эмбриону в каждый маточный рог реципиента или пересадку одного эмбриона в контрлатеральный рог матки по отношению к желтому телу предварительно осемененного реципиента.

Хирургической пересадкой эмбрионов у крупного рогатого скота можно получить высокий процент двойневыости. Несколько ниже он при использовании нехирургического метода.

Более высокие результаты от двойневых пересадок получены у коров и телок герефордской породы. При двусторонней пересадке оказались стельными 76%, а при односторонней, предварительно осемененному реципиенту, — 60%. Двойневые отелы зарегистрированы соответственно у 71 и 67% животных от числа стельных.

Сравнение результатов искусственного осеменения и двойневых пересадок эмбрионов у разных пород крупного рогатого скота (шароле, нормандская, фризская) и помесей шароле × нормандская показало, что уровень стельности при двойневых пересадках выше, чем при искусственном осеменении. Уровень двойневой стельности в среднем по породам составил 44,4% с колебаниями от 42,8 до 45,4%. Выход телят был достоверно больше у реципиентов (1,16 на одного стельного реципиента), чем у осемененных животных.

Для пересадки используют эмбрионы, которые по стадии своего развития соответствуют сроку после осеменения и являются морфологически нормальными, то есть имеют неповрежденную сферическую зону пеллюцида, прозрачное перивителлиновое пространство, преимущественно целостные бластомеры и хорошо выраженную полость.

После подготовки соответствующего реципиента эмбрионы помещают в пипетку следующим образом. Под стереомикроскопом набирают в пипетку столбик среды (0,5 см по суженной

части), потом в таком же количестве воздух, затем среду с эмбрионом, опять воздух и, наконец, среду. Пипетку из стерильного бокса подают в операционную для аппликации эмбриона и сразу же готовят второй эмбрион.

Для успешной приживляемости зародышей важна не только их полноценность, но и физиологическое состояние реципиента, в частности морфофункциональное состояние эндометрия рогов матки. Общий уровень приживляемости у телок-реципиентов молочных пород при пересадке двух эмбрионов в среднем составляет 61,5%, а рождение двоен от числа стельных — около 50%. При этом определяющий фактор — синхронность развития эмбриона у донора и дифференциация эндометрия у реципиента. При регулировании полового цикла у доноров и реципиентов важна их однозначная реакция на обработки. На практике, правда, имеются значительные индивидуальные вариации, и их необходимо учитывать при пересадке эмбрионов.

У телок-реципиентов с двойнями, как правило, не наблюдается отклонений в течение стельности и в период отела. Средняя продолжительность двойневой стельности несколько меньше, чем одинаковой ($258 \pm 3,4$ против $278,1 \pm 3,2$ дней). Двойни при рождении имеют в среднем меньшую живую массу ($26,0 \pm 0,50$ кг), чем одинаки ($38,2 \pm 0,94$ кг), хотя общая живая масса двух телят всегда больше ($50,8 \pm 2,58$ кг).

Успешная приживляемость трансплантируемых эмбрионов у овец зависит от стадии их развития и синхронности эстрального цикла у реципиента со стадией и возрастом эмбрионов, числа пересаженных эмбрионов в рога матки и числа желтых тел в яичнике реципиента. Лучшие результаты приживляемости эмбрионов получают при синхронизации эстрального цикла у донора и реципиента день в день. Хорошие результаты могут быть и при точном совпадении эстрального цикла реципиента с возрастом эмбриона.

При отставании возраста эмбрионов от эстрального цикла реципиента на 1 день приживляемость их составляет 72%, на 2 дня — 70%, на 3 дня — 7%. При опережении возраста эмбриона эстрального цикла реципиента на 1 день приживляемость составляет 65%, на 2 дня — 50% и на 3 дня — 4%.

Уровень суягности овец можно повысить путем пересадки 2—3 эмбрионов вместо одного (69,2 против 45%). У малопродуктивных овец пересадка 3 и более эмбрионов, как правило, повышает процент суягности до 75, однако приживляемость эмбрионов не увеличивается. Выживаемость эмбрионов всегда выше при одиночных овуляциях и ниже — при двойневых. Степень потери эмбрионов связана с их миграцией из рога в рог. Поэтому малопродуктивным овцам пересаживают не более 2 эмбрионов (по 1 в каждый рог), многопродуктивным — не менее 6 (по 3 в каждый рог).

Особое значение при изучении наступающих изменений в организме в связи с возникновением беременности придается эмбриональным гормонам, специфическим стероидам, гормонам, влияющим на предимплантационное эмбриональное развитие, материнскому опознанию беременности и гормональному разнообразию в имплантационном процессе.

Способность зародышей к синтезу различных гормонов была установлена несколько лет назад. Было показано, что эмбрионы могут влиять на материнские функции до имплантации и в течение нее или в период прикрепления зародыша. До имплантации развитие эмбриона зависит от секретов яйцевода и матки, от особенностей половых органов животных, в которых зародыш растет и развивается. Эмбрионы мышей можно культивировать до стадии бластоцисты в сравнительно простой химической среде. Культивирование эмбрионов крупного рогатого скота и овец до стадии бластоцист возможно лишь в среде, подобной среде яйцеводов или среде фолликулов.

Первые различия в течение эмбриогенеза состоят в поляризации отдельных бластомеров в трофобласте и внутриклеточной массе. Судьба отдельных бластомеров определяется их местоположением в данный период времени до проявления материнского влияния. Хотя эмбрионы не нуждаются в экзогенной гормональной стимуляции для развития до стадии бластоцисты в культивированной среде, однако материнские стероиды регулируют секрецию генитального тракта и могут таким образом оказывать влияние на развивающийся зародыш.

Эмбриональное развитие после стадии однослойной бластоцисты происходит неравномерно до тех пор, пока эмбрионы не освобождаются от зоны пеллюцида. Механизм регуляции, при котором разрушается зона пеллюцида, пока не изучен, но, по-видимому, включает в себя воздействие протеолитических ферментов, образующихся в эндометрии. Эти ферменты, по всей вероятности, контролируются яичниковыми стероидами. Протеолитическая активность ферментов стимулируется бластоцистой, и она может включаться в процесс лизиса в начале имплантации.

Стероидные гормоны были выявлены при контроле деления клеток и синтеза специфических белков в определенных условиях. Это означает, что они регулируют раннее эмбриональное развитие. Эмбрион может сам участвовать в регуляции превращения морулы в бластоцисту и разрушении зоны пеллюцида.

Стероидный обмен ферментами был показан гистохимическими методами у предимплантационных эмбрионов различных видов животных (мышей, крыс, хомяков, кроликов). Ферментная активность отсутствует в предморуловой стадии эмбриона, но

она повышается до максимума в бластоцистах и быстро снижается до полного исчезновения вскоре после имплантации. Была проверена интенсивность ферментной активности всех фаз развития оплодотворенных и неоплодотворенных яйцеклеток хомяков. Результаты гистохимического анализа наглядно показали, что активность стероидных ферментов специфически не связана с особенностями развития.

Метаболизм ферментных стероидов не был выявлен у мышей на стадии морулы или бластоцисты радиоиммунологическим или хроматографическим методами анализа количества преобразованных продуктов, но отмечен у крыс в стадии предимплантационной бластоцисты. Позднее была отмечена способность эмбрионов синтезировать андрогены и эстрадиол в течение всего периода имплантации. Выявлен метаболизм стероидных ферментов в эпителии яйцевода крыс, хотя ткани в норме не должны быть связаны с метаболизмом стероидов. Это говорит о существовании неспецифической дегидрогеназы, способной активировать гидроксистероиды.

Антиэстроген СУ-628 задерживает развитие мышинных эмбрионов в предимплантационную стадию в культуральной среде, и это служит доказательством того, что эстрадиол непосредственно влияет на развитие эмбрионов. Развитие бластоцисты и последующее разрушение зоны пеллюцида в культуре вне организма проявляются только косвенно благодаря материнским стероидным гормонам, возможно, через секрецию яйцеводного и эндометриального эпителия. Независимость эмбриона от влияния стероидных гормонов проявляется в том случае, если он находится вне матки или в культуре, что указывает на существование механизма эндогенного контроля.

У млекопитающих сохранение активного желтого тела в основном связано с наличием беременности и длительной секрецией прогестерона, необходимого для создания миометриальной неподвижности и эндометриальной чувствительности. Желтое тело развивается и сохраняется под воздействием лютеотропных гормонов. Его регрессия может наступить под воздействием лютеолизина, который представляет одну из разновидностей простагландина $F_{2\alpha}$.

В течение беременности зародыш может воздействовать непосредственно на секрецию лютеотропина или антилютеолизина. Активные вещества могут быть синтезированы в матке в результате соответствующих сигналов, исходящих от плода. Эмбриональные связи в лютеальной поддержке меняются у тех биологических видов, у которых развивается специфическая плацента (крысы, мыши, человек). Было выявлено, что у крыс определенные клетки плаценты сами обладают лютеотропным действием.

Эмбриональный лютеотропин (человеческий хориогонин) может быть определен на 6—10-й день беременности у приматов, но макромолекулярный лютеотропин не может быть идентифицирован у коров, свиней и овец.

Показано, что гомогенат 14—15-дневных эмбрионов овец содержит неустойчивое к нагреванию вещество, способное оказывать лютеальное воздействие. Активное вещество не является плацентарным лактогеном, поскольку лактоген не был обнаружен в трофобласте овец до 16—17-го дня суягности. Были идентифицированы антилютеолитические компоненты трофобласта на 14—16-й день суягности, и называли его трофобластином. Интенсивность секреции прогестерона у коров, овец и свиней идет быстрее, чем лютеотропина или антилютеолизина, при самом раннем физиологическом проявлении беременности.

Эмбрионально-специфические антигены тем не менее были обнаружены в материнской крови у коров, овец и свиней от очень ранних стадий эмбрионального развития до 6-го дня, хотя в этом случае не был выявлен лютеотропный эффект. Специфические белки были обнаружены также в эндометрии маточной слизи коров при наличии 15-дневных бластоцист.

При последовательном предотвращении циклов лютеолизиса у свиней супоросность можно установить с 10—12-го дня. Введение экзогенного эстрадиола в это время вызывает лютеотропный эффект. Было сделано предположение, что эстрон синтезируется и секретируется бластоцистами свиней с 12-го дня супоросности, затем образует соединение с сульфатом в эндометрии, транспортируется в яичники и гидролизуется опять в активный эстрон, который может обеспечивать лютеотропную стимуляцию.

Систематическим определением уровня эстрона сульфата было показано его возрастание после 16-го дня супоросности. Это указывает на то, что эмбриональные эстрогены у свиней могут обеспечивать антилютеолитическое влияние маточного простагландина через маточную вену в маточное сплетение.

В результате гистохимических исследований установлено, что эмбрионы лошадей также могут ограничивать метаболизм стероидов после 13-го дня жеребости. Лютеальная активность у суягных овец сохраняется в наименьшей степени в виде местной связи между рогом матки и смежным яичником. Эмбрион может влиять на гормональное выделение лютеотропина через матку или тормозить его синтез в матке. В ранний период развития беременности высок его маточно-овариально-венозный уровень. Лютеолизин на 12—16-й день беременности или отсутствует, или его уровень очень сильно снижается по отношению к уровню в период эстрального цикла. Простагландин F_2 может противодействовать лютеолитической активности простагландина $F_{2\alpha}$. Это подтверждает предположение, что простагландин

F_2 может быть потенциальным маточным антилютеолизинном. Выявлено, что синтез простагландина E начинается с 13—14-го дня развития плода у коров.

Материнское взаимодействие способствует росту маточно-сосудистой проницаемости, встречающейся до имплантации. Материнское опознание беременности предшествует имплантации у некоторых домашних животных, и кажется вероятным, что лютеотропин выделяется плодом и служит одним из самых ранних сигналов прикрепления плода к стенке матки. Природа эмбрионального лютеотропного влияния еще не до конца установлена, но наличие гормона является иммунологическим различием в организмах суягных и несуюгных овец. Это различие может быть определено иммунологически уже через 24 ч после оплодотворения.

Очень раннее определение беременности является преимуществом при искусственном осеменении скота по сравнению с более поздним сроком определения прогестерона в молоке, которое проводят ко времени предполагаемой повторной охоты (повторного осеменения).

Возраст эмбриона определяет время имплантации. Существуют большие морфологические различия между способами имплантации у разных видов животных. У грызунов имплантация характеризуется эрозией маточного эпителия, изъязвлением и отторжением стромы, затем эмбрион внедряется в маточную стенку. У свиней, овец, коров и лошадей контакт между плодом и маткой поверхностный, формируется так называемая эпителиохориальная плацента. У коров и овец она называется синедесмохориальной. Имплантация у овец включает вначале формирование пальцеобразных микронаростов, но последующее плацентарное развитие зависит от формирования хорионических наростов. В этом случае они не имеют прямого контакта между трофобластом, эндометральной стромой и стромальным отторжением.

У всех млекопитающих уровень прогестерона — существенный фактор раннего сохранения беременности, и у большинства видов он является предпосылкой к имплантации.

У крыс и мышей постовуляторный уровень эстрогенов также зависит от необходимости достижения эндометрального статуса, способствующего имплантации и нормальному развитию бластоцисты. У этих видов имплантация бластоцисты сопровождается трансформацией эндометральных стромальных клеток в клетки хориона. В результате отмечается повышение синтеза стромальных клеток, которые способны лишь реагировать на стимуляцию имплантации бластоцисты. При этом восприимчивость достигает определенных величин, но ограничивается постовуляторным периодом и характерен для каждого вида.

В этот период секреты яйцевода и эндометрия активно тормозят прикрепление трофобласта.

Действительно эмбрион может имплантироваться в различных местах, если его трансплантировать в матку. Секреты матки могут быть токсичны для эмбриона, если отсутствует синхронность между развитием эмбриона и желтого тела беременности.

Природа препятствий для имплантации не изучена, хотя может быть связана с маточным эпителием, если он в период от охоты до имплантации оказывается поврежденным. Возможно, это означает, что процесс имплантации в начальной стадии зависит от развития разрешающей способности эндометрия, прежде чем проявляется свойственная трофобласту способность внедрения.

В соответствующее время эпителий, по-видимому, перестает препятствовать внедрению трофобластов, дает возможность развитию имплантации и эмбриона.

Дифференциация эндометрия должна проходить через критические периоды избирательной способности матки к притяжению отдельных синхронизированных бластоцист при трансплантации. Если соответствующих стимулов для внедрения не поступает в течение этого периода, то синтез стромальных клеток быстро сокращается. Эти клетки могут или погибнуть, или преобразоваться в эпителиальные, которые предположительно занимают промежуточное положение с неопределенной стимуляцией для внедрения.

Имплантация может происходить только при наличии прогестерона, что было показано в опытах при овариэктомии и гормональной обработке вскоре после покрытия у различных видов животных (крыс, морских свинок и хомяков, обезьян, овец, коров и свиней). Однако у самок этих видов не исключаются колебания уровня эстрогенов по отношению к норме и может проявляться ограниченный синэргический эффект прогестерона.

Одна из ранних реакций эндометрия на появление бластоцисты — критический рост проницаемости сосудов эндометрия. Несмотря на различные способы имплантации и прикрепления эмбрионов у разных видов животных, природа стимулов к прикреплению и имплантации может быть у всех у них одинаковой, хотя возможности эндометрия по значению могут быть различными. Идея влияния гистамина на изменение сосудистой проницаемости в основном не получила одобрения. Тем не менее задержка имплантации и сосудистой реакции проницаемости может быть достигнута при комбинированном систематическом применении гистамина H_1 и H_2 -рецептора антагониста. Простагландины также могут быть связаны с восстановительной реакцией,

и их синтез в основном подавляется аспирином или индотоксином, видимо жаропонижающим действием.

Децидуальная реакция и сосудистая проницаемость могут подавляться внутриматочной инфузией индометацина или его подкожной инъекцией. Эффект недавней обработки указанными препаратами может быть предотвращен последующей интраперитонеальной инъекцией простагландина $F_{2\alpha}$, который связан с гистамином. Децидуализация может быть вызвана у неполовозрелых крыс внутрилегочным введением простагландина $F_{2\alpha}$ и у кроликов — внутриматочной инфузией простагландина $F_{2\alpha}$ и E_2 .

Простагландины E_2 и $F_{2\alpha}$ действуют антагонистически. Действие простагландина E_2 в основном связано с сосудорасширяющей функцией. Вызывание реакции имплантации простагландином E_2 и $F_{2\alpha}$ возможно, и оно связано с высокими его дозами. Простагландин E_2 вызывает более сильную децидуально-клеточную реакцию, чем простагландин $F_{2\alpha}$. Кроме того, простагландин $F_{2\alpha}$ может подавлять травматические последствия у крыс, обработанных различными гормонами.

Циклические нуклеотиды находятся, по-видимому, под контролем простагландинов, и они известны как контрлатеральный фактор в дифференциации и пролиферации клеток. Тем не менее маловероятно, что циклические нуклеотиды обеспечивают установленную бластоцистой децидуальную стимуляцию и что от них в первую очередь зависит начало имплантации. Возрастание уровня маточного циклического нуклеотида в тканях у крыс совпадает с повышением уровня эстрадиола после охоты и началом имплантации.

Возрастание уровня стромального митоза считается нормальным. Это происходит в том случае, если циклический уровень аденозинмонофосфата (АМФ) падает или остается без изменений. Подобная взаимосвязь между уровнем циклического АМФ и клеточным митозом обнаружена и в других системах. Развитие бластоцисты задерживается, если наблюдается накопление уровня циклического АМФ, вызванного при культивировании с теофиллином. Подавление распада интрацеллюлярных клеток циклического АМФ и отсутствие имплантации эмбриона после применения циклического АМФ обусловлены более ранним непосредственным его влиянием на эмбрион, чем недостаточным влиянием на эндометрий.

В большинстве случаев циклические нуклеотиды не принимают участия в децидуогенезе, но это, очевидно, противоречит той роли, какую они выполняют в имплантации. Циклические АМФ могут ускорять имплантацию у мышей, сохранившуюся в экспериментальной диапаузе. Последующее введение масляного раствора прогестерона вызывает децидуализацию, что, возможно, аналогично изменениям, происходящим при приме-

нении эстрогена, когда матка находится под влиянием прогестерона. По сравнению с этим вызванная травмой децидуола зависит от введения масляного раствора прогестерона. Возможно, АМФ может имитировать действие эстрадиола при введении прогестерона в чувствительную матку. Циклическая АМФ вызывает морфологические изменения в диапаузальной бластоцисте, что обычно происходит после активации эстрогенами перед имплантацией. Активация бластоцисты может быть достигнута в результате непосредственного воздействия циклического АМФ, вследствие чего снижается ингибирующее влияние на имплантацию, характерное для эпителия в течение диапаузы.

Действие эстрадиола и АМФ подобно их влиянию на синтез специфических белков матки. Очевидные изменения в уровне циклического АМФ в матке, видимо, связаны с эстрогенами. Такие изменения не являются прямым результатом воздействия эстрогенов, тем не менее различные ранние возможности матки не зависят от применения эстрадиола и циклического АМФ. Повышение уровня циклического АМФ в основном связано с подавлением клеточной пролиферации.

Предимплантационные бластоцисты принимают участие в метаболизме стероидов в культуральной среде. Начало имплантации регулируется стероидами (особенно эстрогенами), синтезируемыми и секретируемыми предимплантационным зародышем. В течение эстрального цикла предовуляторный яичниковый эстрадиол стимулируется подобным образом, но меньше локализуется в эндометриальной строме, где происходит имплантация. Вероятно, в течение чувствительной фазы, когда возможна имплантация, секреция стероидов бластоцистой происходит локализованно, и излишне подчеркивать возможности матки, связанные с началом имплантации.

Секреция эстрогена эмбрионом — основной фактор начала имплантации. Установлено, что локализованный выход эстрадиола у предимплантационных эмбрионов крыс может вызывать местное увеличение сосудистой проницаемости, если бластоциста не синхронизирована и была трансплантирована в матку на 5-й день псевдобеременной крысы. Метаболизм стероидов в постимплантационный период у плода связан с двухъядерными гигантскими клетками трофобласта, особенно у грызунов. Развитие эндоплазматической сети и зоны Гольджи связано также с гигантскими клетками трофобласта у домашних животных.

Двухъядерные клетки трофобласта могут быть найдены с 17-го дня стельности у коров, с 16-го дня суягности у овец, и их появление связано с ранним периодом прикрепления. Ко времени имплантации бластоциста кроликов развивается до двухслойного пузыря, подобным образом она развивается у овец, коров и свиней. Сульфат эстрола был обнаружен в ма-

точной жидкости беременных свиней с 20-го дня, овец и коров — с 27—40-го дня.

У свињи сульфат эстро́на, вероятно, синтезируется в результате воздействия сульфотрансферазой на эндометральный эстроген, а эстроген, синтезируемый плодом, появляется раньше. Это указывает на то, что трофобласт свиней обладает очень высокой сульфатазной активностью в указанное выше время. Если зародыш овец и крупного рогатого скота подобным образом гидролизует сульфат эстрогена, то уровень сульфата эстро́на в период прикрепления кажется менее важен, чем количество свободного эстрогена, синтезируемого эмбрионом.

При имплантации эмбриона отмечено образование андростенедина, тестостерона и эстрадио́ла из (третичного) тестостерона. Определенного уровня их концентрация достигает лишь во время имплантации на 6-й день. Наличие эстрадио́ла наблюдается на 7-й день. Стероиды в бластоцисте и маточной жидкости беременных и псевдобеременных крыс на 5—6-й день одинаковы. С 5-го дня уровень прогестерона и 20-дегидропрогестерона в бластоцисте выше, чем в материнской плазме. Маточная жидкость в это время аккумулирует значительное количество прогестерона и меньше эстрогена, по-видимому, от яичника. Уровень гормонов обуславливается бластоцистой благодаря селективной абсорбции стероидов, содержащихся в маточной жидкости. Это подтверждено измерениями уровня гормонов в бластоцистах крыс на 6—7-й день, в сыворотке крови матери и маточной жидкости.

Концентрация прогестерона в нормальных бластоцистах обусловлена материнским яичником. Незначительное количество прогестерона в бластоцистах у овариоэктомированных животных указывает на новый синтез его бластоцистой или материнской адренаминовой активностью. Эстро́гены бластоцисты могут также частично исходить из материнского источника. Таким образом, изменение стероидов между плодом и эндометрием играет большую роль в контроле перехода от собственного питания к плацентарному. Эмбрион может влиять на стероидные гормоны независимо от источника и природы стероидов в маточной жидкости. У коров и овец развиваются изменения в эндометрии в период прикрепления (карункулы) и внутрикарункулярные регионы.

У некоторых видов животных эмбриональная смертность в предимплантационный период достигает высокого уровня, и это явление пока не изучено. Последние наблюдения по гормональному взаимодействию между зародышем и маткой у лабораторных животных раскрывают некоторые причины эмбриональной смертности зародышей. Предимплантационный период зародыша — один из самых критических.

ЭНДОКРИННЫЕ АСПЕКТЫ МЕХАНИЗМА МАТЕРИНСКОГО ОПОЗНАНИЯ БЕРЕМЕННОСТИ В СВЯЗИ С ПРИЖИВЛЯЕМОСТЬЮ ЭМБРИОНОВ ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ

Нормальная беременность обеспечивается при наличии биохимических взаимосвязей между плодом (эмбрион и экстраэмбриональные мембраны) и нижележащими слоями эндометрия. Критическая ситуация этих взаимосвязей определяется двумя основными условиями. Во-первых для успешного приживления эмбрионов при пересадке необходима точная синхронность (± 1 сутки) эстральных циклов донора и реципиента. Во-вторых, обязательно наличие хорошо развитого циклирующего желтого тела в яичнике. Процесс, при котором прикрепляющийся к стенке матки зародыш сигнализирует о своем существовании желтому телу яичника, называется «материнским опознанием беременности». Объективно он характеризуется сохранением желтого тела у коровы и интенсификацией потенциального механизма, при котором зародыш вызывает процесс материнского опознания беременности.

Известно, что в матке коровы синтезируется простагландин $F_{2\alpha}$ — эндогенный маточный лютеолизин, а желтое тело яичника продуцирует лютеолитик — экзогенный простагландин $F_{2\alpha}$. Основным субстратом для синтеза простагландина $F_{2\alpha}$ является арахидоновая кислота, которая имеется в большом количестве в эндометрии между 10-ми и 14-ми сутками эстрального цикла. Высокая концентрация кислоты предшествует возрастанию количества простагландина $F_{2\alpha}$ с 15-суточного цикла в маточной жидкости, тканях эндометрия и венозной плазме матки. Пассивная иммунизация против простагландина $F_{2\alpha}$ на 16-е сутки эстрального цикла предотвращает лютеолизис.

У простагландина $F_{2\alpha}$ очень короткий период полураспада, который связан с метаболизмом таких тканей, как легкие и эндометрий. Об уровне простагландина $F_{2\alpha}$ судят по содержанию в периферической плазме или сыворотке первичных метаболитов 15-кето-13,14-дигидро-простагландина $F_{2\alpha}$ (ПГФМ).

Изменение концентраций простагландина FM в периферической крови связано с уровнем секреции маточного простагландина $F_{2\alpha}$ и количеством простагландина $F_{2\alpha}$, извлеченного из маточной жидкости. Кроме того, высокий пик простагландина FM связан с временным снижением его концентрации в плазме крови в течение лютеолизиса. Таким образом, лютеолизис связан с секрецией маточного простагландина $F_{2\alpha}$.

Секреция простагландина $F_{2\alpha}$ снижается в течение раннего периода беременности. Так, у молочных коров и самок буйволов эпизодические пики простагландина FM связаны с лютеолизисом у животных с повторяющимися эстральными циклами, а у беременных самок простагландин FM отсутствовал.

Использованием нового способа пересадки 16-суточных эмбрионов (вышедших из зоны пеллюцида) проверена возможность определения эффективности пересадки по уровню секреции простагландина FM (Betteridge и др., 1980).

Коровам-реципиентам, у которых за 15 суток до этого закончилась охота, провели билатеральную хирургическую пересадку свежеполученных 16-суточных эмбрионов. Контрольным реципиентам были пересажены 15-суточные эмбрионы, зафиксированные в формалине. Для двух реципиентов эмбрионы были подвергнуты отмыванию. У трех реципиентов наступил лютеолизис (2 — контроль и 1 — обработанная). У каждого из этих реципиентов наблюдалось 4—5 пиков уровня простагландина FM , связанных с лютеолизисом. Отмечено отсутствие или снижение пиков простагландина FM в плазме крови у реципиентов на 24-е сутки, если у них было персистентное желтое тело. Только у тех коров-реципиентов, от которых были получены телята, наблюдалось четкое снижение числа эпизодических пиков простагландина FM . Очевидно, эпизодическая секреция простагландина FM отмечается в разные дни через 1-, 2- или 3-часовые интервалы.

Для определения уровня секреции маткой простагландина $F_{2\alpha}$ у циклирующих и беременных животных проводили ее индуцирование с помощью внутривенного введения эстрадиола (3 мг); реакцию оценивали в течение 10 ч с 30-минутным интервалом. На 18-е сутки после охоты и осеменения концентрация простагландина FM через 6,5 ч после инъекции эстрадиола составляла у беременных коров $362,8 \pm 84,3$ нг/мл, у нестельных — $724,3 \pm 136,8$. Таким образом, при наличии стельности эстрадиол не вызывает увеличения количества простагландина $F_{2\alpha}$.

Определение содержания 11-кетотетранора метаболита простагландина F в моче у телок (с постоянным катетером) с контролем суточной концентрации 11-кетотетранора в течение эстрального цикла, в начале стельности, во время аборта, вызванного инъекцией клорпростенола, и после пересадки эмбрионов показало, что в ранний период стельности у животных отмечалось отсутствие пиков концентрации метаболитов в моче. Содержание метаболитов простагландина в моче возрастало на 20-е сутки стельности и значительно превышало их количество в начальный ее период. Постепенное повышение содержания метаболитов в моче может быть связано с аккумуляцией простагландина $F_{2\alpha}$, вызванной зародышем.

При 24-часовом культивировании *in vitro* зародышей коров 16—19-суточного возраста получены более высокие показатели концентрации простагландина $F_{2\alpha}$ и простагландина E_2 в расчете на 1 мг ткани (66 и 248 нг/мг), чем в соскобах со слизистой эндометрия рога матки при наличии желтого тела в яич-

нике и со слизистой противоположного рога матки (0,6 и 2,1 нг/мг). Следовательно, ткань эндометрия более активно синтезирует простагландин $F_{2\alpha}$, чем ткани зародыша.

Синтез простагландина $F_{2\alpha}$ и простагландина E_2 зародышем возрастает с нарастанием срока беременности. В маточной жидкости стельных коров простангландинов значительно больше, чем у коров с повторяющимися эстральными циклами и нестельных. Отдельные ткани эндометрия синтезируют значительно больше простагландина $F_{2\alpha}$, чем ткани зародыша. Эндометрий может регулировать соотношение различных простагландинов, так же как и количество оставшегося простагландина в матке в течение раннего периода беременности. У телок на 17-е сутки стельности концентрация простагландина FM в венозной плазме выше, чем у нестельных телок, что отражает метаболизм в эндометрии простагландина $F_{2\alpha}$, секретируемого бластоцистами.

Непрерывный синтез зародышем простагландина $F_{2\alpha}$ и его метаболизм, вероятно, являются источником увеличения концентрации в моче метаболитов 11-кетотетранора простагландина F после 20 суток беременности. Таким образом, представленные данные свидетельствуют о том, что наличие зародыша в роге матки способствует изменению секреции простагландина $F_{2\alpha}$. Вероятно, антилютеолитический эффект плода вызывает снижение способности тканей эндометрия стельных коров к секреции простагландина $F_{2\alpha}$. Это взаимодействие и определяет время материнского опознания беременности в лютеостатический период или сохранения желтого тела. Следовательно, ткани зародыша — источник антилютеолитического материала, и этот эффект эндометрия и функции желтого тела необходим для поддержания стельности.

Появление зародыша обеспечивает обмен веществ в матке по эмбриотрофическому пути, при котором необходимо наличие желтого тела. Природа сигналов, исходящих от зародыша, была определена в серии опытов. Внутриматочная инфузия гомогената зародыша (17—18-суточного) на 15—18-е сутки цикла замедляет снижение в периферической крови содержания прогестерона, что связано с регрессией желтого тела (Godkin и др., 1982). У животных, которым вводили гомогенат зародыша, удлинялся межэструсовый интервал до 24 суток по сравнению с интервалом в 21 сутки у контрольных. В это время (до периода материнского опознания беременности) у зародыша уже имеются эмбриональный диск и трофобласт, который приблизительно в 50 раз длиннее, чем эмбриональный диск. У зародышей 14-суточного возраста, полученных от суперовулировавших коров-доноров и находящихся на очень ранней стадии удлинения трофобласта, был отделен эмбриональный диск, а трофобласт подвергали культивированию при температуре

38 °С в течение 24 ч. В трофобластических тканях формировались сферические пузыри (трофобластические пузыри) размером 0,4—2 мм. По одному или по два 14-суточных трофобластических пузыря были пересажены нехирургическим способом подопытным телкам-реципиентам в среднюю треть рога матки при наличии желтого тела в яичнике.

Опыт показал, что желтые тела сохранились у 8 из 12 реципиентов с различными межэструсовыми интервалами — от 25 до 37 суток. Это говорит о том, что сигналы зародыша, вероятно, подавляют лютеолизис, и это совпадает с появлением трофобласта. Антилютеолитический эффект трофобластических пузырей может иметь различное практическое применение, связанное с пересадкой эмбрионов. Известно, что гибель эмбриона сопровождается разрушением эстраэмбриональных мембран, наличие которых, по-видимому, способствует удлинению эстральных циклов после пересадки эмбрионов. Вероятно, пересадка трофобластических пузырей или дополнительных трофобластических тканей, полученных от нормальных эмбрионов, может повысить выживаемость зародышей в условиях недостаточной секреции эмбриональных мембран.

При проверке специфической природы секретируемых зародышем продуктов, сохраняющих желтое тело, оценивалась его функция у коров в увеличении концентрации прогестерона в плазме крови и продолжительности эстральных интервалов. Для этого применялось внутриматочное введение смеси белков, секретируемых зародышем. У коров с повторяющимися эстральными циклами наблюдалось увеличение продолжительности функции желтого тела до 30 сут по сравнению с 22 сут в контроле. Внутриматочное введение белков зародыша не оказывало стимулирующего воздействия на лютеальный синтез прогестерона (лютеотрофный эффект), однако влияло на антилютеолитический эффект, что сопровождалось увеличением срока существования циклического желтого тела.

Основной стероид, синтезируемый зародышем, не оказывает влияния на продолжительность существования циклического желтого тела у коров, обработанных сывороточными белками. Эти результаты показывают, что белки, секретируемые зародышем, — необходимый компонент для сохранения желтого тела в течение раннего периода беременности. Предполагают, что белки, секретируемые зародышем, оказывают влияние на потенциальную антилютеолитическую эффективность за счет снижения секреции маточного простагландина $F_{2\alpha}$.

Средняя концентрация простагландина FM после инъекции эстрадиола E_2 резко снижается, что подтверждает роль белков, синтезируемых зародышем, в подавлении секреции простагландина $F_{2\alpha}$ маткой в период материнского опознания беременности у коров.

Инкубация тканей зародышей коров *in vitro*, при наличии радиомаркированных аминокислот и анализе маркированных веществ в тканях и средах после инкубации, оказалась надежным методом выявления различных белков и полипептидов, синтезируемых зародышами в предимплантационный период. Так, в среде при постинкубационном анализе не подвергшихся диализу радиомаркированных компонентов были найдены методом электрофореза в геле полиакриламида (2Д-PAGE) и флюорографией маркированные белки, синтезируемые в течение культивирования. Кроме того, различные маркированные вещества были обнаружены в незначительном количестве и в тканях. Такое распределение белков свидетельствует о том, что основные секреторные продукты зародыша могут быть обнаружены в незначительном количестве в экстракте тканей.

Установлено, что зародыши коров способны синтезировать различные полипептиды *in vitro*, если они извлечены до 16 суток беременности. Так, в культуральной среде с 16-суточными зародышами была получена группа кислых полипептидов с низкой молекулярной массой. Синтез и расщепление этих полипептидов у ранних экспандированных 16-суточных зародышей подтверждают их трофобластическое происхождение и возможность включения в процесс раннего определения беременности.

Последующие исследования показали, что белки, синтезируемые овечьими зародышами, могут быть биоактивными у коров. Было пересажено два трофобластических пузыря размером 0,5—2 мм от 11- и 13-суточных овечьих зародышей 10 телкам-реципиентам. У двух телок было отмечено увеличение продолжительности эстрального цикла на 10 и 15 суток. В опыте по пересадке 11 овцам каждой по два трофобластических пузыря, полученных от 13-суточных зародышей коров, у двух овец продолжительность эстральных циклов увеличилась до 38 суток. Эти межвидовые пересадки, приводящие к удлинению эстрального цикла, подтверждают мнение о том, что антилютеолитические белки аналогичны у коров и овец. Внутриматочное введение коровам белков, секретируемых зародышами овец, также приводило к продлению функции желтого тела и к подавлению секреции маточного простагландина $F_{2\alpha}$, взаимодействующего с эстрадиолом E_2 . Ответная реакция на белки у овец была такой же, как и у коров (Martal и др., 1984).

Несмотря на множество белков, синтезируемых зародышем на ранней стадии развития, они могут быть идентифицированы, как белки, синтезируемые *in vitro* зародышами овец между 13-ми и 21-ми сутками беременности. Один из таких белков — овечий трофобластический (ОТБ-1) — был очищен, он имел низкую молекулярную массу ($M_r 10^{-3} \approx 20$) и был кислотным полипептидом (pH 5,5). На ОТБ-1 была приготовлена кроличья антисыворотка, и последующая реакция на антисыворотку,

включая ОТБ-1, была идентифицирована. Установлено, что ОТБ-1 локализовался в клетках трофэктодерма. Он аккумулировался в эпителии эндометрия овец на 16-е сутки суягности. ОТБ-1 оказывал положительное влияние на существование желтого тела в яичнике.

Аналогичные белки, даже не полностью очищенные от кроличьей антисыворотки, приготовленной на ОТБ-1, были использованы для изучения иммунологических особенностей белков, секретируемых зародышами коров. Двойной иммунодиффузионный анализ показал, что антисыворотка соединяется двойной связью с нефракционируемыми белками, секретируемыми зародышами коров. В одной из двух связей обнаружена частичная идентичность с одним из очищенных ОТБ-1 или нефракционируемыми белками, секретируемыми зародышами овец (Martal и др., 1984).

Эти результаты свидетельствуют о частичной гомологичности между низкомолекулярными кислотными белками, полученными от ранних зародышей овец и коров. Такая схожесть может объяснить реакцию сохранения лютеальной фазы у овец и коров при межвидовой пересадке трофобластических пузырей. Подобный механизм может существовать при материнском опознании беременности у овец и коров.

В хорошем состоянии гомогенаты зародыша должны поддерживать функцию желтого тела. По-видимому, их основное назначение — закрепление зародыша на эндометрии. Имеющиеся данные показывают, что секретируемые зародышами коров белки синтезируются трофобластом и оказывают непосредственное влияние на эндометрий, вызывая процесс, называемый материнским опознанием беременности. Множество белков, секретируемых зародышем, вероятно, подавляют секрецию простагландина $F_{2\alpha}$ и тем самым способствуют сохранению желтого тела, то есть ослаблению реакции простагландина $F_{2\alpha}$, которая вызывается эстрадиолом E_2 у коров при внутриматочной диффузии. Приведенный механизм этого воздействия свидетельствует о том, что непосредственно или косвенно белки, синтезируемые зародышами коров, подавляют фосфолипазу A_2 эндометрия и (или) активность циклооксигеназы. В эндометрии коров содержится ингибитор биосинтеза простагландина. Кроме того, в материнских тканях карункулов плаценты коров содержится ингибитор биосинтеза простаноида. Зародыш подавляет простагландины генеративной системы эндометрия, что обеспечивает блокировку лютеолизиса.

Предполагают, что белки, секретируемые зародышем, избирательно стимулируют белок эндометрия и подавляют синтез простагландина $F_{2\alpha}$. У овец белок, синтезируемый трофобластом, способствует возрастанию числа специфических белков, расщепляющихся в среде эндометрия на 12-е сутки эстрального

цикла. Механизм воздействия этих белков на биосинтез простагландинов пока неизвестен.

Индукция зародышем протенинов эндометрия, подавляющих синтез простагландина $F_{2\alpha}$, позволяет зародышу самому осуществлять непрерывный активный биосинтез простагландинов, ослабляющих синтез простагландина $F_{2\alpha}$ эндометрия, что обеспечивает сохранение желтого тела. Была предложена модель (Mc. Ogasken, 1984) регулирования синтеза простагландина $F_{2\alpha}$ в матке овец, с помощью которого установлено, что эстрадиол E_2 стимулирует синтез рецепторов окситоцина эндометрия, в результате чего происходит связывание окситоцина (гипофизарного или желтого тела). Одновременно возрастает активность аденилциклазы, что обеспечивает возрастание активности фосфолипазы A_2 . Свободная арахидоновая кислота, являющаяся метаболитом простагландина $F_{2\alpha}$, вызывает местный лютеолитический эффект, направленный на желтое тело через секрецию в яичнико-маточную вену и через противоположный обмен в артериальные сосуды яичника. Однако предложенная модель требует дальнейшей проверки.

Итак, белки, синтезируемые зародышем, изменяют регуляцию синтеза простагландина $F_{2\alpha}$ благодаря индукции белков эндометрия, подавляющих синтез простагландина $F_{2\alpha}$, или изменяют биосинтез простагландинов или стероидные рецепторные взаимосвязи, что приводит к возбуждению рецепторов окситоцина. Кроме того, белки, секретируемые зародышем, могут непосредственно взаимодействовать с рецепторами окситоцина. Таким образом, доказана роль эмбриона в трансформации желтого тела цикла в желтое тело беременности. При этом безусловным аспектом в обеспечении плодотворного течения стельности у коров служит целостность эндокринных и биохимических взаимосвязей между организмом матери и плодом. Однако механизм действия такой крайне необходимой регуляторной системы у крупного рогатого скота, как материнское опознание беременности, еще не полностью раскрыт и требует дальнейшего изучения, особенно в связи с актуальностью проблемы повышения приживляемости при нехирургической пересадке свежеполученных и замороженно-оттаянных эмбрионов.

КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЕ ЭМБРИОНОВ

При замораживании эмбрионов млекопитающих существенную роль в сохранении их жизнеспособности играет зона пеллюцида. Образование кристаллов льда в окружающей среде обуславливает увеличение осмотического давления в жидкости, которое может уравниваться или проникновением солей внутрь эмбриона, или выведением воды из него.

Устойчивость формы блестящей зоны, состоящей из мукопротеинов, располагает скорее к первому варианту эквilibрации, тогда как само зародышевое тело подвергается сжатию и в процессе замораживания дегидрирует к понижению эвтектической температуры. При медленном охлаждении и оттаивании биообразцов смена жидкой и твердой фаз в клетках протекает так, что их структуры не повреждаются и клетки сохраняют жизненные свойства.

Низкотемпературное консервирование эмбрионов сельскохозяйственных животных для последующей их трансплантации имеет большое практическое значение. Оно дает возможность длительное время сохранять ценный генетический материал, отпадает необходимость в содержании больших стад реципиентов, значительно упрощает экспорт и импорт эмбрионов. Становится возможным сохранение генофонда редчайших и исчезающих пород животных.

Предпосылкой криобиологической технологии эмбрионов является принцип сохранения изолированных клеток в суспензиях, например спермиев, эритроцитов, лимфоцитов и различных линий культивируемых клеток. Тем не менее различным типам и колониям клеток присущ свой режим охлаждения и оттаивания, и они могут быть изменены в соответствии со спецификой клетки.

Важнейший фактор в процессе замораживания эмбрионов — скорость охлаждения, которая для многих клеток составляет 1°C в мин. Однако оптимальная скорость охлаждения, обеспечивающая максимальный уровень выживаемости для разных типов клеток, значительно варьирует для эмбрионов различных видов животных. Например, для эмбрионов мышей она равна $0,3^{\circ}\text{C}$ в мин, для эритроцитов человека — 800°C в мин.

Большое влияние на жизнеспособность клеток оказывает и скорость оттаивания, которая зависит от скорости охлаждения. При быстром охлаждении уровень выживаемости выше в условиях быстрого оттаивания, при медленном охлаждении требуется медленное оттаивание.

МЕХАНИЗМ ПРОЦЕССА ЗАМОРАЖИВАНИЯ ЭМБРИОНОВ

В период охлаждения эмбрионов до минусовых температур в определенный момент начинается льдообразование. Происходит это в первую очередь в среде, окружающей клетку. По мере понижения температуры нарастает количество экзоцеллюлярного льда, что сопровождается повышением концентрации солей в оставшемся растворе. В результате возникает разница осмотического давления в экзоцеллюлярной и эндоцеллюлярной фазах. Процесс уравнивания обеспечивается осмотической реакцией клетки, отдающей воду во внеклеточную среду.

При определенном режиме охлаждения, с известной величиной начального объема воды в клетке, а также ее площадью поверхности, степенью проницаемости мембран и температурным коэффициентом проницаемости можно вычислить объем клеточной воды на данном этапе замораживания как функцию минусовых температур.

Если клетку охлаждают достаточно медленно, то она по мере понижения температуры будет постоянно терять воду до количества, равного по осмотическому давлению экзоцеллюлярному раствору. Затвердевание раствора наступает в эвтектической точке температурной кривой. Эвтектическая кристаллизация растворов электролитов заметно тормозится добавлением глицерина, диметилсульфоксида (ДМСО), способных связывать воду и понижать тем самым точку эвтектики. Соли при этом остаются в водном растворе в виде сложного комплекса и при дальнейшем понижении температуры затвердевают в стекловидную массу.

При охлаждении клетки в быстром режиме ее система не успевает регулировать осмотическое равновесие, и по мере понижения температуры содержимое клетки оказывается в условиях растущего переохлаждения. В определенный момент начинается кристаллизация воды внутри самой клетки. Такое эндоцеллюлярное образование льда рассматривается во многих работах как первичный фактор, обуславливающий гибель клетки во время замораживания.

Метод сохранения эмбрионов включает в себя очень медленное охлаждение, замораживание и оттаивание. Однако технология предусматривает и быстрое оттаивание и две ступени замораживания, которые находятся на стадии разработки и могут значительно упростить процедуру замораживания.

Цель глубокого замораживания клеток и тканей — остановить их метаболизм в обратимой степени, с сохранением структуры, временным прекращением жизнедеятельности. Основа криобиологической техники замораживания эмбрионов млекопитающих — сохранение изолированных клеток в суспензиях (спермиев, эритроцитов, лимфоцитов и различных линий культивируемых клеток).

Принципы сохранения биообъектов основаны на криобиологической характеристике этих объектов, и поэтому нет необходимости полностью касаться других типов клеток. Тем не менее для разных типов и колоний клеток требуются различные режимы глубокого замораживания.

В некотором смысле поздние морулы и бластоцисты — миниатюрные организмы, клеткам которых, несмотря на их подобие, присуща в определенной степени дифференциация относительно их расположения и функции.

Жизнеспособность эмбрионов зависит не только от выживаемости отдельных клеток, но и от сохранности их отдельных структур. Существование зоны пеллюцида, перивителлинового пространства, бластополости и различия в распределении экстрацеллюлярной жидкости могут в дальнейшем осложнить криобиологию этих развивающихся систем. Эмбрионы мышей могут служить в качестве основной модели по изучению выживаемости зародышей после охлаждения, замораживания, хранения и оттаивания.

У эмбрионов крупного рогатого скота на разных стадиях развития в большинстве случаев ухудшается выживаемость после охлаждения до температуры ниже 15°C . Возрастание толерантности при низких температурах совпадает тем не менее с компактностью и бластуляцией эмбрионов.

Эти наблюдения способствовали разработке классического низкотемпературного метода замораживания эмбрионов крупного рогатого скота и овец, сущность которого состоит в насыщении при комнатной температуре в три этапа температуры в среде диметилсульфоксида (ДМСО) 0,5 М и 1,0 М по 10 мин в каждом и 1,5 М растворе в течение 20 мин, затем быстрое охлаждение до -6°C со скоростью 1°C в мин, принудительная кристаллизация и дальнейшее замораживание до 36°C со скоростью $0,3^{\circ}\text{C}$ в мин, затем $0,1^{\circ}\text{C}$ в мин до -60°C , после чего биообъект переносят в жидкий азот на хранение.

Медленная скорость замораживания ($0,1^{\circ}\text{C}$ в мин) в промежутке от -36° до -60°C теоретически позволяет максимально ограничить дегидратацию отдельных бластомеров, и это дает возможность избежать или видоизменить образование внутриклеточного льда. Такая скорость замораживания вызывает необходимость и медленного оттаивания в том же интервале. Слишком быстрое оттаивание приводит к повреждению клеток из-за неадекватности времени, свойственной для регидратации, к возрастанию осмотического стресса (внутриклеточная гипертония) и повреждению клеточных мембран и органондов.

Вода в клетках остается в виде стекловидной формы образований, снижая сохранность эмбрионов при -196°C . Эти наблюдения согласуются с известной теорией о льдообразовании в клетках при замораживании. После температуры -35°C и дальнейшем быстром охлаждении эмбрионов до -196°C они способны сохранять жизнеспособность при условии быстрого оттаивания. Однако если начать медленное оттаивание при температуре -100°C , то жизнеспособность эмбрионов, помещенных в нормальные условия, теряется при -60 и -50°C . Это и есть критическое состояние биообъектов, при котором происходят процессы девитрификации воды, ведущие к образованию внутриклеточных кристаллов льда, убивающих эмбрионы.

При этом наблюдается рекристаллизация и в окружающей эмбрион среде, состоящей из криопротектора ДМСО и среды Дюльбекко. Вышедшая из клетки вода не успевает выравняться по концентрации солей с окружающим раствором. В определенный момент вся поверхность эмбриона покрывается чистой водой, что может быть причиной рекристаллизационных процессов, наблюдаемых на внешней стороне оттаиваемого зародыша.

Среда с эмбрионами находится в ампуле, помещаемой в охладитель, температура которого понижается с заданной скоростью. При достижении точки замерзания среды она, как правило, замерзает не сразу. Происходит некоторое переохлаждение, обусловленное отсутствием в среде кристаллизационных центров, на которых могли бы образовываться кристаллы. Лишь при охлаждении на несколько градусов ниже точки замерзания начинается внезапное образование кристаллов. Высвобождающееся при этом кристаллизационное тепло быстро поднимает температуру от точки кристаллизации до точки замерзания, что создает большой перепад температуры между средой и охладителем и приводит снова к быстрому охлаждению среды на несколько градусов от уровня температуры охладителя.

Можно избежать переохлаждения среды, если при достижении точки замерзания или сразу же по прохождении ее появляются кристаллизационные центры, для чего в раствор вводят небольшой кристаллик льда. Этого можно достигнуть и путем сильного внешнего охлаждения стенки ампулы, например, обжатием пинцетом, предварительно охлажденным в жидком азоте. При этом вначале образуется кристаллизационное облако, а затем — кристаллизация по всей ампуле.

Точка замерзания разбавленного раствора ниже 0°C , и тем ниже, чем выше концентрация разведенных веществ. При замерзании раствора выделяется чистая вода в виде кристаллов льда, растворившиеся же вещества по-прежнему остаются в растворе. С вымерзанием части воды концентрация растворившихся веществ в оставшейся жидкой фазе возрастает, в связи с чем точка замерзания жидкой фазы понижается. При дальнейшем охлаждении оставшаяся чистая вода вымерзает и все больше возрастает концентрация солей в оставшейся жидкой фазе, пока, наконец, раствор полностью не замерзнет на эвтектической точке.

Эмбрион, который на 20% состоит из твердых составных частей и на 80% из воды, подвержен двум негативным влияниям — образованию интрацеллюлярных кристаллов и воздействию высоких концентраций солей. В связи с повышением концентрации соли в частично замерзшей среде из эмбриона выделяется вода, и в результате в нем повышается количество интрацеллюлярной жидкости, а точка замерзания понижается. При медленном обезвоживании эмбриона затрудняется образо-

вание льда. Предпосылка того — медленное охлаждение, при котором достаточно времени для выделения воды. Подходящей скоростью охлаждения, обеспечивающей медленную отдачу воды, является $0,3^{\circ}\text{C}$ в мин.

При быстром изменении температуры в период заморозки переохлажденной среды в ампуле с эмбрионом эта скорость значительно бы увеличилась. Поэтому принудительная кристаллизация нужна для того, чтобы избежать интрацеллюлярного образования льда. При оттаивании обезвоженных клеток эмбриона процесс переходит в свою противоположность. Благодаря отсутствию процессов переохлаждения в клетках эмбриона скорость оттаивания может быть больше — примерно 10°C в мин.

МЕХАНИЗМ ПРОЦЕССА ОТТАИВАНИЯ ЭМБРИОНОВ

При оттаивании эмбрионов процессы в нем происходят в обратном направлении. На границе поверхности клетки с окружающей средой возникает концентрационный градиент, который обуславливает движение воды снаружи вовнутрь клетки. Быстрое оттаивание, как правило, ведет к гибели клеток. В этом процессе решающим фактором является осмотический шок. С другой стороны, при сравнительно быстром охлаждении объекта (более 1°C в мин), когда вода не успевает покинуть клетки, медленное оттаивание может быть причиной разрушения клеточных структур в связи с тем, что возникшие кристаллы льда становятся центром рекристаллизации.

В криобиологии известно, что размер кристаллов зависит от скорости замерзания воды. Чем больше скорость снижения температуры, тем больше возникает центров кристаллизации, следовательно, тем мельче будут кристаллы. В связи с этим была сделана попытка определить зависимость между скоростью замораживания эмбрионов и скоростью оттаивания. Выявлено, что двухступенчатое замораживание до -35°C со скоростью $0,3^{\circ}\text{C}$ в мин и далее — непосредственное погружение эмбрионов в жидкий азот более эффективны. Сохранение жизнеспособности эмбрионов при таком режиме замораживания может обеспечить быстрое оттаивание.

В противоположность этому, при медленном замораживании до полного затвердевания биообъекта (до -60°C) более надежным оказалось медленное оттаивание ($4-12^{\circ}\text{C}$ в мин).

Такая закономерность, по-видимому, объясняется дегидратацией и витрификацией при медленном замораживании, с последующей дегидратацией в процессе медленного оттаивания или мелкозернистой кристаллизацией льда внутри клеток в условиях быстрого замораживания с быстрым оттаиванием, сохраняющим жизнеспособность субклеточных структур.

После медленного охлаждения до -30°C и пребывания эмбриона в течение 15 мин при этой температуре ампулу можно погрузить в жидкий азот. В данном случае в эмбрионах образуются маленькие кристаллы льда, которые поначалу безвредны. При медленном оттаивании они превратились бы в большие иглы. Чтобы избежать этого, оттаивание должно происходить быстро.

Таким образом, в итоге многолетних исследований наметилось два направления в разработке методов криоконсервирования эмбрионов сельскохозяйственных животных:

1) медленное охлаждение биообъекта на минусовой температуре, когда процесс замораживания сопровождается дегидратацией клеток с последующим переходом в твердое состояние. Метод медленного замораживания включает и медленное оттаивание эмбрионов, при котором регидратация клеток протекает постепенно и их тонкая структура, а также биохимические и физиологические потенции остаются неповрежденными;

2) эмбрионы при переходе на минусовые температуры медленно охлаждают, приблизительно до $-38 \dots -40^{\circ}\text{C}$, и затем резко замораживают в жидком азоте или другом аналогичном хладагенте. При этом методе полной дегидратации клеток не происходит и поэтому оттаивают их быстро, помещая эмбрионы на несколько секунд на водяную баню при температуре 37°C .

КРИОПРОТЕКТОРЫ ПРИ ЗАМОРАЖИВАНИИ ЭМБРИОНОВ

Во время замораживания постоянно увеличивается концентрация соли в среде и эмбрионе. Электролиты дестабилизируют и воздействуют на клетки мембраны. Криопротекторы — низкомолекулярные неэлектролиты — могут проникать через мембрану клетки. При концентрации 1—2 молекулы на 1 л они могут воспрепятствовать разрушению мембраны, в частности, путем уменьшения концентрации электролита при заданной температуре. Однако криопротектор увеличивает осмолярность среды, поэтому его следует вводить или извлекать постепенно, с тем чтобы между клетками и средой установилось осмотическое равновесие.

Известны различные вещества, обладающие криозащитными свойствами. Их насчитывают около 60. Сюда относятся неорганические соли, сахара, спирты, амиды и такие полимеры, как поливинилпирролидон (ПВП), декстран, полиэтиленоксид (ПЭО), диметилсульфоксид (ДМСО), с различной молекулярной массой.

Классификация криозащитных веществ различна. Имеются три вида криопротекторов: легко проникающие в клетки, не проникающие, но осмотически активные, не проникающие и осмотически неактивные. К первым относят диметилсульфоксид

(ДМСО) и глицерин, ко вторым — сахарозу и к третьим — поливинилпирролидон.

Однако такое разделение весьма условно, поскольку оно может изменяться в зависимости от типа клеток и состава окружающей клетки среды. Существует разделение криофилактиков на структурирующие воду и деструктурирующие ее. Проникающие в клетку криозащитные вещества (глицерин, ДМСО, этиленоксид с молекулярным весом до 400) достаточно широко используют в практической криобиологии.

При добавлении глицерина раствор разбавляют, что приводит к понижению концентрации солей. Точка замерзания раствора при этом заметно снижается, и при образовании льда вода как бы заменяется незамерзшим глицерином. Благодаря этому концентрация солей в жидкой фазе раствора при температуре его замерзания не доходит до опасного уровня. Кроме того, возможно, глицерин, связывая остаток незамерзшей воды, способствует переходу диссоциированных электролитов в молекулярное состояние, щадящее клеточные структуры.

Наконец, глицерин, как и некоторые другие криофилактики, например этиленгликоль, обуславливает снижение точки кристаллизации и при дальнейшем понижении температуры способствует стекловидному затвердеванию замораживаемого объекта. По-видимому, и другие криофилактики (ДМСО) эндоцеллюлярного типа действуют аналогичным образом.

Механизм действия экзоцеллюлярных криопротекторов на клетки при замораживании в настоящее время интенсивно изучается. К ним относятся сахароза, гидроксиэтиловый крахмал, ПЭО высокой молекулярной массы и др. Однако в отношении влияния их на эмбрионы млекопитающих достаточных сведений в литературе не имеется.

Криопротекторы хотя ограничивают и предотвращают криоповреждения, но могут и сами повреждать клетки эмбриона посредством осмотических изменений. Например, при добавлении глицерина в концентрации 1,0—1,4 М очень сильно изменяется осмотическое соотношение в среде от 300 до 1500 осмоль. Только постепенное введение в среду криопротектора в возрастающих концентрациях дает возможность чувствительным эмбрионам достаточно времени для осмотического приспособления. Зона пеллюцида не препятствует проникновению глицерина в бластомеры.

Наиболее подходящие для глубокого замораживания эмбрионов криопротекторы ДМСО в концентрации 1,5 моль и глицерин — 1,0—1,4 моль. Добавляют их в среду с эмбрионами в степени 0,2—0,3 моль. Оптимальная концентрация криопротекторов различна для эмбрионов разных видов животных.

На первом этапе исследований по криоконсервированию эмбрионов крупного рогатого скота использовали медленное ох-

лаждение со скоростью 0,1—0,3 °C в мин от —60 до —120 °C и затем переносят в жидкий азот (—196 °C), оттаивание со скоростью от 2 до 10 °C в мин. В качестве криопротектора использовали ДМСО в 1,5-молярной концентрации. Выживаемость эмбрионов в разных опытах колебалась от 40 до 80%. Однако стельность после пересадки замороженно-оттаянных эмбрионов составляла от 20 до 40%. Только в отдельных опытах был достигнут высокий процент стельности при хирургической пересадке.

В дальнейшем было выявлено, что глицерин в концентрации 1 моль менее токсичен, чем ДМСО, и был предложен ускоренный способ замораживания и оттаивания эмбрионов. При этом способе эмбрионы охлаждают до —30...—40 °C со скоростью от 0,1 до 0,3 °C в мин и затем погружают в жидкий азот и оттаивают сразу из жидкого азота в теплой воде (25—37 °C). В результате метод криоконсервирования значительно упростился. При этом способе интрацеллюлярное образование льда внутри эмбриона происходит в ограниченном объеме.

В первых опытах выживаемость эмбрионов составляла 33,7%, стельность после пересадки хирургическим методом — около 45,2% (Н. И. Сергеев, И. Я. Шихов, 1982).

Позднее, с применением программных автоматизированных замораживателей, уровень стельности достигал около 65% при хирургическом и 44,1% — при нехирургическом методе пересадки. При использовании глицерина в качестве криопротектора в концентрации 1,4 моль получено (по результатам культивирования) 63% выживаемости эмбрионов и 59% стельности после хирургической пересадки (Н. И. Сергеев и др., 1984).

При упрощении метода криоконсервирования получены обнадеживающие результаты. Эмбрионы, имеющие комнатную температуру, сразу охлаждают до —7 °C, а затем сразу до —30 °C и при этой температуре выдерживают в течение 30 мин, после этого погружают их в жидкий азот. Выживаемость эмбрионов составляет 79%, а стельность — 45%.

С использованием соломинок в качестве резервуара для эмбрионов и сахарозы для удаления криопротектора глицерина процент выживаемости эмбрионов повышается до 83,3.

При этой технологии удаления криопротекторов создается благоприятная комбинация дегидратации и внутриклеточного образования льда. Применение пластиковых соломинок, которые длительное время используются при замораживании спермы, может значительно упростить как замораживание эмбрионов, так и метод их пересадки. Использование соломинок и сахарозы дает возможность пересаживать эмбрионы сразу же после оттаивания без удаления криопротектора глицерина. Соломинки малого диаметра с тонкой стенкой и содержащие незначительное количество жидкости, по сравнению с ампулами или тру-

бочками из пластмассы, обеспечивают улучшение и более тщательное выполнение ручной искусственной кристаллизации. Кристаллизация при глубоком замораживании эмбрионов — очень ответственный процесс. Искусственная кристаллизация должна быть выполнена при температуре между -5 и -8°C . Индуцирование кристаллизации при температуре от -10 до -15°C повышает в несколько раз число разрушенных эмбрионов после замораживания и оттаивания. Негативно отражается на жизнеспособности эмбрионов и спонтанное образование льда. Причины этого на сегодня пока неизвестны.

Особый интерес представляет введение раствора сахарозы после оттаивания эмбрионов как средства, удаляющего криопротектор. Сахароза — высокополимерный углерод, с помощью которого можно уменьшить или предотвратить осмотический шок при удалении криозащитного вещества.

При осмотическом шоке происходит лизис клеток, так как во время разбавления вода быстро проникает в клетку, а криозащитное вещество медленно выходит. Сахароза улучшает активный перенос внутри бластополости.

При общепринятом (постепенном) удалении криозащитной среды часто оболочка бластомеров из-за сильных осмотических изменений необратимо повреждается и материал клетки освобождается. При введении сахарозы также наблюдается легкое сжатие клеток эмбриона, однако экспандирование в культуральной среде восстанавливает их. Положительным при введении сахарозы является сокращение процесса удаления криопротектора из эмбрионов с обычных 50—60 мин до 10—15 мин.

После криоконсервирования и оттаивания часто наблюдается повреждение зоны пеллюцида у эмбрионов. Размер повреждений возможен от узких трещин до полной потери этой оболочки. Частота криоповреждений колеблется от 10 до 25%. Незначительные повреждения зоны пеллюцида не оказывают существенного влияния на жизнеспособность эмбрионов после оттаивания и пересадки. Предпосылкой для успешной приживляемости эмбрионов после пересадки служит, по-видимому, значительная целостность бластомеров и их структур.

В редких случаях обнаруживаются разрушения соединений между бластомерами. Сами бластомеры имеют нормальную морфологическую структуру, но они разделены между собой щелевым пространством. После оттаивания могут быть криоповреждения в ультраструктуре эмбрионов, что, естественно, нельзя установить при обычной микроскопической оценке. Ультраструктурные разрывы можно наблюдать и в оболочке.

Электронно-микроскопическое исследование эмбрионов показало, что криоповреждения встречаются у избирательных типов клеток внутри эмбриона и вид повреждений зависит от стадии развития эмбриона. Так, у 5-дневных эмбрионов крупного рога-

того скота (8—16 клеток) после оттаивания может быть нарушенным расположение органелл внутри бластомеров. У ранних бластоцист между клетками обнаруживается трофобласт, повреждается мембрана плазмы, что приводит к сползанию бластополости. У экспандированных бластоцист (8-й день) ультраструктурные повреждения наблюдаются в области однослойного трофобласта. У эмбрионов на стадии развития 13-го дня часто имеются повреждения трофических клеток эктодермы.

На уровень выживаемости эмбрионов оказывает влияние не только технология глубокого замораживания и оттаивания, но и их качество, и стадия развития. При замораживании 7—8-дневных бластоцист с абсолютно безупречной морфологией получены лучшие результаты выживаемости после оттаивания (94,4%), чем с незначительными морфологическими отклонениями (77,2%), при стельности после пересадки соответственно 41,7 и 15%. Поэтому для криоконсервирования нужно использовать исключительно хорошие эмбрионы на стадии поздней морулы и ранней бластоцисты. Прослеживается явное влияние качества эмбрионов перед замораживанием на их выживаемость после оттаивания в культуральной среде, что, однако, не подтверждается результатами пересадки. Это свидетельствует о некотором негативном влиянии нехирургического метода на приживляемость замороженно-оттаянных эмбрионов после пересадки.

Стадия бластоцисты более пригодна к замораживанию, чем стадия ранней морулы. Однако сравнительное определение способности к криоконсервированию 7-дневных эмбрионов (поздняя морула и ранняя бластоциста) и 8-дневных (экспандированных бластоцист) показало, что поздние морулы и ранние бластоцисты имеют лучшую выживаемость после оттаивания (90%), и после их пересадки получают более высокий показатель стельности (62,5%) по сравнению с 8-дневными бластоцистами (52,9%).

Предполагают, что причиной снижения выживаемости и процента стельности при использовании экспандированных бластоцист является повышение чувствительности периферически расположенного слоя клеток трофобласта к быстрому охлаждению и оттаиванию. В то же время эмбрионы с еще клеточным комплексом (стадия развития 7 дней) имеют более низкую чувствительность к охлаждению.

При применении метода медленного охлаждения более высокая выживаемость была отмечена у 8-дневных экспандированных бластоцист. Эмбрионы без зоны пеллюцида (от 11 до 13 дней) после оттаивания теряли способность к дальнейшему развитию. Наличие неповрежденной зоны пеллюцида, вероятно, имеет важное значение для высокой выживаемости эмбрионов. При искусственном проколе зоны перед глубоким заморажива-

нием процент выживаемости эмбрионов резко падает. Вероятно, зона выполняет функцию не только защитной оболочки, но и осмотического буфера.

Следует отметить, что большинство работ по глубокому охлаждению эмбрионов млекопитающих ведется в направлении усовершенствования технологии их криоконсервирования и методик, основанных на применении в качестве защитных веществ ДМСО и глицерина. При этом основное значение придается разработке технологических этапов обработки эмбрионов при замораживании: получению, оценке качества, охлаждению, насыщению и удалению криопротектора, а также выявлению оптимальной скорости снижения температуры. Изыскание возможности применения в качестве защитных компонентов среды других веществ, которые выгодно бы отличались от ДМСО и глицерина, также представляет большой научный и практический интерес. Так, диэтиленгликоль и полиэтиленоксид с молекулярной массой 100 характеризуются криозащитными свойствами, которые близки к свойствам глицерина. Они могут быть успешно применены совместно с глицерином и лактозой.

Совместное с дисахаридами применение диметилформамида и метилцеллюлаза дает аналогичные результаты замораживания биоматериала, что и глицерин. При этом следует отметить, что все известные теоретические предпосылки механизма криозащиты биологических объектов рассматривают динамику протекания процессов в системе клетка — водная среда.

Если лишить клетку окружающей водной среды, то совершенно по-иному представляются механизмы процесса замораживания. Так, подготовленные к замораживанию клетки можно без вреда для них отделить от окружающей водной фазы путем гравитационного их погружения в углеводородную среду (смесь фреона с гептоном). В таком состоянии клетки хорошо переносят процессы замораживания и оттаивания. При этом исключается возможность протекания осмотических процессов, дегидратации и регидратации клетки, а также экзоцеллюлярных концентрационных и механических воздействий. Все процессы замыкаются в интрацеллюлярной системе, в которой может проявляться ограниченное число повреждающих факторов — внутриклеточная кристаллизация воды и осмотические процессы на мембранном аппарате интрацеллюлярных морфологических элементов (ядра, эндоплазматическая сеть и др.).

Понизить интенсивность осмотических процессов до уровня, не угрожающего жизни клетки, можно путем подбора оптимальной скорости охлаждения, а исключить внутриклеточную кристаллизацию — путем насыщения протоплазмы клетки проникающим криофилактиком (например, ДМСО, глицерин, этиленгликоль и др.). Это позволяет предотвратить развитие криоповреждений клеток.

Сказанное подтверждает известную теорию Ф. И. Осташко о температурном шоке как одном из главных факторов криоповреждения и гипотезы И. В. Смирнова о возможности процесса витрификации насыщенной криопротектором плазмы клеток при медленном или ускоренном их замораживании.

Весь процесс глубокого замораживания состоит из отдельных этапов, от которых зависит эффективность метода замораживания: 1) получение эмбрионов, 2) подготовка эмбрионов к замораживанию, 3) собственно процесс замораживания, 4) хранение эмбрионов в жидком азоте при температуре -196°C , 5) процесс оттаивания, 6) оценка жизнеспособности эмбрионов путем культивирования их или пересадки подходящим реципиентам.

Для трансплантации важно получать достаточное количество пригодных для пересадки и замораживания эмбрионов. Однако от коровы-донора часто получают немного таких эмбрионов.

Возраст эмбрионов для замораживания у крупного рогатого скота определен в 7—8 дней, у овец и коз — в 5—6, у свиней — в 4—5 дней, у мышей и кроликов успешно замораживают и более ранние эмбрионы (2-, 8- и 16-клеточные). В более поздние стадии создаются дополнительные проблемы, связанные с массой замораживаемого объекта, и пока нет технических возможностей для замораживания эмбрионов на такой стадии развития.

Замораживать целесообразно свежие эмбрионы. Хранение даже в течение 3 ч сказывается отрицательно на их жизнеспособности. Максимальное сокращение времени подготовки эмбрионов к замораживанию — одно из основных требований успешного криоконсервирования.

Хранение эмбрионов в физиологическом растворе в течение 2—3 ч снижает способность их к росту. Поэтому в случае необходимости сохранения эмбрионов более 1—2 ч до замораживания их помещают в охлажденный фосфатно-буферный раствор при температуре около 0°C . При этом жизнеспособность эмбрионов может сохраняться до 48 ч.

Перед замораживанием эмбрионы оценивают по морфологическим признакам. Наиболее отвечают требованиям зародыши, имеющие четкие формы нормально развитых поздних морул и бластоцист на разной стадии развития (крупный рогатый скот) или ранних морул (овцы).

Обычно жизнеспособность эмбрионов оценивают при помощи микроскопического анализа. При этом можно четко определить морфологическую стадию развития эмбриона по видимому числу бластомеров, которые находятся на стадии морулы или бластоцисты с полостью и с видимым эмбриобластом. Если эмбрион отстает в своем развитии более чем на 24 ч, то он, вероятно,

не развивается дальше и не должен подвергаться замораживанию.

После получения эмбрионы можно точно разделить на нормальные, дегенерированные и отставшие в развитии, а также выделить неоплодотворенные яйцеклетки. Однако жизнеспособность многоклеточных морул, которые чаще всего замораживают, можно оценить только приблизительно из-за сложного их строения. Процесс потери эмбрионом жизнеспособности обычно происходит постепенно. Изменения начинаются с единичных (отдельных) клеток, и их практически почти не удастся уловить под микроскопом.

Для более точной оценки эмбрионы перед замораживанием можно инкубировать в культуральной среде в течение 18—24 ч или помещать в яйцеводы кролика. Жизнеспособные эмбрионы продолжают свое развитие. Но эти приемы мало применяются.

Можно оценивать эмбрионы методом флуоресценции, который имеет существенное преимущество перед световой микроскопической оценкой. С помощью красящих веществ в разведении более чем в 100 000 раз можно различать живые и мертвые эмбрионы или погибшие отдельные клетки.

При обработке красящим веществом ФДА (диацетилфлуоресцеин) светятся только живые бластомеры. Благодаря наличию специфического фермента, присутствующего только в живых клетках, красящее вещество превращается в флуоресцирующую форму, и под микроскопом живые эмбрионы флуоресцируют зеленым цветом. Погибшие эмбрионы или клетки невидимы.

По сравнению с ФДА при использовании флуоресцирующего вещества ДАПИ (диамино-2-фенилдрол) светятся только погибшие эмбрионы или отдельные бластомеры. Красящее вещество при этой концентрации и времени инкубации проникает через клеточные мембраны погибших клеток и дает свечение ядра.

Оба красящих вещества можно применять в комбинации друг с другом, сначала инкубации ДАПИ, а затем с ФДА. В этих условиях, кроме светящейся протоплазмы, можно наблюдать флуоресцирующие ядра в погибших клетках. Комбинированное применение двух красителей дает возможность повысить точность оценки жизнеспособности эмбрионов.

Эмбрионы с частично погибшими бластомерами очень редко развиваются дальше после пересадки. Такие повреждения часто встречаются при глубоком их замораживании и оттаивании. Метод флуоресценции перспективен. Он дает возможность достаточно быстро и более точно (85—90%) определить жизнеспособность эмбрионов как свежих, так и замороженно-оттаянных. Применение ФДА и ДАПИ не снижает жизнеспособности эмбрионов, если строго соблюдать методические условия. Прав-

да, это не всегда удается. Поэтому данный метод не получил широкого применения при оценке качества эмбрионов.

Накопленный опыт дает возможность целенаправленно совершенствовать методы глубокого замораживания и оттаивания, которые обеспечивают высокий процент выживаемости эмбрионов с использованием относительно простых программных автоматических замораживателей.

Таким образом, от пересадки замороженно-оттаянных эмбрионов нехирургическим методом, при строжайшем их отборе перед криоконсервированием, представляется возможным получать уровень стельности такой же, как и при нехирургической пересадке свежеполученных эмбрионов (около 60%). Все большее распространение находит метод замораживания, когда эмбрионы непосредственно после быстрого оттаивания, без удаления криопротекторов, прижизненной оценки их качества, пересаживают животным-реципиентам. Приживляемость после нехирургической пересадки оттаянных эмбрионов по такой технологии находится на уровне 35—50%.

ПОДГОТОВКА ЭМБРИОНОВ К ЗАМОРАЖИВАНИЮ

В качестве среды при кратковременном хранении используется модифицированный фосфатно-буферный солевой раствор (ФБС) Дюльбекко с определенными добавками. Для манипулирования с эмбрионами удобны часовые стекла, которые перед работой хорошо промывают, просушивают и стерилизуют. В них можно собирать по несколько десятков эмбрионов. Раствора должно быть налито 3—5 мл, и часовые стекла желательно устанавливать в чашки Петри, на дне которых находится увлажненная водой фильтровальная бумага для предотвращения испарения. Отобранные и оцененные эмбрионы поступают на замораживание. Для дозирования растворов можно использовать градуированные шприцы или пипетки. Растворы готовят либо во флаконах, либо прямо на часовых стеклах.

Растворы ДМСО готовят на фосфатном буфере Дюльбекко. В продаже имеется химически чистый диметилсульфоксид $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4$. Номенклатурный ТУ 6.09.3818.77. Срок хранения — 1 год. Хранить следует в темном прохладном месте.

При эквilibрации эмбрионов перед замораживанием используют 4 степени разведения криопротектора ДМСО: 0,25 М; 0,5 М; 1,0 М и 1,5 М. Исходя из молекулярной массы (78,136) вначале готовят 3,0 М раствор: 15,74 мл среды ФБС и 4,26 мл ДМСО. Поскольку жидкий ДМСО имеет удельный вес 1,1 г/см³, то 4,26 мл будет весить 4,68 г, что соответствует 3,0 М концентрации вещества, растворенного в 20 мл раствора. Затем из 3,0 М раствора ДМСО готовят необходимые концентрации. Для приготовления 1,5 М раствора ДМСО нужно взять 5 мл 3,0 М

14. Изменения pH и осмолярности растворов ДМСО и глицерина в среде ФБС

ФБС+ДМСО			ФБС+глицерин		
pH		миллиосмоли	pH		миллиосмоли
ФБС	7,20	285	—	—	—
ДМСО	11,0	—	Глицерин	7,50	—
0,5 М	7,29	900	0,66 М	7,21	720
1,0 М	7,38	1500	0,33 М	7,21	1200
1,5 М	7,45	2120	1,0 М	7,21	1650

ДМСО и 5 мл ФБС; для приготовления 1,0 М — 4 мл 1,5 М ДМСО и 2 мл ФБС; 0,5 М — 3 мл 1,0 М ДМСО и 3 мл ФБС; 0,25 М — 3 мл 0,5 М ДМСО и 3 мл ФБС. С помощью аналогичных расчетов составляют растворы ДМСО для его разбавления.

При замораживании эквilibрацию эмбрионов проводят в указанных концентрациях ДМСО по возрастающей степени, а после оттаивания, наоборот, по убывающей. В каждом растворе эмбрионы выдерживают по 5 мин, в последнем разведении — 15 мин. После эквilibрации эмбрионы помещают в охлаждающую ручную или автоматическую установку и замораживают в заданном режиме.

Из множества испытанных криопротекторов, наряду с ДМСО, неплохие результаты получают при использовании глицерина.

По своим физико-химическим свойствам глицерин имеет ряд преимуществ по сравнению с ДМСО.

Химически чистый глицерин имеет молекулярную массу 92,09; химическая формула его C_3H_8O . Для замораживания используют 10%-ный раствор глицерина, что составляет 1,0 М концентрацию в ФБС (к 4 мл глицерина добавляют 36 мл ФБС). Для получения растворов, в которых должно содержаться 3,3% и 6,6% глицерина, берут соответственно 10 мл ФБС и добавляют 5 мл 10%-ного раствора глицерина и 5 мл ФБС плюс 10 мл 10%-ного раствора глицерина (табл. 14).

При эквilibрации эмбрионы помещают в 3,3%-ный раствор глицерина на 10 мин, в 6,6%-ный — на 14 мин и в 10%-ный — на 30 мин. В середине срока выдержки в каждом растворе их промывают.

Можно добавлять глицерин к раствору ФБС в один прием, с тем чтобы получить нужную концентрацию. Для этого в пробирки для замораживания размером 75×10 мм вначале вливают 0,3—0,4 мл ФБС и помещают в них эмбрионы, а затем при температуре 37°C медленно добавляют 2,0 М раствор глицерина (0,3—0,4 мл). Всего в пробирке будет содержаться 0,6—0,8 мл. После этого пробирку перед началом охлаждения выдерживают в течение 60 мин.

Можно допускать и 30-минутную выдержку эмбрионов в 10%-ном глицерине перед тем, как они будут помещены в установку для замораживания.

Для замораживания эмбрионы можно размещать в пробирках размером 50×6 мм с 0,4 мл 1,5 М раствора ДМСО в ФБС. Затем пробирку закрывают фольгой и охлаждают. Можно использовать ампулы, которые запаивают перед замораживанием. После тщательной запайки ампулы с образцами суспензированных в жидкости эмбрионов (общим объемом 0,2—0,3 мл) помещают в машину для охлаждения. Однако надежное запаивание ампул в условиях ограниченного времени обработки образцов перед замораживанием не дает 100%-ной гарантии. При неполной запайке жидкий азот, используемый в качестве криоагента, попадает в ампулу, и после извлечения ее для оттаивания образец взрывается. В результате могут быть травмы оператора и потери эмбрионального материала.

Эмбрионы замораживают также в соломинках размером 4×125 мм. Для замораживания эмбрионов лучше использовать пробирки размером 50×5 мм, закрытые фольгой. При подготовке образцов в пробирку специальной пипеткой вводят жидкость с эмбрионами общим объемом 0,2—0,3 мл. В каждую пробирку целесообразно помещать не более двух эмбрионов из расчета два эмбриона на одного реципиента при пересадке после оттаивания.

КРИОТЕХНИКА ДЛЯ ГЛУБОКОГО ЗАМОРАЖИВАНИЯ

Технология замораживания биологических объектов требует применения строго определенных режимов охлаждения. Нарушение режима замораживания или применение неправильно подобранных режимов, как правило, приводят к повреждению эмбрионов.

В связи с этим в ряде стран разработаны специальные установки или приспособления для замораживания эмбрионов по определенной программе. Первое успешное замораживание эмбрионов было проведено на ручных замораживателях с использованием в качестве хладагента жидкого азота, которым наполняют широкогорлый сосуд Дьюара объемом 4 л. В сосуде охлаждают спиртовую баню (96%-ный или 100%-ный этиловый спирт). Баня представляет собой двухстенный сосуд 120×200 мм с вакуумированным межстенным пространством. Степень откачки воздуха 12 мл Hg.

Внутри сосуда смонтирован штатив для ампул и пробирок, в него же устанавливают термометр сопротивления (платиновый) или термопару, соединяемую электрической цепью с регистрирующим потенциометром (КСП-4 или КСМ). В сосуде имеется крыльчатка для перемешивания спирта. Сосуд-баню закрепляют на штативе с движением вверх-вниз, по которому

спиртовую баню медленно погружают в жидкий азот, и начинают медленное охлаждение. Такая установка позволяет медленно охлаждать биообъект со скоростью охлаждения согласно программе. Как правило, требуется выдерживать скорость охлаждения от 1°C в мин до $0,3$ и $0,1^{\circ}\text{C}$ в мин.

Медленное охлаждение может быть достигнуто и на установках другого типа. Спиртовую баню можно охлаждать сухим льдом, опуская его порциями в спирт при постоянном перемешивании. Такая баня может дать охлаждение до -76°C , после чего в течение 5 мин эмбрионы выдерживают над парами жидкого азота на расстоянии 13 см от его поверхности, где создается температура -100°C . Затем эмбрионы помещают в жидкий азот.

При другой системе охлаждения используют испарительную трубку, изолированную стироfoновыми прокладками, которую помещают в танк с жидким азотом. Через эту трубку в пары азота опускают контейнеры с «соломинками», в которые заключены эмбрионы. Механизм опускания биоматериала в трубку смонтирован на основе кимографа. Скорость замораживания при этом составляет от $0,2$ до 20°C в мин. В приведенных установках обязательно измеряют температуру среды с помощью термодатчика, подсоединенного к регистрирующему прибору.

Применяют и более простые схемы охлаждения. Эмбрионы в пробирках помещают в ледяную ванночку. Через 5—10 мин они достигают температуры тающего льда и их переносят в другую, где налит спирт, охлажденный от $-0,4$ до -8°C . Затем пробирки опускают в следующую ванну, где температура спирта -20°C . Здесь эмбрионы выдерживают 10 мин, после чего их помещают в следующую ванну. Скорость охлаждения составляет до 17°C в мин. После этого пробирки с эмбрионами охлаждают в течение 10 мин в парах жидкого азота, а затем погружают в азот.

В практике криоконсервирования широко распространены полуавтоматические установки разной конструкции с программным контролем. Одна из них показана на рис. 33.

Установки обеспечивают высокую точность режима работы с отклонением до $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ от заданной программы замораживания и размораживания, значительно сокращают расход азота на цикл замораживания 4 контейнеров с эмбрионами, обеспечивают программное оттаивание биообъектов. Упрощение конструкции установки позволяет использовать ее для замораживания и оттаивания эмбрионов непосредственно на ферме.

Установка снабжена двумя отопителями, в электрическую цепь одного из которых включены реостат и миллиамперметр, позволяющие плавно регулировать и контролировать давление в системе охлаждения, чем и обеспечивается программная за-

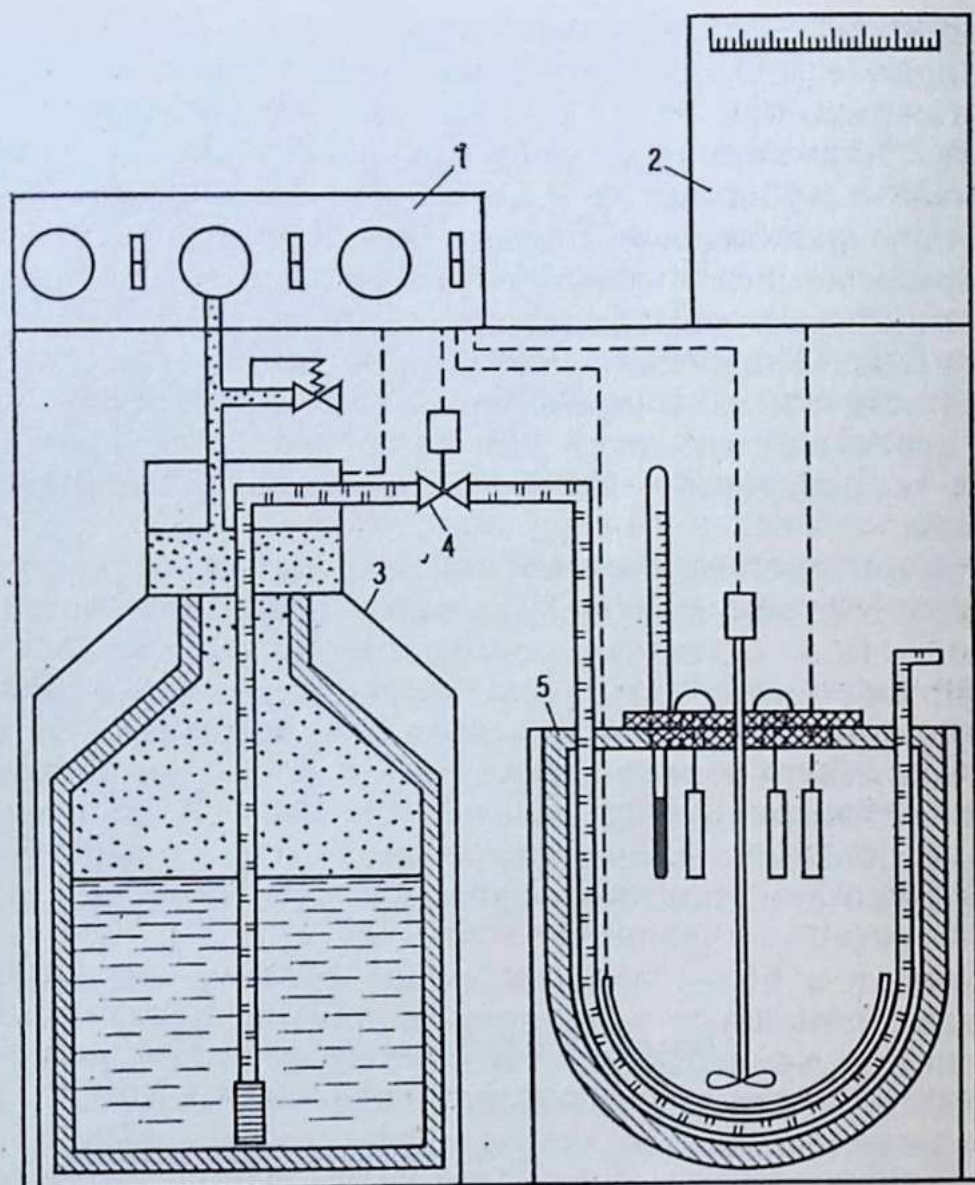


Рис. 33. Полуавтоматическая установка для замораживания эмбрионов:

1 — блок управления; 2 — регистрирующий прибор; 3 — сосуд Дьюара; 4 — электромагнитный клапан; 5 — морозильная камера

морозка эмбрионов. В электрическую цепь второго отопителя включены автотрансформатор и амперметр, с помощью которых осуществляется отопление камеры при оттаивании эмбрионов.

Аппарат состоит из металлического корпуса, камеры для размещения эмбрионов при замораживании, регистрирующего прибора, приборного щитка и сосуда Дьюара, внутри которого помещен отопитель для создания рабочего давления в парожидкостной смеси в системе охлаждения. На горловине сосуда Дьюара установлен редуктор с предохранительным клапаном и запорным вентилем.

Камера представляет собой одностенную цилиндрическую емкость со сферическим дном, по внутреннему периметру которой вплотную к стенке расположен трубопровод для хладагента.

та. Внутри цилиндрической части камеры расположены ртутный термометр, по которому определяется с высокой точностью момент проведения кристаллизации в процессе охлаждения, а также 4 контейнера для пробирок с эмбрионами и термометр сопротивления для ведения программы замораживания.

Перед заморозкой на установке проводится подготовительная работа, которая включает заправку сосуда Дьюара хладагентом, нанесение программной кривой на ленту регистрирующего прибора, прогрев или охлаждение камеры до исходной температурной точки, загрузку контейнеров с эмбрионами в камеру и процесс охлаждения.

Работа установки по программному оттаиванию начинается также с подготовительной операции в той же последовательности, что при замораживании, только охлаждение камеры и вывод регистрирующего прибора на исходную точку программной кривой осуществляются в ускоренном режиме. При этом устанавливают максимально допустимый ток в отопителе давления, а по достижении исходной программной точки оттаивания отопитель давления включают, а давление в системе охлаждения снижают путем открывания вентиля.

Пробирки с эмбрионами из жидкого азота помещают в контейнеры камеры, включают отопитель размораживания и ручкой регулируют электроток по амперметру, что обеспечивает программный режим оттаивания по установленной кривой на ленте регистрирующего прибора. По окончании оттаивания пробирки с эмбрионами переносят в стерильный бокс, удаляют криопротектор и морфологически оценивают жизнеспособность зародышей.

Наряду с такими простыми системами охлаждения эмбрионов применяют замораживатели промышленного производства марки УОП-1 и УОП-2, в которых автоматизирована подача хладагента (испаряющегося азота) в камеру охлаждения (рис. 34).

Все системы работают на жидком азоте. Внутренняя камера, в которую помещается замораживаемый объект, может быть сделана из стекла или пластика. Подача азота контролируется электронным регулирующим электромеханическим устройством. Система настройки позволяет получать скорость охлаждения 0,1; 0,3 и т. д. до 1°C в мин и даже до 20°C в мин. Замораживатели имеют в комплекте специальные сосуды Дьюара для жидкого азота, из которых ведется заправка аппаратуры для хранения эмбрионов.

РЕЖИМЫ ЗАМОРАЖИВАНИЯ И ОТТАИВАНИЯ ЭМБРИОНОВ

Программный замораживатель состоит из основной рабочей камеры объемом около 5 л, которая термоизолирована от внешней среды. На внутренней ее стенке имеются невысокие винто-

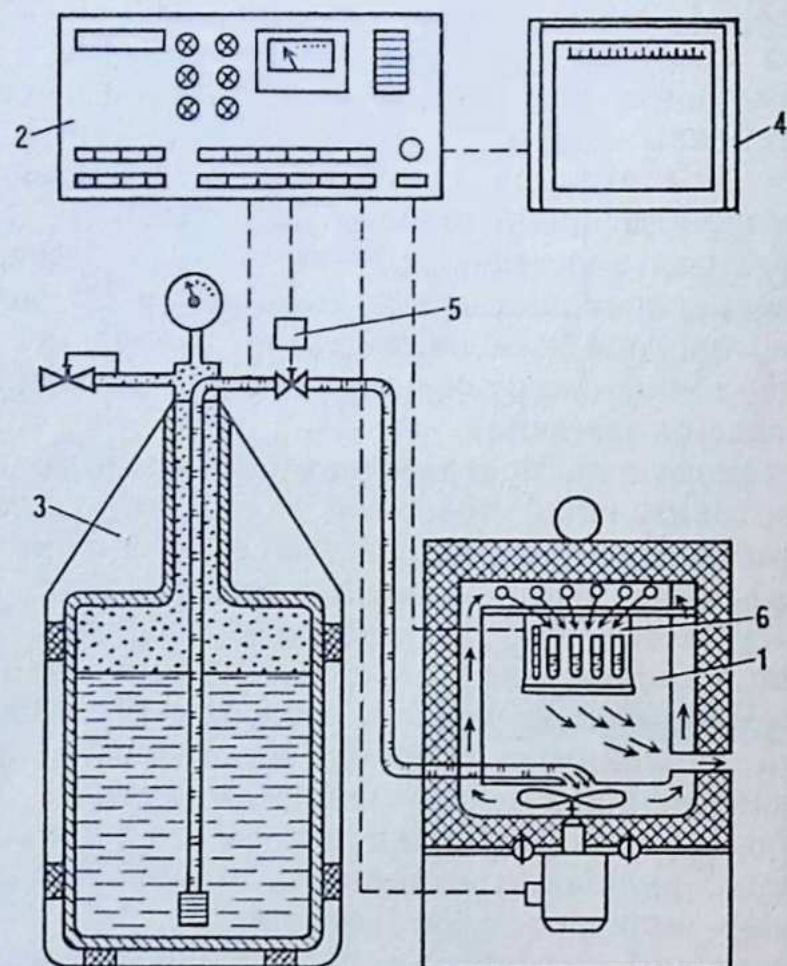


Рис. 34. Автоматический программный замораживатель типа УОП-1:

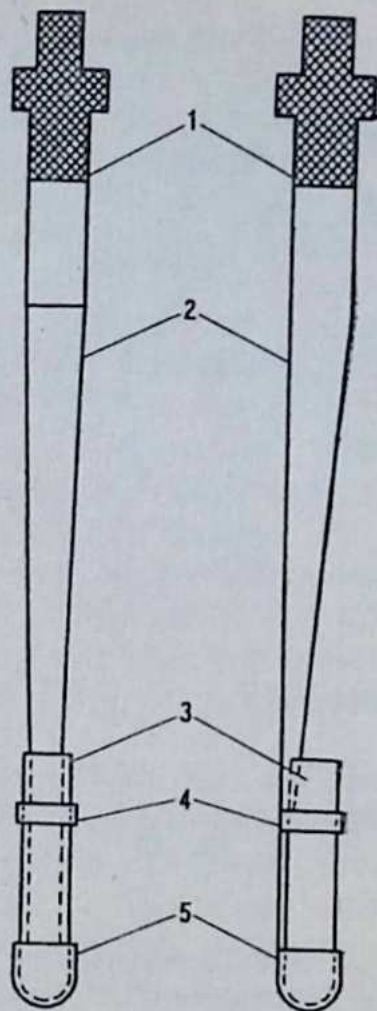
1 — морозильная камера; 2 — блок автоматики; 3 — сосуд Дьюара; 4 — регистрирующий прибор; 5 — электронный клапан; 6 — пробирки с эмбрионами

образные ребра для равномерного смешивания газов, внизу вентилятор, сверху камера закрыта крышкой с двухкрылым профилем. Хладагент (жидкий азот) подается снизу и испаряется в камере, сбоку выводное отверстие. Подача жидкого азота обеспечивается клапанным устройством, степень открытия которого регулируется электромеханически, вручную или в автоматическом режиме по заданной программе.

Для автоматического программирования охлаждения камеры установлен электронный блок автоматики. Его датчики введены в камеру охлаждения, один из них может вводиться непосредственно в контейнер с биообъектом. Сигналы с датчика температуры (платиновые термометры сопротивления) подаются в блок управления, где соответственным образом преобразуются и обуславливают подачу ответного сигнала на клапан, регулируя тем самым скорость охлаждения. В программе имеются скорости охлаждения с 0,3 до 9°C в мин через каждый градус и до 30°C в мин через 5°C. Жидкий азот подается из

Рис. 35. Держатели для пробирок в замораживателе:

1 — теплоизоляционная ручка; 2 — корпус держателя; 3 — пробирка; 4 — колодник; 5 — гнездо для пробирки



специального сосуда, подсоединенного гибким металлическим шлангом к системе. Давление в сосуде поддерживается специальным устройством на уровне 0,5 атм. Быстрота охлаждения регистрируется на самописце КСП-4. Пробирки вставляют в специальные держатели из нержавеющей стали (рис. 35).

Медленный режим замораживания и оттаивания эмбрионов. Для замораживания готовят 1,5 М раствор ДМСО в ФБС, но, прежде чем поместить в него эмбрионы, их постепенно проводят по возрастающим концентрациям раствора 0,25 М и 0,5 М ДМСО — по 5 мин; 1,0 М — по 10 мин и 1,5 М ДМСО — по 20 мин при комнатной температуре. После эквilibрации эмбрионы (по 2—3) помещают в пробирки размером 6×55 мм по внешнему диаметру и длине и с жидкостью (1,5 М ДМСО в ФБС) в количестве примерно 0,3 мл.

После подготовки пробирки с эмбрионами помещают в камеру охлаждения и включают программирующее устройство на скорость охлаждения 1 °С в мин. Через 27 мин температура жидкости в пробирках опускается до —7 °С. В это время включают режим стабилизации и, открывая пробку за пробкой, поднимают пробирки к уровню крышки и вызывают в них образование льда. После этого переводят датчики температуры на камеру и продолжают охлаждение со скоростью 0,3 °С в мин. По достижении температуры —60...—80 °С крышку камеры открывают и пробирки с эмбрионами переносят в жидкий азот.

Для оттаивания в центрифужную пробирку наливают приблизительно 16 мл этанола, охлаждают его до —50 °С и помещают в него оттаиваемый образец. Нагревание на воздухе до —10 °С происходит со скоростью 4 °С в мин, затем пробирки с эмбрионами погружают в водяную баню при температуре 25 °С.

После оттаивания в образцах разбавляют криопротектор. Для этого эмбрионы помещают из 1,5 М раствора ДМСО по ступеням нисходящих концентраций, а именно в 1,25 М; 1,0 М; 0,75 М; 0,50 М; 0,25 М и в чистый ФБС (в каждом по 5 мин).

Уровень стельности после пересадки выше (36,5%) при оттаивании эмбрионов при температуре 37°C, чем при температуре 25°C (23,5%).

Применяется способ насыщения эмбрионов криопротектором глицерином 1,3 М в 6 ступеней (0,2; 0,4; 0,7; 0,9; 1,1 и 1,3 М) через 10 мин при температуре 20°C. Искусственную кристаллизацию вызывают при -6°C путем касания охлажденным предметом наружной поверхности контейнера с эмбрионами. Охлаждение до -6°C со скоростью 1,5°C в мин и до -40°C со скоростью 0,3°C в мин. На этой точке охлаждения выдерживают эмбрионы в течение 30 мин и затем переносят в жидкий азот. Оттаивание быстрое, на водяной бане при температуре 37°C, затем переводят в температурную среду 20°C.

После оттаивания удаляют криопротектор в обратной последовательности с тем же промежутком, что и при насыщении. В среде без криопротектора эмбрионы дважды промывают и переносят в среду ФБС с 20% фетальной сыворотки теленка при температуре 37°C. Этот способ дает возможность получать высокий процент стельности в зависимости от качества эмбрионов после оттаивания (34,6% от эмбрионов удовлетворительного качества и 71% — от хороших).

При использовании криопротектора глицерина в 1,0 М концентрации готовят его растворы в ФБС следующей концентрации: 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 и 1,0 М. В каждом из них эмбрионы последовательно выдерживают по 10 мин при комнатной температуре. Эмбрионы можно размещать в пластмассовых трубочках длиной 47 мм, диаметром 125 мм с толщиной стенки 1 мм. Охлаждают с 20 до -7°C со скоростью 1°C в мин. Кристаллизацию проводят при -7°C, от -7 до -28°C охлаждают со скоростью 0,3°C в мин, от -28 до -35°C — со скоростью 0,1°C в мин, далее эмбрионы переносят в жидкий азот. Оттаивание быстрое на водяной бане при температуре 25°C, удаление криопротектора проводят в обратной последовательности в 5 этапов с выдержкой по 10 мин в каждом растворе.

Все шире эмбрионы замораживают в соломинках (паеттах) (производства фирмы «Кассу», Франция) длиной 132,5 мм, диаметром 2 мм. Насыщение криопротектором (1,0 М глицерин) проводят в 5 этапов по методике, приведенной выше. Криозащитное средство удаляют с помощью глицерино-сахарозных градиентов (сначала 1,0 М глицерин+0,5 М сахарозы в ФБС, выдержка 10 мин; затем 0,5 М сахароза в ФБС на 5—10 мин и, наконец, 3—4-кратное промывание в ФБС+20% фетальной сыворотки теленка).

При использовании этих способов с применением пластиковых соломинок (паетты) и сахарозы удалось достигнуть более высокого процента выживаемости эмбрионов после замораживания и оттаивания.

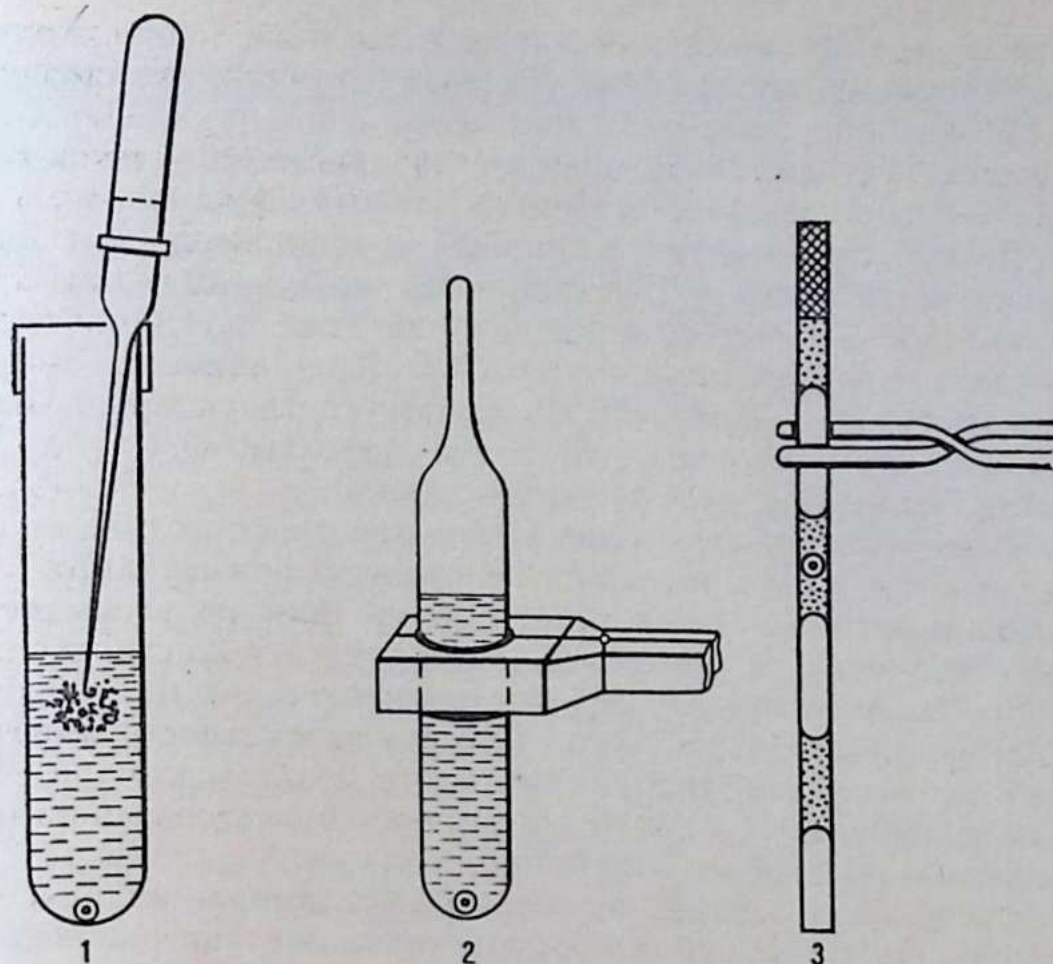


Рис. 37. Искусственное вызывание кристаллизации:
1 — в пробирке; 2 — в ампуле; 3 — в палетте

При быстром глубоком замораживании и оттаивании с применением пластиковых трубочек и 5-ступенчатого удаления глицерина выживаемость эмбрионов составляет 50%. Существенно улучшаются показатели выживаемости эмбрионов (83,3%) при быстрой их обработке с применением палетт вместо обычных криотрубочек в качестве резервуара для эмбрионов и использованием сахарозы для удаления криопротектора глицерина после оттаивания. При использовании палетт с существенно меньшим диаметром по сравнению с ампулами и трубочками, более тонкой стенкой и меньшим количеством жидкости процесс кристаллизации требует меньше времени, и удается его выполнить более точно, что улучшает условия выживаемости эмбрионов (рис. 37).

Особенно важно применение сахарозы для удаления криопротектора после оттаивания. Сахароза предотвращает или ослабляет осмотический шок при разбавлении криопротектора, поскольку во время оттаивания вода поступает в клетку слишком быстро, а криопротектор удалить с такой же скоростью не удастся. При ступенчатом удалении глицерина в результате

значительных осмотических изменений эмбрион часто повреждается необратимо вследствие разрыва мембран бластомеров. При применении сахарозы таких изменений не наблюдается. В некоторых случаях эмбрионы слегка сжимаются, но в культуральной среде сразу же принимают нормальную форму.

Применяют охлаждение эмбрионов с использованием 1,4 М глицерина в ФБС до -15 , -20 , -30 , -35 , -40 , -60°C со скоростью $0,3^{\circ}\text{C}$ в мин; оттаивание во всех случаях быстрое на водяной бане при температуре 37°C . Выживаемость эмбрионов составляет 11, 75, 76, 78, 65 и 13% соответственно. Замораживание эмбрионов до -20°C со скоростью $0,3^{\circ}\text{C}$ в мин позволяет укоротить процесс замораживания.

Из емкостей наиболее пригодны в работе стеклянные пробирки, ампулы и пластиковые соломинки, применяемые для искусственного осеменения. После оттаивания число жизнеспособных эмбрионов и пригодных для пересадки достигает 83—88%. Пробирки (ампулы) менее подвержены температурным колебаниям при их переносе из программного замораживателя в эмбриобанк и из эмбриобанка в сосуд Дьюара для транспортировки. Однако пластиковые соломинки более перспективны. При применении дополнительного компонента сахарозы они могут быть использованы не только для замораживания, хранения и транспортировки эмбрионов, но также для разбавления криопротектора с последующей пересадкой непосредственно из этой же емкости. Таким образом, можно исключить целый этап лабораторных работ после оттаивания: разбавление криопротектора и заправку эмбриона в соломинку для пересадки с применением микроскопической техники.

Соломинки перед замораживанием заправляют в определенной последовательности сахарозой и средой, содержащей эмбрион. Это дает возможность после оттаивания разбавить криопротектор в один этап в этой же соломинке без применения микроскопической техники. В дальнейшем эмбрион трансплантируют с использованием этой же соломинки.

Отбор пригодных эмбрионов и подготовку их к замораживанию проводят в специальном помещении — боксе, замораживают в другой отдельной комнате, где размещают программные замораживатели. В боксе следует иметь: стереоскопические бинокулярные лупы типа МБС-9; инвертированный микроскоп типа МБИ-13 или Диаверт; термостат; чашки Петри; шприцы на 1, 2, 5, 10 мл с иглами; бюксы, часовые стекла, пипетки; спиртовку; водяную баню с термометром; программные замораживатели типа УОП-1, Р-204; сосуды Дьюара типа Х-34а, Х-34Б, СДС-5; канистры для размещения соломинок с эмбрионами в замораживателях и сосудах Дьюара; пинцет для проведения кристаллизации; пластиковые соломинки 133×2 мм с пробками; жидкий азот; фосфатно-солевой буфер Дюльбекко

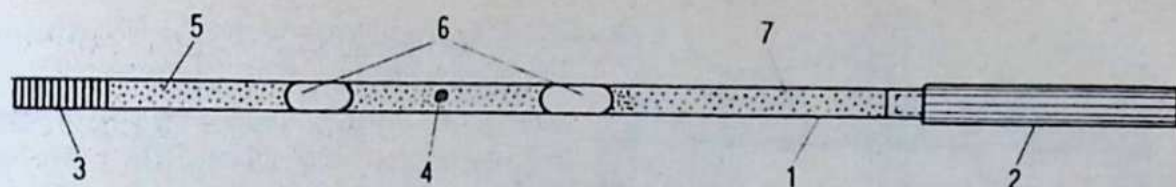


Рис. 38. Расположение эмбриона в палетте:

1 — палетка; 2 — пробка для закрытия палетки и маркировка; 3 — пробка палетки (пыж); 4 — эмбрион в среде с глицерином; 5 — раствор сахарозы; 6 — воздух; 7 — раствор сахарозы

(ФБС); сахарозу х.ч. молекулярной массой 342; глицерин х.ч. молекулярной массой 92,1, плотностью $1,25 \text{ г/см}^3$ (ГОСТ 6824—54, ГОСТ 6259—71); инактивированную сыворотку крови плода крупного рогатого скота, овцы, бычий сывороточный альбумин и антибиотики.

Перед работой с эмбрионами готовят среду для промежуточного хранения эмбрионов, и она же служит исходной для приготовления растворов криопротектора и сахарозы. Это фосфатно-солевой буфер (ФБС), содержащий 100 000 ед/л пенициллина (калиевая соль) и 20% сыворотки крови, 8 мл среды ФБС с пенициллином + 2 мл фетальной сыворотки. Все это осторожно перемешивают. В качестве криопротектора применяют растворы глицерина концентрацией 1,0 М; 1,2 М или 1,4 М.

Для приготовления 1,0 М раствора глицерина берут 0,74 мл стерильного глицерина и разбавляют средой ФБС + 20% фетальной сыворотки до 10 мл, тщательно перемешивают; для приготовления 1,2 М раствора — 0,9 мл глицерина и разбавляют вышеуказанной средой до 10 мл, тщательно перемешивают; для приготовления 1,4 М раствора — 1 мл глицерина разбавляют указанной средой до 10 мл, тщательно перемешивают; 0,5 М раствор сахарозы готовят на фосфатно-солевом буфере 20% фетальной сыворотки. Для этого 1,71 г стерильной сахарозы растворяют в 10 мл ФБС + 20% фетальной сыворотки.

Для замораживания используют только эмбрионы, которые оценены по морфологическим показателям как отличные и хорошие. Посредственные эмбрионы плохо выдерживают жесткие условия глубокого замораживания и оттаивания, часто разрушаются. Такие зародыши более рационально пересаживать реципиентам сразу же после вымывания.

Подготовка эмбрионов к замораживанию проводится в стерильном боксе при температуре $22\text{--}25^\circ\text{C}$ и состоит в добавлении криопротектора к среде. Отобранный для замораживания эмбрион помещают на 15 мин в 1 М (1,2; 1,4 М) раствор глицерина, находящийся на часовом стекле (чашке Петри) в количестве 1—1,5 мл. Затем помещают эмбрион в соломинку (рис. 38).

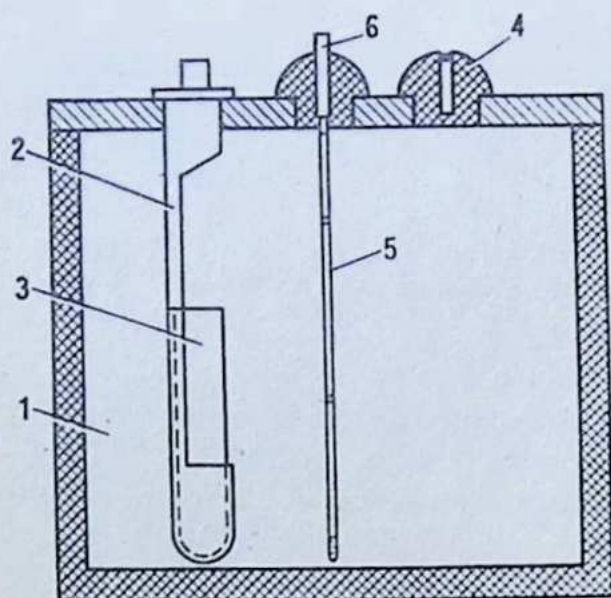


Рис. 39. Держатели для пробирок, пластмассовых трубочек и палочек:

1 — морозильная камера; 2 — держатель пробирок (ампул); 3 — пробирка в держателе; 4 — держатель палочек (трубочек); 5 — палочка в камере; 6 — пробка палочки

Соломинку с помощью шприца на 1 мл, присоединенного к ней через резиновый переходник со стороны пыжа, заправляют в следующей последовательности: берут 0,5 М раствор сахарозы и заполняют $2/5$ объема соломинки, затем пузырек воздуха, 1 М раствор глицерина с эмбрионом $1/5$ объема соломинки, опять пузырек воздуха и после этого 0,5 М раствор сахарозы $2/5$ объема соломинки.

После заполнения соломинку закрывают пластиковой пробкой, на которой записывают фломастером номер эмбриона и дату замораживания. Подготовленную соломинку с эмбрионом передают в помещение для замораживания.

При заполнении соломинки следят за тем, чтобы часть раствора сахарозы впиталась в пыж. После этого пыж приобретает герметичность. Подготовленные соломинки помещают в морозильную камеру в специальные держатели (рис. 39), выполненные из фторопласта. В камере соломинки находятся в вертикальном положении. Для индуцирования кристаллизации при -7°C соломинку за пробку достают из держателя на 5—10 мм до появления кромки столбика сахарозы. В этой точке прижимают кончики переохлажденного в жидком азоте пинцета до превращения среды в месте контакта в лед. После этого соломинки быстро возвращают в исходное положение. Лед медленно растет по внутренней поверхности соломинки, проходит пузырек воздуха и кристаллизует раствор глицерина, где находится эмбрион.

После окончания программы замораживания соломинки за пробки быстро переносят из морозильной камеры в специальную канистру (рис. 40) с жидким азотом. Канистру для соломинок изготавливают из стандартной канистры, широко применяемой при искусственном осеменении сельскохозяйственных животных, в комплекте с сосудами Дьюара. Для этого металлический корпус круглой канистры в верхней части разделяют в форме квадрата, куда впрессовывают фторопластовую пластину с отверстиями для соломинок. Высота корпуса канистры должна соответствовать размеру соломинок плюс поло-

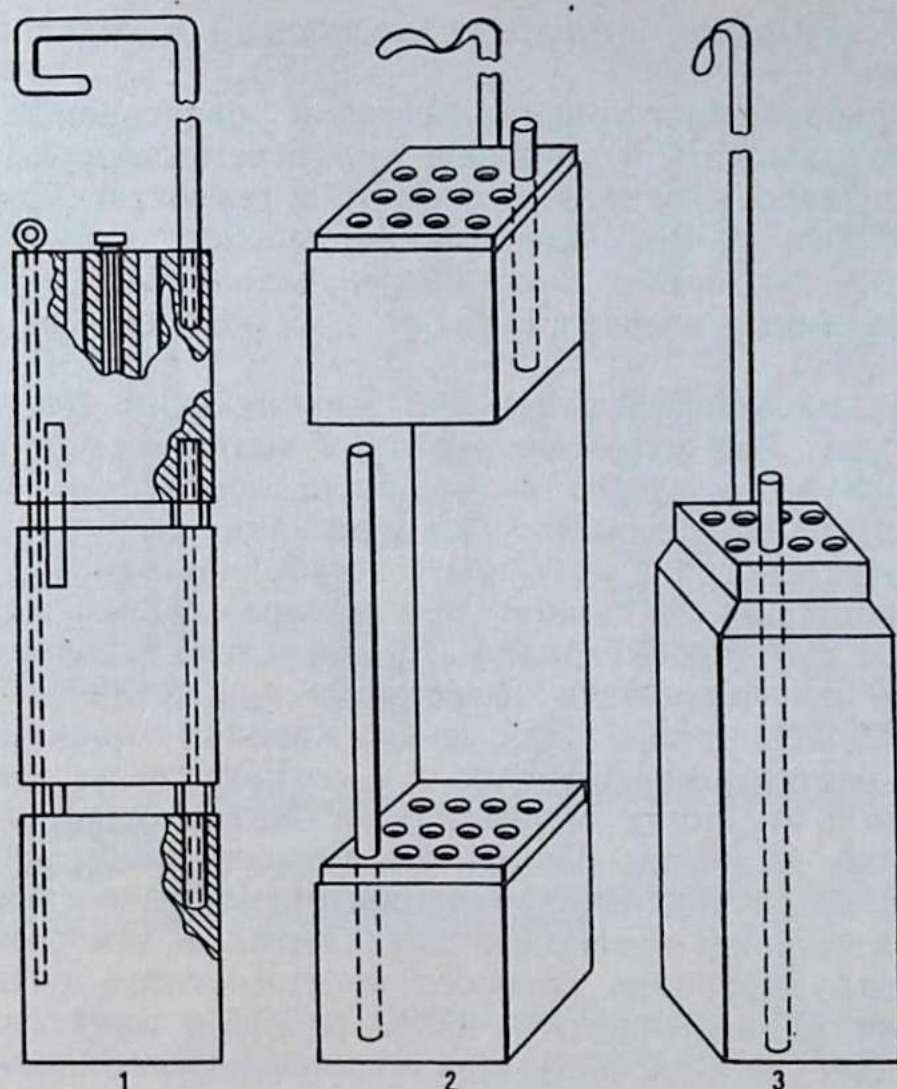


Рис. 40. Канистры для хранения и транспортировки эмбрионов в палочках и пластмассовых трубочках:

1 — блок кассет для пластиковых укороченных трубочек; 2 — канистра для одновременного хранения эмбрионов в палочках и трубочках; 3 — канистра для хранения эмбрионов в палочках

вина длины пробки. Боковое отверстие в корпусе стандартной канистры запаивают для сохранения в ней жидкого азота при размещении и удалении палочек. Для стандартной канистры диаметром 40 мм используют фторопластовую пластину с 25 отверстиями диаметром 4 мм каждая.

Оттаивание проводят на водяной бане при температуре 37°C . Соломинку быстро извлекают из контейнера, фиксируя в месте соединения с пробкой, и помещают на водяную баню до почти полного исчезновения льда (около 10 с). Во время оттаивания палочку плавно перемещают в воде маятникообразными движениями в наклонном положении. Наклон должен быть такой, чтобы пробки палочки находились над водой.

После оттаивания одноэтапно разбавляют криопротектор 0,5 М раствором сахарозы в этой же палочке, для чего ее встряхивают подобно клиническому термометру 3—4 раза для вы-

теснения пузырьков воздуха и смешивания находящихся в ней растворов.

Для разбавления криопротектора и уравнивания осмотического давления в эмбрионе при перемещении его в 0,5 М раствор сахарозы паветты помещают в термостат при температуре 37°C на 10 мин. Здесь их размещают в вертикальном положении так, чтобы пыж паветты находился снизу. Через 5 мин соломинку переворачивают и оставляют еще на 5 мин (пыж вверх).

После проведения указанных манипуляций эмбрион готов к пересадке. Под стереомикроскопом контролируют его местоположение в паветте, по возможности определяют качество и заправляют паветту в прибор для пересадки.

В качестве криопротектора и стабилизатора морфологического состояния бластоцист при замораживании применяют раствор 1,2 М пропанедиола. Пропанедиол не проявляет токсичности при сохранении бластоцист при комнатной температуре в 3,0 М растворе. При замораживании эмбрионов в ФБС с 2,0 М раствором пропанедиола и сохранении в жидком азоте в течение 3 мес после оттаивания не обнаруживается заметных отклонений от нормы. После 12—20-часового культивирования и пересадки их реципиентам приживляемость составила 62,5%.

Сравнительное испытание двух методов замораживания и оттаивания эмбрионов крупного рогатого скота показало, что медленное охлаждение до -60°C ($0,3^{\circ}\text{C}$ в мин) и медленное оттаивание (12°C в мин), как и медленное охлаждение до -30°C ($0,3^{\circ}\text{C}$ в мин) и быстрое оттаивание на водяной бане при температуре 37°C, дают одинаковые результаты. После оттаивания и культивирования эмбрионов в течение 12 ч перед пересадкой 86% из них нормально развивались. Выживаемость эмбрионов после нехирургической пересадки составила 66,6 и 73,3% соответственно.

Для накопления и хранения эмбрионов в пробирках или ампулах применяется унифицированное устройство, которое состоит из полого параллелепипеда, опускающегося вертикально в емкость с жидким азотом. На одной стенке параллелепипеда высверлены эллипсовидные отверстия для пробирок (рис. 41). Пробирки опускают наклонно до упора в противоположную стенку.

Таким образом, на параллелепипеде, сделанном из стандартного контейнера, умещается 40—50 пробирок. Таких держателей в сосуд Дьюара (СДС-40) можно поместить 6, то есть в сосуде может храниться 600 эмбрионов. Для более крупных сосудов такой держатель может быть взят большего диаметра и сделан в совмещенном (из четырех держателей) варианте. Устройство позволяет маркировать все образцы и составлять индивидуальную картотеку эмбрионов, обеспечивать постоян-

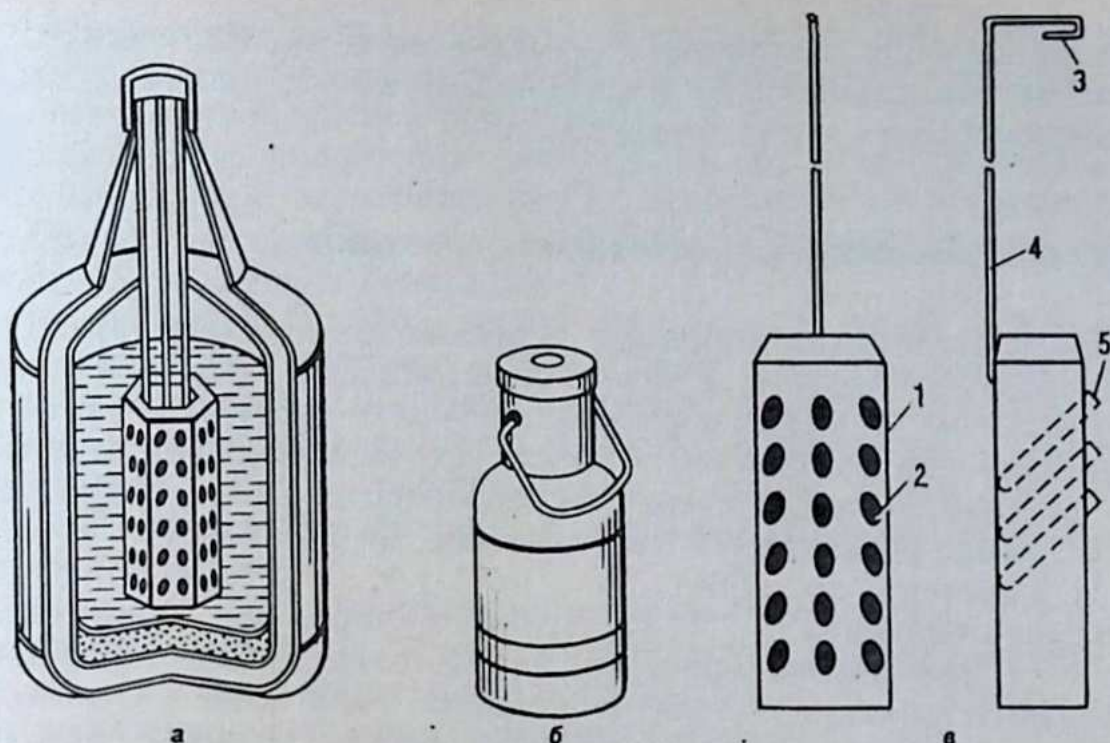


Рис. 41. Канистра для хранения и транспортировки эмбрионов в пробирках и ампулах:

а — сосуд Дьюара ХЗ4Б, с канистрами; б — транспортный сосуд Дьюара СДС-5; в — канистра: 1 — корпус; 2 — отверстия для пробирок и ампул; 3 — крючок держателя; 4 — держатель; 5 — пробирки с эмбрионами

ство температуры в них во время извлечения и переноса, отвечает современным требованиям гигиены и может быть использовано во всех сосудах.

У эмбрионов овец весьма чувствительной к замораживанию областью является зона пеллюцида, которая может по-разному повреждаться. Однако если в процессе замораживания и оттаивания бластомеры не повреждены, то частичное повреждение зоны пеллюцида не влияет на жизнеспособность эмбрионов, но на более ранних стадиях развития (например, ранняя морула 4-суточного возраста) жизнеспособность зародышей снижается.

Выживаемость эмбрионов овец на стадии поздней морулы и бластоцисты очень высокая при замораживании со скоростью 1°C в мин до -120°C с криопротектором ДМСО в концентрации 1,5 М при условии быстрого их оттаивания со скоростью 360°C в мин. Охлаждение эмбрионов со скоростью $0,3^{\circ}\text{C}$ в мин сопровождается снижением выживаемости до 80% как при быстром ($\sim 10^{\circ}\text{C}$), так и при медленном (4°C) оттаивании.

Медленное замораживание со скоростью $0,1^{\circ}\text{C}$ в мин в интервале температур от -30 до -60°C и медленное оттаивание дают отрицательные результаты выживаемости эмбрионов.

Эмбрионы овец можно хранить при температуре 10, 5 и 0°C

более 2 дней и в некоторых случаях — даже более 5 дней. При таком методе хранения 50% эмбрионов восстанавливают свою жизнеспособность после отогрева.

ПЕРЕСАДКА ЗАМОРОЖЕННО-ОТТАЯННЫХ ЭМБРИОНОВ

После оттаивания эмбрионы пересаживают реципиентам или сначала культивируют, а затем пересаживают. Нет существенных различий в числе нормальных 7- и 8-дневных эмбрионов после культивирования (50 и 56%). Не выявлено также заметных различий в числе стельных реципиентов после пересадки замороженно-оттаянных 7- и 8-дневных эмбрионов (39 и 45%) (Н. И. Сергеев и др., 1984).

Замораживание 11- и 12-дневных эмбрионов, покинувших оболочку, дает противоречивые результаты. Жизнеспособность их после оттаивания и культивирования была ниже. Отмечено, что при быстром оттаивании жизнеспособность выше, чем при медленном. Концентрация криопротектора и скорость замораживания не оказывают заметного действия на соотношение развивавшихся эмбрионов в культуральной среде.

Однако степень переживаемости эмбрионов в культуральной среде нельзя рассматривать как адекватный показатель по сравнению с показателем определения жизнеспособности замороженно-оттаянных эмбрионов после их пересадки реципиентам.

Стадия развития эмбриона крупного рогатого скота и овец имеет существенное значение при замораживании и оттаивании. Предшествующие стадии бластоцисты (ранние морулы) проявляют большую чувствительность к охлаждению. Эмбрионы, покинувшие зону пеллюцида, также быстро теряют способность к дальнейшему развитию после оттаивания, и результаты пересадки значительно снижаются.

Причины более низкой переживаемости вылупившихся бластоцист после замораживания, по-видимому, могут быть связаны с морфологическими изменениями, отсутствием зоны пеллюцида или с увеличенными размерами бластоцели, которая может влиять на осмотическое равновесие и образование льда внутри эмбриона в процессе замораживания.

Индекс приживляемости при пересадке замороженно-оттаянных 11—13-дневных эмбрионов составляет 15—20%, что значительно ниже, чем при пересадке свежеполученных эмбрионов той же стадии.

У лабораторных животных замороженно-оттаянные эмбрионы перед пересадкой необходимо культивировать или пересаживать реципиентам, у которых эстральный цикл на сутки раньше, чем у донора.

По-видимому, такое условие оправдано, и оно направлено на обеспечение ревосстановления полной метаболической активности эмбриона перед пересадкой.

Однако культивирование эмбрионов крупного рогатого скота и овец после оттаивания перед пересадкой не повышает их жизнеспособность. Вероятно, условия культивирования ниже условий матки после пересадки.

Пересадка эмбрионов реципиенту с эстральным циклом на день раньше, чем у донора, не улучшает их приживляемость, но и не снижает. По-видимому, если замороженно-оттаянные эмбрионы пересаживать реципиентам с синхронным с донором эстральным циклом, то они вполне должны быть способны проявлять немедленный рост и развитие без предварительного культивирования.

Выявлено, что 11—13-дневные эмбрионы успешно культивируются и проявляют удовлетворительную переживаемость к охлаждению и замораживанию только до -20°C и очень низкую переживаемость при замораживании до -100°C и хранении в жидком азоте.

Бластоцисты после культивирования в течение 24 ч оказываются непригодными для замораживания и длительного хранения. Это объясняется, по-видимому, ослаблением внутренней живучести и меньшей сопротивляемостью эмбриона к охлаждению. Отмечено, что 5-дневные ранние морулы или ранние бластоцисты обычно теряют жизнеспособность после замораживания и оттаивания, тогда как поздние морулы (6—5 дней) и бластоцисты (7,5—8 дней) хорошо переносят замораживание и оттаивание.

Подобное наблюдается у 10-суточных эмбрионов, классифицированных по стадиям развития. Получают низкую выживаемость замороженных и оттаянных эмбрионов после культивирования и трансплантации реципиентам. Эмбрионы, помещенные в культуру, развиваются не так, как в естественной среде. У культивированных эмбрионов на одной и той же стадии развития всегда меньшее число клеток, чем у свежих эмбрионов такого же возраста.

К морфологическим изменениям, несомненно, присоединяются и физико-химические отклонения от нормы, вызывающие снижение устойчивости эмбрионов к охлаждению при замораживании. Повторная адаптация к маточной среде после пересадки лучше у свежзамороженных 7—8-дневных эмбрионов, чем у эмбрионов того же возраста, замороженных после культивирования.

При нехирургической пересадке получают 60% выживаемости замороженно-оттаянных эмбрионов 6—7-дневных некультивированных бластоцист и 38,5% — при пересадке после культивирования в течение 24 ч.

Повреждения прозрачной оболочки при замораживании существенного влияния на приживляемость эмбрионов не оказывают. В эксперименте при помощи микроманипулятора стеклянным ножом в прозрачной оболочке было сделано маленькое отверстие, затем эмбрионы помещали в среду с содержанием 2,0 М раствора ДМСО и охлаждали до -100°C со скоростью $0,5^{\circ}\text{C}$ в мин, после чего их помещали на 24 ч в жидкий азот. Затем эмбрионы были оттаяны со скоростью 10°C в мин и после удаления криопротектора пересажены хирургическим методом телке-реципиенту. Через 280 дней родился нормальный теленок.

После медленного замораживания с применением 1,5 М ДМСО в фосфатном растворе со скоростью $0,3^{\circ}\text{C}$ в мин до -36°C и со скоростью $0,1^{\circ}\text{C}$ в мин до -60°C с последующим погружением эмбрионов в жидкий азот и после оттаивания от -50 до -10°C со скоростью 4°C в мин бластоцисты переносят на водяную баню; выживаемость эмбрионов составила 73%, а стельность после их пересадки — только 42%.

При ускоренном замораживании эмбрионов со скоростью 1°C в мин от 20 до -7°C и $0,3^{\circ}\text{C}$ в мин до -30°C , а затем $0,1^{\circ}\text{C}$ в мин до -40°C и при оттаивании со скоростью до 8°C в мин от -35 до -10°C выживаемость бластоцист составила 67%, а приживляемость — 75%. В опытах по изучению пригодности для криоконсервирования криопротекторов ДМСО и глицерина с добавлением в среду 20% фетальной сыворотки крови теленка выживаемость эмбрионов после пересадки не превышала 44%.

В опытах зародыши в одном случае замораживали до температуры -80°C , в другом — до -100°C с постоянной скоростью $0,27^{\circ}\text{C}$ в мин. Размораживали со средней скоростью от 12 до 14°C в мин. После достижения температуры от -8 до -6°C зародыши переносили на водяную баню с температурой 25°C на 15 мин, а затем оценивали морфологически. При этом морфологически нормальных эмбрионов в первой группе было 70,2%, во второй — 82,2%. Однако выживаемость эмбрионов после пересадки хирургическим методом через боковой разрез и по белой линии живота была низкой. Через вентральный разрез было пересажено 24 эмбриона 12 реципиентам, по два каждому, стельными оказались 3 (25%) реципиента. Выживаемость эмбрионов от числа пересаженных составила 12,5%. Через боковой разрез было пересажено 29 зародышей 21 реципиенту, стельность наступила у 2 (9,5%), выживаемость эмбрионов от числа пересаженных составила 6,9%.

Это, вероятно, отражает важнейшее значение криобиологических различий в режиме замораживания и оттаивания, а также в технике морфологической оценки и пересадки эмбрионов.

Медленное замораживание со скоростью $0,1^{\circ}\text{C}$ в мин в про-

межутке от -36 до -60°C теоретически позволяет максимально ограничить дегидратацию отдельных бластомеров, и это дает возможность избежать или видоизменить образование внутриклеточного льда. Медленное замораживание вызывает необходимость и медленного оттаивания в этом же интервале. Так, в медленном режиме заморожен и оттаян 41 эмбрион на стадии ранней бластоцисты. Выживаемость составила 73%, пересадили 19 эмбрионов, стельными оказались 9 реципиентов (42%). При быстром режиме замораживания и медленном оттаивании из 23 эмбрионов жизнеспособных было 15 (65%). Быстрое оттаивание снижало жизнеспособность эмбрионов до 23% (5 из 22 оттаянных). При быстром замораживании и оттаивании с использованием криопротектора ДМСО присущая клеткам дегидратация, по-видимому, нарушается. Замораживание бластоцист в среде ФБС с содержанием криопротектора 0,5 М ДМСО и 1,0 М глицерина в режиме охлаждения 1°C в мин до -7°C , затем в режиме $0,3^{\circ}\text{C}$ в мин до -30 и $0,1^{\circ}\text{C}$ в мин до -40°C с последующим погружением в азот и оттаивание со скоростью 8°C в мин от -35 до -10°C с последующим погружением на водяную баню при температуре 37°C не улучшали выживаемости зародышей. Из 28 замороженно-оттаянных эмбрионов морфологически нормальных оказалось 12 (41%). При использовании в качестве криопротектора 1,0 М раствора глицерина в среде ФБС и режиме замораживания 1°C в мин до -7°C , затем в режиме $0,3^{\circ}\text{C}$ в мин до -30 ... -35 или 40°C с последующим погружением в жидкий азот и при быстром оттаивании (эмбрионы из азота сразу погружали в теплую водяную баню с температурой 37°C) жизнеспособность эмбрионов составила 70% и после пересадки нехирургическим методом — 71%.

Глицерин добавляют и разводят при температуре 37°C , что, вероятно, обеспечивает оптимальное внутриклеточное равновесие и оказывает благоприятное воздействие на внутриклеточную криопротекцию. Медленное оттаивание до -80 и -70°C перед погружением эмбрионов в водяную баню при температуре 37°C способствует лучшей их выживаемости. Более продолжительный период медленного оттаивания до -60 или до -50°C не улучшает результаты выживаемости бластоцист. Температура, при которой криопротектор добавляют в среду, а также продолжительность уравнивания не являются необходимыми условиями для лучшей выживаемости эмбрионов. Скорость удаления криопротектора после оттаивания очень важна.

Непосредственная пересадка эмбрионов после оттаивания с содержанием в среде 1,5 М ДМСО значительно снижает их выживаемость. Подобное использование эмбрионов, замороженных в среде с 0,6 М раствором глицерина после оттаивания и

пересадки без удаления криопротектора, приводит к нулевым результатам.

По-видимому, это одна из основных проблем метода глубокого замораживания эмбрионов крупного рогатого скота и овец, которая связана с установлением оптимальных связей между режимом замораживания, оттаивания и концентрацией криопротектора.

Необходимо не допускать повреждения эмбрионов после погружения в жидкий азот, что положительно сказывается на их выживаемости. Так, при температуре -30 и -40°C эмбрионы содержат в себе замороженную воду, которая может привести к образованию внутриклеточного льда, что в конечном счете при соответствующих условиях (например, медленное оттаивание) благоприятствует рекристаллизации мельчайших внутриклеточных кристаллов льда в большие образования.

С понижением температуры до -60°C и ниже эмбрионы более полно дегидратируются и образование льда в оставшейся жидкой фазе в период оттаивания маловероятно. При этих обстоятельствах сравнительно большое число эмбрионов неспособны достаточно быстро регидратировать с экстрацеллюлярной средой при быстром оттаивании.

По криобиологическим воздействиям криопротекторы ДМСО и глицерин весьма сходны, и при их применении существенной разницы по объективным критериям в уровне жизнеспособности эмбрионов нет. Если же оценивать криопротекторы по более субъективным критериям, то эмбрионы, замороженные в глицерине, морфологически выглядят лучше по сравнению с эмбрионами, замороженными в среде ФБС с ДМСО.

При замораживании 7—8-дневных бластоцист с использованием криопротектора глицерина у 30% оттаянных эмбрионов наблюдается повреждение зоны пеллюцида. После пересадки таких эмбрионов стельность наступает у 20% коров. На результаты стельности оказывает положительное влияние целостность блестящей оболочки. Продолжительное культивирование эмбрионов перед трансплантацией оказывает отрицательное влияние на их жизнеспособность.

Достаточная степень эмбриональной приживляемости и стельности реципиентов при трансплантации может быть получена при относительно простых процедурах замораживания и оттаивания. Не выявлено существенных различий в числе морфологически нормальных эмбрионов в зоне пеллюцида на 7-й (75%) и 8-й день (72,2%). Жизнеспособность эмбрионов, покинувших зону пеллюцида, заметно ниже, и число нормальных зародышей после оттаивания составляет 47,7%.

Значительных различий в уровне стельности реципиентов и индексе приживляемости при использовании 7- или 8-дневных эмбрионов, заключенных в зону пеллюцида, не выявлено.

Отмечено снижение результатов стельности и приживляемости blastocист, покинувших зону пеллюцида.

Таким образом, стадия развития играет существенную роль в сохранении жизнеспособности эмбриона после замораживания и оттаивания. Предшествующие стадии blastocисты проявляют высокую чувствительность к охлаждению, и после вылупления из зоны пеллюцида способность эмбрионов к развитию при трансплантации заметно снижается.

Низкая переживаемость вылупившихся blastocист после замораживания и оттаивания может быть обусловлена морфологическими изменениями в связи с отсутствием зоны пеллюцида, не улавливаемыми при микроскопической оценке, или увеличенными размерами межклеточных blastоцелей, что может влиять на осмотические условия и образование льда внутри эмбриона в процессе замораживания.

Наиболее приемлемый возраст эмбрионов для замораживания и пересадки — ранние и экспандированные blastocисты (7—8-й день). Степень приживляемости их составляет 26—30% и стельность — 46,1—50,0%. Это намного ниже, чем при использовании свежих эмбрионов. Однако более тщательный отбор эмбрионов для замораживания и трансплантации после оттаивания и совершенствования техники замораживания может значительно улучшить результаты стельности при их пересадке.

При трансплантации четко должна выдерживаться синхронность охоты реципиента и возраста эмбриона. Однако необходим какой-то период времени, прежде чем трансплантировать эмбрионы реципиентам, отобранном по эстральному циклу на день раньше, нежели возраст эмбриона. По-видимому, это необходимо для полного ревосстановления метаболической активности эмбриона перед пересадкой или перед асинхронными условиями, существующими между эмбрионами и условиями матки реципиента.

Трансплантация реципиенту с эстральным циклом на день раньше, чем возраст эмбриона, не улучшает их приживляемость, но и не подавляет ее. Вероятно, пересаженные замороженно-оттаянные эмбрионы реципиентам с синхронным эстральным циклом вполне способны проявлять немедленный рост и развитие, что подтверждается результатами многочисленных опытов. Приживляемость эмбрионов и последующие отелы наблюдаются в равной степени у реципиентов с синхронным и асинхронным (на 1 день раньше) половым циклом.

Не выявлено существенных различий по числу стельных коров после пересадки эмбрионов, как синхронных по возрасту с эстральным циклом реципиентов, так и на 1 день старше.

Не обнаружено заметных различий в переживаемости эмбрионов с полностью экспандированной blastоцелью, со спу-

щенной или с узкими «окошечками», когда бластоцеллюлярная полость сразу же заполняется замораживаемой средой.

Тенденция к повышению переживаемости экспандированных бластоцист по сравнению с более ранними бластоцистами, возможно, связана или с неодинаковой дегидратацией клеток в процессе замораживания и соответственно с ростом кристаллов льда во время медленного оттаивания, или с некоторыми другими субоптимальными условиями, которые могут вызывать осмотический шок или межклеточное образование льда.

Манипуляции с эмбрионами занимают обычно 2—2,5 ч со времени их получения и до пересадки или замораживания. При этом для создания условий, обеспечивающих сохранение жизнеспособности эмбрионов, применяют специальную методику кратковременного их хранения. Она заключается в следующем: эмбрионы, извлеченные из промывной среды, пастеровской пипеткой переносят в часовые стекла диаметром 50—70 мм. В каждое часовое стекло целесообразно помещать по одному или по два эмбриона крупного рогатого скота, или по 4—5 эмбрионов овец, с тем чтобы в дальнейшем вести их отдельный учет до пересадки реципиенту. В часовых стеклах должно быть не менее 0,5 мл среды. В качестве среды в большинстве случаев используют фосфатно-буферную смесь Дюльбекко. К ней добавляют 20% сыворотки крови теленка или овцы. Часовые стекла с эмбрионами помещают в чашку Петри, дно которой покрывают увлажненной фильтровальной бумажкой. В закрытой чашке Петри образцы помещают в термостат при температуре 37°C. В таких условиях эмбрионы сохраняют жизнеспособность в течение нескольких часов до криоконсервирования или пересадки после оттаивания.

При указанном методе кратковременного хранения 78,9% эмбрионов сохраняют жизнеспособность 5 ч и более. Приживляемость эмбрионов после нехирургической пересадки ранних бластоцист равна 33,3%, экспандированных — 42,8% и бластоцист без зоны пеллюцида — 23,1%.

Как правило, после суперовуляции и нехирургического извлечения на 6—8-й день после осеменения обнаруживают только 50—60% жизнеспособных эмбрионов. Однако и среди эмбрионов, признанных жизнеспособными, наблюдаются значительные качественные различия, которые, вероятно, имеют важное значение в выживаемости зародышей после глубокого замораживания и оттаивания.

Выживаемость замороженно-оттаянных 7-дневных бластоцист, а также их приживляемость после хирургической пересадки выше, чем у морул 6—6,5-дневного возраста. Даже при хорошем качестве морул после оттаивания стельность при их пересадке остается низкой (26,7%), что связано, по-видимому,

с определенными изменениями во внутренней структуре эмбриона, не улавливаемыми при микроскопической оценке.

Под электронным микроскопом у морул наблюдается разрушение соединений и микроволокон между трофобластами. Вероятно, десмосомы и тонковолокнистые структуры регулируют проницаемость экзо- и эндоцеллюлярной жидкости в эмбрионе. Такие функциональные нарушения не дают возможности уравнивать внутреннее давление в клетках, которое играет существенную роль в выживаемости эмбрионов.

При использовании в качестве криопротектора глицерина существует общепринятая технология замораживания эмбрионов и определена последовательность процессов. Вначале готовят 40 мл основного 10%-ного раствора глицерина в среде ФБС (18 мл среды + 2 мл глицерина), затем — 3,3%-ный и 6,6%-ный растворы глицерина (3,3% — 10 мл среды + 5 мл 10%-ного раствора глицерина; 6,6% — 5 мл среды + 10 мл 10%-ного раствора глицерина), растворы хорошо перемешивают.

Эмбрионы, предназначенные для заморозки, помещают в 3,3%-ный раствор на 10 мин, затем в течение 5 мин промывают и переносят в 6,6%-ный раствор на 14 мин, после отмывают в течение 7 мин и переносят эмбрионы в 10%-ный раствор на 30 мин, наконец, отмывают в течение 10 мин и помещают в ампулы или соломинки. Замораживание эмбрионов начинают после 30-минутного их пребывания в 10%-ном растворе глицерина, поэтому помещать их в ампулы нужно несколько раньше. Работу по перемещению эмбрионов в ампулы нужно проводить осторожно, во избежание поломки ампул и пипеток с эмбрионами.

Ампулы с эмбрионами герметически закрывают, помещают в охладитель с температурой 18—20°C и охлаждают со скоростью 1°C в мин до —6°C. При этой температуре вызывают кристаллизацию и продолжают охлаждение со скоростью 0,3°C в мин до —40°C, затем погружают в жидкий азот, по возможности как можно быстрее.

При оттаивании эмбрионов готовят растворы глицерина необходимой концентрации. Разбавляют 10%-ный раствор глицерина в эмбрионах путем проводки их через растворы пяти разведений при комнатной температуре (табл. 15).

Ампулы с эмбрионами, предназначенные для оттаивания, быстро извлекают из жидкого азота и немедленно погружают в теплую водяную баню с температурой 25°C. Эмбрионы, извлеченные из ампул, помещают в 10%-ный глицерин на 5 мин, в течение 10 мин их отмывают и переносят в последующие разведения на 10 мин с отмывкой в течение 5 мин после каждого разведения. Из последнего разведения раствора глицерина эмбрионы переносят на 20 мин в чистую среду.

15. Схема приготовления растворов разной концентрации

Разведение, %	Количество 10%-ного раствора глицерина в среде, мл	Количество среды, мл
8,3	10	2
6,7	8	4
6,0	6	6
3,3	4	8
1,7	2	10

Перед использованием эмбрионов для пересадки или культивирования их отбирают по морфологическим признакам жизнеспособности на инвертированном микроскопе. Эмбрионы, оставшиеся жизнеспособными после замораживания и оттаивания, морфологически выглядят нормальными. Встречающиеся криоповреждения зоны пеллюцида не оказывают существенного влияния на жизнеспособность эмбрионов при пересадке. Под микроскопом поврежденные эмбрионы представляют собой аморфное образование с многочисленными отделившимися клетками от общей клеточной массы.

При сокращенном режиме после кристаллизации (-7°C) эмбрионы охлаждают со скоростью $0,3^{\circ}\text{C}$ в мин до -35°C и затем со скоростью $0,1^{\circ}\text{C}$ в мин до -38°C , после чего погружают в жидкий азот. Оттаивание быстрое в водяной бане при температуре 37°C с использованием для удаления криопротектора глицерина 0,5 и 0,25 молярной концентрации раствора сахарозы (фосфатный буфер + 0,5 М сахарозы). В каждом растворе выдерживают 10 мин, затем 3—4 раза отмывают в культуральной среде. После отмывания все эмбрионы оценивают под микроскопом и классифицируют как очень хорошие (структура эмбриона без видимых изменений), хорошие (небольшие морфологические отклонения — один или два свободных blastomeres со слабым сжатием клеточной структуры) и плохие (разрыв прозрачной оболочки или полное разрушение эмбриона).

Замороженные в медленном режиме после оттаивания 84,6% эмбрионов оказались пригодными для пересадки и 15,4% — дегенерированными. Из общего числа эмбрионов, пригодных для пересадки, 34% оценены как очень хорошие, 61,4% — хорошие и 4,5% — плохие. При замораживании по ускоренному режиму и быстрому оттаиванию общее число эмбрионов, пригодных для пересадки, может составлять 79,3%, дегенерированных — 20,7%. Из общего количества пригодных по принятой классификации очень хороших эмбрионов бывает 42,8%, хороших — 57,2%. Плохих эмбрионов при этом режиме замораживания обычно не бывает.

Результаты замораживания blastocysts с использованием двух режимов и двух криопротекторов практически одинаковы.

16. Результаты пересадки замороженно-оттаянных эмбрионов в зависимости от срока хранения (по Н. И. Сергееву, А. А. Плаксееву и др., 1984)

Показатели	Срок хранения, мес				
	до 1	1—3	3—6	6—12	12
Пересажено эмбрионов	40	24	21	14	23
Число реципиентов	33	17	14	11	17
Стельных реципиентов	12	9	6	8	9
% стельности	36,4	52,9	42,8	72,7	52,9

Процент нормальных эмбрионов после быстрого замораживания и оттаивания бывает несколько меньше (79,4 против 84,6%), а уровень стельности — выше (66,6 против 52,3%).

Наблюдаются различия в уровне стельности между эмбрионами, получившими морфологическую оценку «очень хорошие» и «хорошие». При пересадке эмбрионов с оценкой «очень хорошие» стельность составляет 78,8%, с оценкой «хорошие» — 49%.

Это свидетельствует о существенном влиянии качества эмбрионов перед замораживанием на их жизнеспособность после оттаивания и последующую приживляемость у телок-реципиентов.

Эмбрионы, оцененные перед замораживанием как отличные, после оттаивания не переходили в плохие. Из числа эмбрионов, оцененных перед криоконсервированием как хорошие, после оттаивания плохих было 14,3%, а из числа посредственных — 36,4%. У эмбрионов более высокого качества после оттаивания и нехирургической пересадки телкам-реципиентам наблюдается и более высокий уровень приживляемости. Так, от пересадки blastocyst хорошего качества стельность реципиентов составила 66,6%, а от пересадки посредственных — 38,9%, морул хороших и посредственных — соответственно 33,3 и 11,1%.

Эмбрионы с морфологической оценкой «посредственные» нецелесообразно криоконсервировать, так как после оттаивания около 40% их оказываются непригодными для пересадки. Такие эмбрионы необходимо трансплантировать сразу же после извлечения или культивировать, а затем трансплантировать.

В табл. 16 приведены результаты пересадки замороженно-оттаянных эмбрионов разных стадий развития (морулы и blastocyst) и неодинакового качества в зависимости от срока хранения их в жидком азоте.

Приведенные результаты нехирургической пересадки замороженно-оттаянных эмбрионов показывают, что нет связи между приживляемостью эмбрионов и длительностью хранения их в жидком азоте. Увеличение срока пребывания эмбрионов

в низкотемпературной среде не оказывает существенного влияния на последующую их жизнеспособность. Вероятно, данный показатель в большей степени зависит от качества эмбрионов перед замораживанием. Практикуемый метод замораживания позволяет криоконсервировать эмбрионы на длительный срок и восстанавливать их жизнеспособность после оттаивания на уровне примерно 72%.

Применение в качестве криопротектора глицерина при так называемом быстром методе замораживания дает возможность существенно упростить технологию криоконсервирования эмбрионов. При этом общий уровень выживаемости эмбрионов достигает 63,7%, стельность — 45,2%. С применением автоматизированных замораживателей уровень стельности удалось повысить до 65%. С упрощением режима охлаждения выживаемость эмбрионов увеличивается до 79% после быстрого оттаивания.

Применение соломинок в качестве контейнера для эмбрионов и сахарозы для удаления криопротектора глицерина способствует повышению переживаемости эмбрионов до 83,3%.

При общепринятом постепенном удалении криозащитной среды часто наблюдаются необратимые повреждения оболочки blastomerov из-за осмотических изменений и материал клетки освобождается. При введении раствора сахарозы происходит легкое сжатие эмбриона. Однако экспандирование в культуральной среде восстанавливает их. Дополнительное введение сахарозы сокращает процесс растворения (отмывания) криопротектора с обычных 50—60 до 10—15 мин.

Повреждения зоны пеллюцида у эмбрионов крупного рогатого скота и овец могут быть от узких трещин до полного сползания оболочки. Частота встречаемости таких повреждений колеблется от 10 до 25%. Незначительные повреждения зоны пеллюцида не влияют на последующую жизнеспособность зародышей. После пересадки эмбрионов с поврежденной зоной стельность составила около 50%. По-видимому, главное в сохранении жизнеспособности состоит в значительной целостности blastomerov и клеточных структур зародышей.

В редких случаях устанавливают разрушения соединений между blastomeres, которые выглядят структурно нормальными, но разобщенными друг с другом щелевыми пространствами. Повреждения, вызванные осмотическим стрессом, существенны при необратимой потере воды и проявляются при характерном уменьшении объема (сжатие) зародыша.

Совершенствование метода глубокого замораживания позволит при строгом отборе эмбрионов по качеству перед замораживанием и после оттаивания получать при нехирургической пересадке высокий показатель стельности (около 60%).

Пока еще не решен вопрос о том, насколько устойчив за-

17. Зависимость результатов стельности от качества реципиентов

Показатели	Реципиенты		
	очень хорошие	хорошие	средние
Пересажено эмбрионов	54	27	20
Степеньность реципиентов	27	8	4
Процент стельности	49,9	29,6	20,0

родыш к охлаждению и что вызывает его гибель, если морфологические признаки свидетельствуют о его нормальном развитии. Возможно, одной из причин неприживления эмбрионов могут быть летальные изменения в отдельных клетках, не улавливаемые микроскопически, но которые могут быть определены специфическими красителями, например ФДА. Своевременное выявление погибших клеток может помочь в прогнозировании исхода пересадки. Однако полностью полагаться на метод окрашивания нельзя, так как частичное окрашивание эмбриона не может свидетельствовать о полной утрате жизнеспособности.

Очень важным в прогнозировании приживляемости эмбрионов в матке реципиента может быть иммунное отношение между ними. Кроме того, причиной гибели эмбрионов могут быть условия получения эмбрионального материала. Установлена прямая зависимость качества эмбрионов от уровня суперовуляции. Чем выше уровень суперовуляции, тем больше дегенерированных эмбрионов, ниже индекс оплодотворяемости и выход нормальных эмбрионов на обработанного донора. На эти показатели оказывает существенное влияние уровень кормления, общее состояние животного-донора, порода, сезон года и др. Для достижения хороших результатов трансплантации большое значение имеет качество реципиентов. Их оценивают после выявления охоты и ректального исследования репродуктивных органов перед пересадкой (размер яичников, состояние матки и т. д.). В табл. 17 показаны результаты стельности после пересадки замороженно-оттаянных эмбрионов в зависимости от качества реципиентов.

Хороших результатов стельности при нехирургической пересадке эмбрионов можно достичь только в том случае, если подобраны очень хорошие реципиенты (гинекология, общее развитие и состояние).

ДАЛЬНЯЯ ТРАНСПОРТИРОВКА ЗАМОРОЖЕННЫХ ЭМБРИОНОВ

Глубокое охлаждение эмбрионов применяется при их импорте и экспорте, а также для создания эмбриобанка. Перевозка замороженных эмбрионов легко осуществима и недорого

стоит, нет риска переноса инфекционных и других болезней из одной страны в другую, значительно снижаются расходы, связанные с карантином импортированных животных.

Стоимость эмбриона и процедуры пересадки в стране-импортере значительно дешевле по сравнению с торговлей стельными животными. Это позитивный фактор. Торговля эмбрионами быстро развивается.

В нашей стране первая транспортировка глубокозамороженных эмбрионов на дальнее расстояние была осуществлена в 1980 г. Эмбрионы, полученные от коров-доноров черно-пестрой породы, были заморожены, хранились в жидком азоте более 6 мес и самолетом перевезены в транспортном сосуде Дьюара из Дубровиц (ВИЖ) Московской области в совхоз имени XX партсъезда Алма-Атинской области Джамбулского района. На ферме они были оттаяны и пересажены 12 телкам-реципиентам алатауской породы. По результатам ректального исследования, стельность была определена у пяти реципиентов. Родилось пять черно-пестрых телят, или 41,7% от числа пересаженных эмбрионов.

В 1981 г. было транспортировано из Дании 14 замороженных эмбрионов, которые в лаборатории трансплантации ВИЖа были оттаяны, и 8 пригодных для пересадки эмбрионов (57,1%) были пересажены 8 телкам-реципиентам. Стельными оказались два реципиента (25%), получен один теленок (рис. 42, *вверху*). Другая телка abortировала на 6-м месяце стельности.

В августе 1982 г. из ФРГ самолетом было транспортировано 20 криоконсервированных эмбрионов от высокопродуктивных коров-доноров голштинской и симментальской пород. После оттаивания оказались пригодными к пересадке 14 эмбрионов (70%), в том числе 6 эмбрионов от коров-доноров голштинской породы (60%) и 8 — симментальской (80%). Эмбрионы были трансплантированы нехирургическим методом 14 телкам-реципиентам черно-пестрой породы. Стельными оказались 8 телок-реципиентов (57,1%).

От пересадки эмбрионов голштинской породы получено 3 телочки, в том числе один отел двойневый (монозиготная двойня) из 7-дневного оттаянного после замораживания эмбриона. Монозиготность подтверждена по группам крови (рис. 42, *внизу*). Это второй случай в мире получения двойни при пересадке эмбрионов. Первый случай был зарегистрирован в Бельгии после пересадки свежего 10-дневного эмбриона.

От пересадки эмбрионов симментальской породы стельность была зарегистрирована у 6 телок-реципиентов (75%) и получено 4 теленка (1 бычок и 3 телочки). Одна телка-реципиент abortировала на 5-м месяце стельности, и одна отелилась мертвым теленком на 9-м месяце стельности. В общей сложности

было получено 7 телят (50%) от пересадки нехирургическим методом 14 оттаянных после замораживания эмбрионов.

В 1984 г. из Канады в СССР было импортировано 36, в 1985 г. — 90 замороженных эмбрионов красных и черно-пестрых голштинов. После оттаивания пригодными для пересадки в первом случае были 24 (66,7%), во втором — 69 эмбрионов (76,7%). Эмбрионы были пересажены 93 телкам-реципиентам. Стельными оказались 10 и 26 телок, или 41,7 и 37,7% соответственно. Общая стельность от пересадки замороженно-оттаянных эмбрионов составила 38,7%. Аналогичные результаты получены при транспортировке замороженных эмбрионов из США (штат Колорадо) в Мексику. Было пересажено 20 эмбрионов, стельными стали 7 реципиентов (35%). В ФРГ в производственных условиях от симментальских коров после пересадок 332 замороженно-оттаянных эмбрионов получено 116 стельностей, или 34,9% (1984 г.).

Полученные результаты нельзя считать окончательными, поскольку метод и техника трансплантации эмбрионов совершенствуются. Чтобы метод глубокого замораживания был рентабельным, стельность должна быть на уровне 50—60% от числа пересаженных транспортированных эмбрионов. Замораживание эмбрионов одноступенчатым методом значительно упрощено: их можно оттаивать, разбавлять криопротектор и пересаживать в условиях ферм без больших лабораторных затрат.

ТРАНСПЛАНТАЦИЯ И ХРАНЕНИЕ ЭМБРИОНОВ СВИНЕЙ, ЛОШАДЕЙ

В начале 60-х годов были впервые разработаны способы получения и трансплантации эмбрионов свиней. Используются они пока в основном в научных исследованиях при изучении раннего эмбрионального развития, выживаемости эмбрионов в организме и вне его, передвижения и местоположения зародышей в матке и факторов, влияющих на их выживаемость.

Высокая плодовитость и скорость воспроизводства свиней по сравнению с крупным рогатым скотом сдерживают трансплантацию эмбрионов для генетического улучшения или для получения большего числа потомков от высокопродуктивных животных.

Трансплантация эмбрионов дает возможность без риска заноса заболеваний транспортировать генетический эмбриоматериал в закрытые стада (промышленные свиноводческие комплексы).

Вызывание суперовуляции у свиней. Суперовуляцию вызывают введением гонадотропных гормонов (ГСЖК) на 15-й или 16-й день эстрального цикла в дозе 1000—1500 МЕ. У половозрелых подсвинков может быть 25—30 овуляций.

Такую же реакцию яичников получают при гормональной обработке ГСЖК в дозе 600 МЕ в смеси с 200 МЕ хорионического гонадотропина. Обработанные гонадотропином животные проявляют признаки охоты обычно через 3,5—4 дня после введения ГСЖК. У некоторой части животных удается синхронизировать время овуляции путем инъекции 500 МЕ хорионического гонадотропина на третий день после введения СЖК.

Оплодотворяемость яйцеклеток у животных с вызванной суперовуляцией, как правило, нормальная, кроме тех случаев, когда скорость овуляции очень высока и могут овулировать незрелые овоциты. Схема гормонального вызывания суперовуляции у неполовозрелых подсвинков аналогичная.

Техника получения и трансплантации эмбрионов. Извилистое строение шейки и рогов матки у свиней не позволяет получать эмбрионы из матки нехирургическим способом. Хирургический способ довольно простой, и длительность операции не превышает 30 мин. Эмбрионы извлекают через вентральный разрез с применением общего наркоза в положении животного лежа на спине. Через разрез поочередно извлекают рога матки и с помощью системы катетеров промывают полость рогов. Ранние зародыши (1-, 2- и 4-клеточные) получают из яйцеводов через 40 ч после овуляции.

Тонкую стеклянную канюлю вставляют через прокол в суженную часть верхушки рога матки. С помощью шприца с тонким эластичным катетером нагнетают промывную жидкость через воронку яйцевода и через канюлю собирают ее в мерные стаканы или сразу же в чашки Петри. Эмбрионы свиней обычно перемещаются в матку на более ранней стадии развития, чем эмбрионы других видов животных. Поэтому вымывают эмбрионы через яйцевод в том случае, если точно известно время овуляции.

Определение охоты по уровню подъема эндогенного лютеонизирующего гормона может быть ошибочно. Более точно определить охоту у свиней можно путем инъекции хорионического гонадотропина в период позднего проэструса.

Если эмбрионы попадают в матку на 4-клеточной стадии, то их невозможно вымыть через яйцевод из-за клапанного строения матки. Через 5—6 дней после охоты у свиней эмбрионы находятся вблизи верхушки маточного рога, поэтому наиболее эффективно ее промывать в это время. При этом матку пережимают пинцетом на достаточном расстоянии от места соединения рога матки с яйцеводом. В полость рога выше зажима через небольшой разрез вставляют канюлю большого диаметра, а вторую, более тонкую, канюлю вставляют через прокол в самую верхушку рога, через которую подают промывную жидкость. Позднее, когда эмбрионы начинают перемещаться в матку, промывают рога целиком.

Для промывания используют среду, состоящую из физиологического раствора с буферным фосфатом Дюльбекко, обогащенную лактатом, пируватом и сывороточным альбумином крупного рогатого скота. Преимущество среды с буферным фосфатом по сравнению с другими средами, например с буферным бикарбонатом, — постоянство рН при соприкосновении среды с воздухом.

Получать зародыши у свиней можно в течение 12 дней после начала охоты. Эффективность технологии очень высока и позволяет получать в среднем 95% зародышей от числа овуляций. Повторные подобные операции неизбежно ведут к появлению рубцов и спаек, поэтому оперировать животное можно максимум 3—4 раза.

Синхронизация охоты у свиней-реципиентов. Важный фактор, определяющий успех пересадки эмбрионов, — степень синхронизации охоты у доноров и реципиентов. В ранних экспериментах по трансплантации эмбрионов у свиней для контроля начала охоты у донора и реципиентов использовали металлибур. Этот препарат был самым эффективным синхронизирующим средством, после которого можно вводить гонадотропины для вызывания полиовуляции или овуляции в нужное время. Поскольку металлибуру свойственно тератогенное действие, то в 70-е годы велись поиски новых средств. Делались попытки применить для синхронизации охоты простагландин или его аналоги до 12—13-го дня, но безуспешно.

Лучшим способом оказалось продление лютеальной функции яичников с помощью беременности. Животным через 40 дней после спаривания инъектируют простагландин, вызывают аборт и через 4—7 дней большинство животных проявляют нормальные признаки охоты. Пересадка эмбрионов после такой синхронизации охоты индуцирует хорошую ее приживляемость.

В настоящее время имеется более простой и эффективный способ синхронизации охоты у свиней, основанный на применении orally прогестинов — тренболона или альтреногеста.

Обработку начинают в любой день эстрального цикла путем скармливания препарата с кормом в течение 18 дней по 15—20 мг в день. Охоту у свиней выявляют 2 раза в день с помощью хряка-пробника. Действие препаратов основано на подавлении роста фолликулов в яичнике, но после прекращения скармливания препарата наблюдается проявление их фолликулярной активности на 8-й день у 98% животных. Единственной проблемой применения тренболона или альтреногеста является высокая вариабельность суперовуляции, вызванной ГСЖК в сочетании с хорионическим гонадотропином.

Пересадка эмбрионов. Применяют хирургический метод, технология которого такая же, как и при извлечении эмбрионов.

В зависимости от стадии развития эмбрионы пересаживают или в яйцевод, в ампульную его часть (2—4-клеточные), или в верхушку рога матки (более поздние стадии развития).

Для пересадки используют тонкую пастеровскую пипетку, в которую заключают эмбрион в 0,2 мл питательной среды. При аппликации зародышей в яйцевод пипетку вводят в ампульную его часть на глубину до 5 см и нажатием на резинку проксимального конца пипетки эмбрионы выталкивают в просвет яйцевода.

При пересадке эмбрионов в рог матки делают прокол тупой иглой в месте соединения яйцевода на 2 см выше верхушки рога. Пипетку вводят в просвет рога через маточно-трубное соединение. Это позволяет избежать повреждения матки и возможного кровотечения.

У свиней эмбрионы находятся в яйцеводах очень недолго, поэтому для пересадки применяют другой способ. Предназначенные для пересадки зародыши вводят в один яйцевод в большем объеме жидкости, они как бы вымываются из яйцевода и позднее будут перемещаться и равномерно распределяться в обоих рогах матки.

Попытки нехирургической трансплантации эмбрионов через шейку матки не были успешными. Представляется возможным проводить пересадку эмбрионов у свиней с помощью лапароскопии. Такой способ пересадок наиболее удобен на фермах, где отсутствует необходимая хирургическая техника.

Раннее эмбриональное развитие. У свиней около 30% потенциальных эмбрионов погибает к 25-му дню супоросности. Важно отметить, что 22% получаемых эмбрионов из матки через 6—9 дней после осеменения имеют признаки дегенерации, 5% составляют неоплодотворенные яйцеклетки. Предполагают, что одна из причин ранней эмбриональной смертности — генетические аномалии, появляющиеся в результате ошибочного определения времени оплодотворения.

Однако при детальном цитогенетическом изучении эмбрионов свиней, взятых в течение 12 дней после овуляции, отмечено незначительное число аномалий. По другим данным, для большинства животных не характерно большое число потерь эмбрионов, по крайней мере, в течение первых 2—2,5 недель супоросности. Так, эмбриональная смертность у 13 свиноматок, убитых на 13—18-й день, составила 28,4%, у других животных этот показатель был выше. У оставшихся 11 животных процент потерь в среднем был только 12%. Несомненно, что у большинства животных к 30-му дню супоросности эмбриональные потери возрастают.

Выживаемость эмбрионов, полученных от доноров через 2—5 дней после начала охоты и пересаженных синхронизированным свиньям-реципиентам, составляет 60—70%. Пересадка

в более поздние стадии развития (7—8-й день) после начала охоты приводит к значительному снижению выживаемости или к полной эмбриональной потере.

Относительно мало известно о значении синхронности эстрального цикла у свиней доноров и реципиентов. Наблюдения показывают, что пересадка более старых зародышей в более молодые матки дает лучшие результаты, чем пересадка более молодых зародышей в более старые матки.

Неудовлетворительные результаты приживляемости эмбрионов 7—8-дневного возраста объясняются отсутствием необходимой среды, используемой при их извлечении. Вылупившиеся эмбрионы из зоны пеллюцида легко повреждаются вне организма и поэтому среда, которая используется для ранних эмбрионов, неприменима для более поздних.

Перемещение эмбрионов в рогах матки обычно происходит через 6 дней, а при пересадке их в один рог они попадают в другой на 8—9-й день. Полное перераспределение эмбрионов в рогах заканчивается к 15-му дню. Установлена зависимость между приживляемостью эмбрионов и наличием свободных участков матки. Беременность обычно прерывается, если эмбрионы отсутствуют более чем в половине маточного рога. Доказано, что в изолированных сегментах матки эмбрионы не приживаются независимо от их числа. Таким образом, приживляемость не зависит от уровня лютеотропного стимула, вырабатываемого эмбрионами. Для предотвращения лютеолиза, а следовательно, и повышения приживляемости необходимо, чтобы эмбрионы контактировали с большей поверхностью эндометрия матки.

При небольшом числе эмбрионов в матке эмбриональные мембраны длиннее, вследствие чего бо́льшая площадь эндометрия оказывается свободной от контакта с эмбриональными мембранами и возможности приживляемости эмбрионов резко снижаются. Поэтому для увеличения приживляемости необходимо апплицировать не менее 4 эмбрионов в каждый рог матки. Однако число эмбрионов в матке — не основной фактор, ограничивающий размер помета у свиней в течение первых 25—30 дней супоросности. Размер помета был одинаковым к 25-му дню у подсвинков, которым пересаживали 12 или 24 эмбриона.

Таким образом, ранняя эмбриональная смертность более связана с факторами взаимодействия эмбриона и среды матки, нежели со способностью матки вынашивать ограниченное число эмбрионов. Однако к концу беременности способность свиноматки вынашивать определенное число плодов приобретает важное значение и размер помета к началу опороса не увеличивается сверх нормы, как в результате пересадки дополнительных эмбрионов, так и в результате суперовуляции.

Кратковременное хранение и культивирование эмбрионов. Между получением эмбрионов у доноров и их пересадкой реципиентам проходит не более часа. Переживаемость эмбрионов на стадии до 7 дней бывает нормальной при временном сохранении их в физиологическом растворе с фосфатным буфером. Но эта среда менее пригодна для хранения бластоцист, взятых на более поздних стадиях.

Для культивирования эмбрионов свиней используют различные простые среды. Развитие 1- и 2-клеточных зародышей в культуральной среде обычно ограничено, а 4-клеточных — несколько лучше.

Испытания видоизмененной бикарбонатной среды Кребса с различными добавками показали, что в среде без лактата и пирувата больше зародышей развивается до стадии бластоцисты, чем в среде с добавлением лактата и пирувата.

Один пируват в среде подавляет развитие, и только при добавлении к раствору сывороточного альбумина 4-клеточные зародыши развиваются до бластоцисты.

Приживляемость эмбрионов, культивированных в течение 24 ч, нормальная, а культивированных в течение 48—72 ч — незначительная. Установлено, что 1- и 2-клеточные эмбрионы развиваются в культуральной среде до стадии 4 клеток, и на этой стадии развитие их прекращается. Оказалось, что на 4-клеточной стадии в зародыше происходит синтез новых протеинов, которые необходимы для дальнейшего нормального его развития. У большинства ранних эмбрионов в культуральной среде синтез новых протеинов не происходит, что и является причиной прекращения дальнейшего их развития.

Такие же проблемы могут возникать при длительном культивировании эмбрионов. Этим и объясняется их плохое выживание после пересадки. Изменение обмена и синтеза протеина на ранних стадиях развития может быть связано также с ранней эмбриональной смертностью.

Приживляемость эмбрионов снижается, если их пересаживают в матку реципиента, опережающую в своем развитии матку донора. Однако маловероятно, что имеется специфический фактор матки свиней, который регулирует раннее эмбриональное развитие, так как эмбрионы свиней выживают и нормально развиваются в яйцевом кресте крольчих.

Криоконсервирование эмбрионов свиней. Эмбрионы свиней трудно поддаются замораживанию и оттаиванию. Основная причина этого — высокая их чувствительность к охлаждению, и немногие эмбрионы выживают при температуре 15 °C.

Показано, что при охлаждении и последующем нагревании происходит потеря внутриклеточных липидов, которые содержатся в эмбрионах свиней в большом количестве. Вероятно, потеря внутриклеточных липидов в эмбриональных мембранах

определяет чувствительность эмбрионов к охлаждению. Поиски методов замораживания эмбрионов свиней, дальней транспортировки, хранения интенсивно продолжаются.

Для разработки метода криоконсервирования эмбрионов свиней испытаны различные варианты скоростей замораживания, среды и криопротекторы, режимы оттаивания.

В первом варианте использовали криопротектор ДМСО, который ступенчато добавляли к замораживаемым эмбрионам на стадии бластоцисты в восемь приемов по 0,25 мл 2 М раствора через каждые 10 мин при температуре 20 °С. Добавление ДМСО при этой температуре к бластоцистам в более быстром интервале, чем 10 мин, вызывало токсический эффект.

Во втором варианте ДМСО добавляли ступенчато за несколько минут, но при этом температуру эквilibрации снижали до 0 °С, а затем на 2 °С ниже точки замерзания среды (—4 °С) вызывали искусственное кристаллообразование путем внесения в среду с эмбрионом кристаллика льда. После этого эмбрионы охлаждали со скоростью 0,22; 0,67; 23; 80 и 690 °С в мин.

В третьем варианте использовали в качестве криопротектора 7,5%-ный ПВП и 0,6 М сахарозу. При этом эмбрионы замораживали со скоростью 0,67; 23; 80 и 690 °С в мин и оттаивали впоследствии от —70 до —10 °С со скоростью 360 °С в мин в водяной бане при температуре 37 °С. Эффективность указанных методов оказалась очень низкой. Более того, морфологически нормальные эмбрионы, пересаженные реципиентам, были неспособны к приживлению в рогах матки, за исключением эмбрионов, замороженных до —15... —20 °С.

Эмбрионы свиньи весьма чувствительны к охлаждению как при медленном, так и при быстром замораживании на стадиях 8—16 бластомеров. Критическая температура, при которой происходят необратимые повреждения клеток, —15 °С. Однако на более поздних стадиях развития (стадия поздней бластоцисты) достаточное число эмбрионов сохраняют свою жизнеспособность после замораживания до —15... —20 °С и быстрого оттаивания и при пересадке индуцируют супоросность.

Эмбрионы свиней на стадии от 4 бластомеров до сформированной бластоцисты разрушаются уже при охлаждении до 0 °С, а при специальной подготовке разрушаются при режимных параметрах охлаждения.

Попытки повысить устойчивость эмбрионов свиньи к охлаждению путем добавления в среду фосфолипидов, а также других добавок не дали положительного эффекта.

Криоконсервирование эмбрионов лошадей. Эмбрионы у лошади извлекают нехирургическим методом на 6-й день после овуляции. Время овуляции контролируют ректальной пальпа-

цией. Эмбрионы замораживают на стадии ранней и поздней бластоцисты.

Использование стандартной технологии замораживания эмбрионов лошадей, принятой для крупного рогатого скота и овец, не дало желательных результатов.

Предложенная новая технология криоконсервирования эмбрионов лошадей заключается в насыщении их криопротектором глицерином в 1,0 М концентрации в ФБС, содержащей 5% фетальной сыворотки телят. Насыщение эмбрионов криопротектором проводят в одну ступень в течение 10 мин. Эмбрионы перед замораживанием помещают в ампулы или пластиковые палочки и медленно охлаждают со скоростью $0,3^{\circ}\text{C}$ в мин до -33 или -38°C , после чего эмбрионы в этих же емкостях переносят в жидкий азот. После быстрого оттаивания криопротектор глицерин удаляют по общепринятой технологии.

Лучшие результаты выживаемости эмбрионов получены при замораживании в палочках и охлаждении до промежуточной температуры -33°C . Пересадка ранних эмбрионов, замороженных по этой схеме, обеспечивала высокий показатель зажеребляемости (62%), а пересадка поздних бластоцист — низкий (10%). Однако криоконсервирование эмбрионов лошадей требует дополнительных исследований и широкой лабораторной и практической проверки.

В проведенных многочисленных экспериментах показано, что, во-первых, в общепатологическом аспекте эмбрионы млекопитающих всех видов и на всех стадиях развития имеют сходство между собой, в то же время отличаются от большинства других клеток и тканей. Во-вторых, развитие методов криоконсервирования эмбрионов выявило существование определенных различий между видами и стадиями развития эмбрионов, а также разную устойчивость их к охлаждению и глубокому замораживанию.

При определении различных факторов, влияющих на жизнеспособность эмбрионов жвачных животных (коровы, овцы, козы) при замораживании до -196°C , выяснено, что эмбрионы овец лучше всего переносят замораживание с криопротектором ДМСО, а эмбрионы коров на стадии морулы и бластоцисты — с ДМСО и раствором глицерина. Для замораживания эмбрионов коз криопротектор глицерин малоприменим. Вероятно, при замораживании эмбрионов овец и коров существует тесная зависимость между скоростью замораживания, оттаивания и выживаемости.

При замораживании эмбрионов коровы с криопротектором ДМСО или глицерином со скоростью $0,13^{\circ}\text{C}$ в мин выживаемость их бывает выше после оттаивания со скоростью $1,2^{\circ}\text{C}$ в мин, чем со скоростью $2,2^{\circ}\text{C}$ в мин. При этом в первом случае жизнеспособность сохраняется у 66% эмбрионов, а во вто-

ром — у 27%. С увеличением скорости охлаждения до 0,15°C в мин эмбрионы лучше переживают при повышении скорости оттаивания (2,2°C в мин). Аналогичная зависимость прослеживается при замораживании и оттаивании эмбрионов овец.

На выживаемость эмбрионов значительное влияние оказывает температура льдообразования. Эмбрионы полностью теряют жизнеспособность, если искусственная кристаллизация проводится при температуре —10°C, так же как и при переохлаждении до этой температуры. Вместе с тем кристаллизация при —2,5; —5,0; —6 и —7°C позволяет сохранять жизнеспособность у 88% замороженно-оттаянных эмбрионов. Следовательно, эмбрионы жвачных способны выдерживать охлаждение, а эмбрионы свиней плохо переносят холодное воздействие и ниже —15°C в большинстве своем теряют жизнеспособность.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ И МЕТОДЫ МИКРОМАНИПУЛЯЦИИ С ЭМБРИОНАМИ ЖИВОТНЫХ

Трансплантация, которая успешно развивается в последнее время, позволяет получать от одной самки в десятки раз больше потомства, чем традиционными методами воспроизводства. Ускорение процессов воспроизводства, особенно у одноплодных животных, в частности у коров, открывает широкие возможности для интенсивной селекции, аналогичной по эффективности селекции быков при искусственном осеменении. Однако в силу рекомбинационной изменчивости трудно получать аналогичных по генотипу животных. Это стало возможным в результате разработки метода клонирования клеток. Одно из направлений этого метода — разделение эмбрионов на отдельные бластомеры и пересадка их реципиентам, что позволяет получать животных с одинаковым генотипом. Одна из попыток разделения эмбрионов на отдельные бластомеры завершилась успешно. Были получены первые пять пар монозиготных двоен у овец (Willadsen, Polge, 1980).

В исследовании и регуляции раннего эмбрионального развития млекопитающих, включая возможность обеспечения развития отдельных бластомеров от 2—4- и 8-клеточных эмбрионов, незаменима микрохирургическая техника. Долгое время радикальная микрохирургия на ранних стадиях дробления зигот большинства млекопитающих, культивированных вне организма, была безуспешной. Например, у мышей развитие не протекало далее стадии поздней морулы в культуральной среде, если удаляли прозрачную оболочку или она оказывалась поврежденной.

Ранние процессы дифференциации в зиготе происходят уже на 1-клеточной стадии. При этом в преформированной плазменной среде возникают так называемые дорсальные и вертикаль-

ные бластомеры, которые функционируют как предшественники клеток внутренней клеточной массы.

В результате новой конструкции зигот из изолированных бластомеров или целых морул изменяется позиция первоначальных клеток. Это ставит под сомнение наличие преформированной плазменной среды, из которой при делении образуются различные детерминированные клетки. Отдельные бластомеры до 8-клеточной стадии участвуют в формировании внутренней клеточной массы, а для трофобластической оболочки решающим является только их расположение.

Все бластомеры, клеточные мембраны которых на стадии морулы находятся у поверхности эмбриона, дифференцируются в трофобластическую оболочку, в то время как бластомеры, окруженные другими клетками, развиваются и превращаются во внутреннюю клеточную массу эмбриона.

Электронно-микроскопическими исследованиями эмбрионов установлено, что поверхностно расположенные бластомеры на 16—32-клеточной стадии связаны плотным (компактным) соединением, а у расположенных внутри имеются просветы в соединениях, которые необходимы для процессов обмена веществ между клетками.

На стадии бластоцисты в трофобластической оболочке преобладают плотные связи, а внутренняя клеточная масса имеет рыхлые соединения. С возникновением бластоцеля (полости) в трофобластической оболочке соединение клеток обеспечивается десмосомами, которые выполняют роль механической связи клеток, поскольку с прогрессирующим расширением бластоцеля контактная поверхность между клетками уменьшается, а гидростатическое давление внутри бластоцисты повышается.

Плотное соединение обуславливает переход зиготы из стадии морулы в бластоцисту. Некомпактированная морула прекращает свое развитие на этой стадии и не образует бластоцисту. Образование и поддержание уплотненных связей обеспечиваются ионами кальция с определенным поверхностным антигеном. Благодаря таким межклеточным соединениям бластомеры «узнают» наружный слой поляризации, из-за чего становится возможным направленный трансцеллюлярный транспорт жидкости с помощью вакуолей для образования бластоцеля. В то же время только в образованной жидкостью бластоцеля среде возможна дифференциация клеток внутренней клеточной массы. Относительная позиция и связанная с этим микроокружающая среда бластомера внутри морулы — решающий фактор для его дальнейшего развития. Дифференциация возможна только благодаря тому, что бластомеры уже на очень ранней стадии находятся в тесной взаимосвязи. Эти межклеточные связи сохраняются до образования рыхлой структуры эмбриона.

С увеличением массы бластомеров их дифференциация связана с метаболической активностью клеток. Первые бластомеры, развившиеся до 8-клеточной стадии, дают значительно больше дочерних клеток для образования внутренней клеточной массы, чем бластомеры, отставшие в развитии.

В образовании жидкости в бластоцеле принимают активное участие прежде всего внутренние и внешние бластомеры, и они ответственны за ее накопление. В бластоцисте процесс накопления жидкости в бластоцеле регулируется только клетками трофобластодермы. Дифференциация внутренней клеточной массы и трофобластодермы экспандированной бластоцисты относительно стабильна. Изолированные участки трофобластодермы формируют пузырьки и могут после пересадки их в матку имитировать беременность. Они, однако, больше не пролиферируют, а образуют лишь гигантские клетки, и частицы трофобластодермы не сливаются. Изолированная внутренняя клеточная масса легко соединяется, но не образует бластоцель и поэтому не может имплантироваться в матку после пересадки.

Если инъецировать изолированную внутреннюю клеточную массу в трофобластодермальном пузырьке, то тогда и конструированная бластоциста может нормально развиваться. Таким образом, клетки трофобластодермы ответственны за имплантацию, а из немногих бластомеров внутренней клеточной массы возникает сам плод.

Для разделения внутренней клеточной массы и трофобластодермы механическими методами используют хорошо экспандированные бластоцисты, иммунологическим методом можно изолировать внутреннюю клеточную массу и у ранних бластоцист. Это говорит о том, что только некоторые бластомеры внутренней клеточной массы ранней бластоцисты могут дифференцироваться от трофобластодермальных клеток.

Переходная стадия, при которой начинается развитие бластоцели, зависит от числа клеточных циклов. Абсолютное число клеток в зиготе не оказывает влияния на временный ход развития эмбриона. Морулы как с малым, так и с увеличенным числом клеток способны переходить в следующую стадию — в бластоцисту. Доказано, что пусковой механизм («внутренние часы») развития ранних эмбриональных клеток находится не в ядре, а определяется градиентом концентрации определенных веществ изнутри наружу. Дифференциация клеток начинается по достижении определенного порога величины градиента в наружном клеточном слое. Как только снижается контакт бластомеров друг с другом менее 20% клеточной мембраны, они начинают дифференцироваться. Окончательную потенцию развития отдельных бластомеров устанавливают с уверенностью по получении живого потомства.

Установлено, что величина дальнейшего развития разделенных эмбрионов после пересадки зависит от числа бластомеров. Хорошо приживляются и развиваются эмбрионы мышей при наличии в половинке 2 бластомеров, и эти показатели резко снижаются, если 4-клеточный зародыш делят на 4 части. У овец и коров суягность и стельность наступают при наличии в половинке зародыша не менее 4 бластомеров.

Изолированные эмбриональные клетки из эмбриона на стадии бластоцисты имеют неограниченную способность к развитию. Низкая выживаемость отдельных бластомеров (4 зиготы) на 8-клеточной стадии объясняется недостаточным числом клеток во внутренней клеточной массе после их деления на 4 части. Это свидетельствует также о том, что определенная минимальная клеточная масса необходима для эмбрионального сигнала материнскому организму после пересадки. В опытах по пересадке овцам 2 четвертинок получен такой же процент суягности, как и при пересадке целых эмбрионов.

Для манипуляций на эмбрионах млекопитающих наиболее пригодны лабораторные мыши.

Все процессы дифференциации в зиготах перед имплантацией и способность к развитию отдельных или определенных групп бластомеров предварительно были исследованы на зиготах лабораторных животных и затем перенесены на зиготы сельскохозяйственных животных.

Различия в предимплантационном развитии зигот разных видов животных не принципиальны, и они объясняются неодинаковой длительностью развития отдельных фаз или принадлежащим к определенной стадии развития абсолютным числом клеток. В табл. 18 приведены данные о временном ходе предимплантационного развития у разных видов животных.

Зиготы отдельных видов животных различаются размером (диаметр) и химической и механической устойчивостью зоны пеллюцида. У крупного рогатого скота и овец устойчивость отдельных бластомеров к механической нагрузке выше и связь внутри морулы крепче, чем у мышей, кроликов и свиней. Механизмы имплантации эмбрионов, формы плаценты, число вынашиваемых плодов у разных видов животных различны.

Низкий процент имплантации после пересадки разделенных мышинных и кроличьих зигот (12,3—31,8%), по всей вероятности, связан с тем, что у этих видов животных имплантация начинается очень рано (4—6-й день) и этого времени не хватает, чтобы эмбрион смог наверстать дефицит своего развития после деления. У эмбрионов овец и крупного рогатого скота такого времени вполне достаточно (18—21 день) и приживляемость разделенных эмбрионов после пересадки достигает 74%.

18. Предимплантационная характеристика развития зародышей разных видов животных (по С. Т. Ford, 1986)

Показатель	Вид животного				
	мышь	кролик	овца	крупный рогатый скот	свинья
Диаметр зиготы, мкм	80—100	130—140	130—150	150—170	130—150
Число клеток через 72 ч после овуляции и оплодотворения	8	16—32	16	8	4
Время перемещения в матку, дней	3	3—4	2—4	3—4	2—3
Начало компактирования:					
день	2—3	4	4	7	4—5
число клеток	16	64	64	32	32
Образование бластоцеля:					
день	3—4	5	5	8	5—6
число клеток	32	128	128	64	64
День имплантации	4—5	6	18—20	18—21	11

Спонтанное возникновение монозиготных близнецов. Механизм спонтанного возникновения однойяцевых близнецов мало изучен. Предполагают, что образование близнецов происходит во время первых делений зародыша. Плацентарная связь у таких близнецов такая же, как и у дизиготных. Они имплантируются и развиваются отдельно. Образование близнецов может быть благодаря удвоению внутренней клеточной массы на стадии бластоцисты с образованием 2 эмбриональных узлов. У каждого близнеца при этом образуется свой собственный амнион как производное внутренней клеточной массы. Но оба они окружены общим хорионом, происходящим от трофобластической оболочки. Возникновение близнецов может быть на стадии гаструляции в результате деления нервной трубки. Оба плода также развиваются в своих амнионах при общем хорионе.

Возникновение двух бластоцист в одной зоне пеллюцида — следствие асинхронного развития второго бластомера. Это нашло подтверждение в опытах J. Batler (1985) по получению химер. Так, из гигантской бластоцисты, которая состояла из 4 различных овечьих зигот, развились 2 идентичных ягненка. Поскольку бластоциста ко времени пересадки имела единую внутреннюю клеточную массу, то образование близнецов могло быть в более позднее время.

Искусственное получение идентичных близнецов. Первые работы по получению близнецов были выполнены на зиготах 2-клеточной стадии кроликов и крыс. При этом было показано, что изолированные бластомеры также проходят нормальное предимплантационное развитие.

В предварительных экспериментах установлено, что ранние эмбрионы овец, помещенные в агар и пересаженные в кроличьи яйцеводы, продолжали развитие нормальным темпом даже в том случае, если прозрачная оболочка была сильно разрушена (Willadsen, 1979).

Двухклеточные эмбрионы получали от суперовулировавших доноров овец на второй день эструса. Эмбрионы хранили, с ними микроманипулировали и переносили в фосфатный буфер (ФБС).

С монозиготными парами бластомеров в агаре производили следующие манипуляции: двухклеточные яйца засасывали в капилляр пипетки и разрезали прозрачную оболочку между бластомерами на $3/4$ его поверхности тонкой стеклянной иглой. Бластомеры отсасывали из прозрачной оболочки с помощью пастеровской пипетки. Просвет пипетки настолько мал, что прозрачная оболочка при прохождении через нее бластомеров задерживается. Бластомеры разделяли осторожным отсасыванием с помощью пастеровской пипетки с тонким концом так, чтобы проходил только один бластомер. При этом его слегка сжимали. Единичные бластомеры отсасывали и инъецировали капиллярной пипеткой в освобожденную оболочку. Заранее готовили 1,2%-ный раствор агара (Дифко) в 0,9%-ном растворе NaCl на дистилляте. Пока раствор охлаждался, бластомеры переносили из ФБС в овечью сыворотку. Затем часть остывшего (до 36°C) агара помещали в чашку Петри и сразу туда же переносили одиночные бластомеры тонкой пастеровской пипеткой, несколькими секундами позже убирали лишний агар. Бластомеры в пипетке с агаром держали 30 с и затем выпускали в цилиндр с ФБС. Цилиндр сегментировали таким образом, чтобы бластомеры находились в сегментах размером $0,1 \times 0,5$ —1 мм. Этот цилиндр помещали в цилиндр большего размера ($0,7 \times 2,0$ —2,5 мм). Все процедуры производили на микроманипуляторе и устройстве для инъекций и отсоса.

Один из четырех агаровых цилиндров, каждый из которых содержал пару монозиготных бластомеров, переносили в яйцевод овцы в первый или второй день эстрального цикла. Для облегчения их обратного получения на яйцеводы овец накладывали лигатуру в месте маточно-трубного соединения. Через 3,5—4,5 дня яйца вымывали из яйцеводов и оценивали. Эмбрионы, достигшие стадии поздней морулы — ранней бластоцисты, считали нормально развившимися. Дегенерированные эмбрионы или эмбрионы, задержавшиеся в развитии, в дальнейшей работе не использовали.

Предложенная методика оказалась очень сложной и дорогостоящей, и она может быть использована только в научных экспериментах. Но она послужила основой для разработки более простой и менее сложной методики деления эмбрио-

нов животных, которая требует меньше затрат рабочего времени и является более эффективной. Для микрохирургии используют в основном ранние бластоцисты 7-суточного возраста. Можно использовать и поздние морулы.

Эмбрионы получают от коров с суперовуляцией на 7-й день от начала охоты и искусственного осеменения. После обнаружения эмбрионов и их отбора по качеству эмбрионы несколько раз (4—5) промывают в чистой среде ФБС+1% фетальной сыворотки теленка. В этой же среде осуществляют все последующие манипуляции с эмбрионами. Только эмбрионы отличного качества с полным соответствием стадии развития с их возрастом используют для деления.

Для этой цели применяют двусторонний микроманипулятор с двойными гнездами для инструментов и микроскопом типа Диаверт Лейтц. Рабочие микроинструменты изготавливают из силиконизированного стекла с помощью микрокузницы. Манипуляции с эмбрионами осуществляют в чашке Петри, в которую предварительно наливают около 10 мл упомянутого раствора. В число микроинструментов входят: пипетка-держатель, микроскальпель для вскрытия зоны пеллюцида и деления эмбриона, стеклянный шприц и стеклянный крючок для расширения зоны пеллюцида и пересадки половинок эмбрионов.

После фиксации эмбриона пипеткой-держателем при низком давлении зону пеллюцида в вертикальной плоскости прокалывают иглой и с помощью прижатия к верхней части пипетки-держателя зародыша попадают в сектор приоткрытия на 110—140°. Впоследствии эмбрион помещают в чашку Петри так, чтобы просвет в зоне пеллюцида проходил в экваториальной плоскости и его можно было контролировать иглой. В образовавшуюся полость вводят раствор и с помощью инъекционной пипетки, вводимой в зону пеллюцида, вымывают из нее эмбрионы.

Эмбрион, лишенный оболочки и находящийся на дне чашки Петри, разделяют путем опускания стеклянной иглы в медиальную его плоскость. Плотное соединение зародышевых клеток между собой вызывает необходимость в большинстве случаев притирать иглу ко дну чашки Петри и иногда повторять расчленение в той же плоскости. После полного деления одну половину сразу же возвращают в собственную зону пеллюцида с помощью инъекционной пипетки. Для этого с помощью двух пипеток расширяют просвет зоны пеллюцида. Оставшуюся половину клеток также помещают в предварительно освобожденную зону пеллюцида от неоплодотворенной яйцеклетки или дегенерированного эмбриона.

Обе половины, заключенные в зоны, в течение 2 ч выдерживают в культуральной среде при комнатной температуре. За

это время наблюдаются, как правило, компактирование и округление оболочки у разделенных половин эмбрионов. После этого половинки эмбрионов пересаживают неоплодотворенным реципиентам. При этом способе деления после нехирургической пересадки стельность достигает 70%, отелы двойнями — 68% (Willadsen и др., 1981).

Важнейшая составная часть микроманипуляции по приведенному способу — щадящие условия прокалывания и расширения зоны пеллюцида, а также ее способность восстанавливать первоначальную форму в период 2-часового культивирования половин эмбрионов, что благоприятно сказывается на внутриматочном их развитии. Трансплантация половин и целых бластоцист без зоны пеллюцида, как показывает практический опыт, не обеспечивает их приживляемости.

По второму способу эмбрионы делят на части без предварительного удаления их из собственной зоны. После фиксации эмбриона микроскальпелем вскрывают зону пеллюцида и с помощью стеклянной пипетки и крючка раздвигают ее просвет, а затем микроскальпелем осуществляют деление. Одну половину эмбриона оставляют в собственной зоне, другую переносят в приготовленную пустую зону пеллюцида. Для осуществления микроманипуляции по этому способу, кроме микроманипулятора, надо иметь микропипетку для удержания эмбрионов при отрицательном давлении в течение операции, два микроинструмента с острыми концами для прокалывания зоны пеллюцида в экваториальном положении и два микроинструмента, один из которых с закругленным концом для деления эмбриона на две половины, два других инструмента необходимы для извлечения и обратной пересадки эмбриона в зону пеллюцида. Одним инструментом прокалывают зону пеллюцида, затем двумя микропинцетами (один из них наподобие крючка, другой — прямая микропипетка) расширяют зону. Половину эмбриона удаляют введением среды в полость зоны пеллюцида, а возвращают половину эмбриона путем легкого всасывания.

При разделении эмбрионов следует как можно меньше повреждать бластомеры (не более 10%) и получать примерно одинаковые по величине половины. Разделение эмбрионов и размещение половин в зоне длится 10—15 мин. После деления качественно хороших эмбрионов происходит процесс «реорганизации» первоначальной формы. Половинки округляются на поверхности среза за относительно короткое время так, что очень напоминают позднюю морулу, но только с меньшим диаметром.

Разделенные эмбрионы можно культивировать в среде ФБС+20% фетальной сыворотки телят. При этом они развиваются далее до бластоцисты и покидают зону пеллюцида. Пересадка эмбрионов, хорошо развивающихся в культуральной

среде (24 ч), ведет к получению таких же результатов, как и немедленная пересадка после разделения эмбрионов.

Сначала пересаживают лучшие половины эмбрионов в рог матки с желтым телом в яичнике и сразу же пересаживают другие половины в противоположный рог матки.

Во время пересадки в противоположный рог матки приживляемость этого эмбриона будет зависеть от приживляемости эмбриона в первом роге. Одновременно путем пересадки двух половин одному реципиенту становится позитивным влияние реципиента на развитие двух эмбрионов при одинаковых условиях.

Трансплантация эмбрионов развивается очень быстрыми темпами, и два звена общей технологии представляют научный и практический интерес. Это криоконсервирование эмбрионов и микроманипуляции на них. Особое значение имеет комбинация этих двух процессов на замороженно-оттаянных эмбрионах. Первая пара таких близнецов была получена в Канаде в 1984 г.

Сохранение половинок и четвертинок методом глубокого замораживания в течение длительного периода может быть дополнительным резервом в повышении эффективности эмбриопересадок. Для производства половинок и четвертинок используют 5—6-дневные эмбрионы (ранние морулы). После разделения их можно помещать в пробирки с 1,2%-ным агаром (размер пробирок — 0,7 и 2,5 мм) и пересаживать в перевязанные яйцеводы овцы, находящейся в стадии эструса. Через сутки извлекают разделенные половинки и четвертинки от 6-дневных морул и через двое суток — от 5-дневных морул. Эмбрионы оценивают морфологически и только развившиеся до стадии ранней бластоцисты или до полнокомпактной морулы замораживают. Процесс микроманипуляции, методика помещения разделенных эмбрионов в агар и их культивирование в яйцеводах овцы описаны выше.

Помещенные в агар эмбрионы замораживают в среде ФБС, содержащей 20% фетальной сыворотки телят и 10% раствора глицерина. Насыщение эмбрионов глицерином проводят трехступенчато при комнатной температуре (3,3; 6,6 и 10%) с выдержкой в каждом растворе по 10 мин. Эмбрионы в агаре после проводки переносят в пробирки размером 5×50 мм с содержанием замораживающей среды 0,3 мл и охлаждают со скоростью 1°C в мин до —4...—5°C, вызывают искусственную кристаллизацию и после этого охлаждают со скоростью 0,3°C в мин до —35°C и затем переносят в жидкий азот. Оттаивают быстро в водяной бане при температуре 37°C. Оттаянные эмбрионы помещают в среду с 10%-ным раствором глицерина. Удаляют криопротектор в 4 этапа (10, 7,5; 5 и 2,5%) по 10 мин в каждом растворе. После удаления криопротектора жизнеспособ-

19. Выживаемость половинок и четвертинок эмбрионов после замораживания и оттаивания (по Lehn — Jensen и Willadsen, 1983)

Показатели	Разделенные эмбрионы	
	половинки	четвертинки
Заморожено эмбрионов	37	28
Оттаяно эмбрионов	36	26
Нормальных эмбрионов	26—70,0	4—15,4
Пересажено эмбрионов	18	4
Стельных реципиентов	11—61,2	—
в том числе двойневых отелов	8—44,4	—

способность эмбрионов определяют по морфологическим признакам. Результаты первых экспериментов по замораживанию и оттаиванию разделенных эмбрионов приведены в табл. 19.

Из табл. 19 видно, что низкотемпературное замораживание морул, разделенных на 4 части, пока невозможно. Методика, использованная в данном эксперименте, была более сложной, но более эффективной по сравнению с другими более простыми методами.

Метод разделения эмбрионов без микроманипулятора. Используют две микроманипуляторные системы из стеклянных приспособлений для микроскопических исследований. Первый метод состоит из аппарата для изготовления микроскопических срезов, который используют для удаления блестящей оболочки. Кроме того, необходимы тонкая стеклянная игла для разрезания эмбрионов, освобожденных от блестящей оболочки, и стереомикроскоп, через который при 75-кратном увеличении контролируют весь процесс работы. Эмбрион помещают в чашку Петри с 10 мл среды ФБС+20% фетальной сыворотки теленка. Тонкой стеклянной пипеткой, соединенной посредством поливиниловой трубки со шприцем (на 1 мл), фиксируют эмбрион и удаляют механическим путем блестящую оболочку. Ее можно удалить погружением эмбриона в 2,5%-ный раствор проназы в среде ФБС на 5—10 мин. После удаления зоны пеллюцида все остальные операции аналогичны ранее описанным.

Для деления эмбрионов по второму методу необходимо иметь одно высококачественное стекло для микрохирургических исследований размером 50×75 мм, стандартное лезвие, два 5-дюймовых гемостата и инвертированный микроскоп. Микроскопическое предметное стекло должно быть слегка шероховатым для исключения скольжения эмбриона при его рассечении. Шероховатость на рабочей поверхности стекла наносят алмазными частицами размером 3 мкм или легкой стальной проволокой.

На поверхность предметного стекла наносят каплю (около 0,1 мл) среды ФБС+10% сыворотки теленка. Эмбрион разме-

щают в центре капли. За всеми процессами наблюдают под микроскопом при 100-кратном увеличении. Осторожно опускают вертикально четвертую часть лезвия, закрепленного парой гемостатов, и вручную рассекают эмбрион. Краем предметного стекла пользуются как опорой для удержания гемостата вручную. Даже при небольшом навыке оба метода позволяют эффективно рассекать эмбрионы крупного рогатого скота и овец.

Второй способ более эффективен и обеспечивает 95% успешных рассечений. Освобожденные от блестящей зоны эмбрионы можно разделить на две половины менее чем за минуту. Кроме того, преимущество второго способа состоит в том, что его легче применять в условиях производства. Нельзя недооценивать использование 2,5%-ного раствора фермента проназы для удаления зоны пеллюцида и возможность применения этих упрощенных методов разделения эмбрионов на более поздних стадиях развития без дорогостоящих микроманипуляторов.

Микроманипуляции с эмбрионами свиней. Эмбрионы от свиней-доноров получают на 6-й день после естественного покрытия по общепринятой методике. В качестве среды для вымывания применяют ФБС+20% фетальной сыворотки теленка +100 ед. пенициллина +100 мк стрептомицина +0,25 мкг амфотерицина В на 1 мл среды.

При микроманипуляции с эмбрионами используют среду ФБС+10% фетальной сыворотки теленка. Для разделения применяют микроманипулятор. Каждый эмбрион, помещенный в среду, фиксируют к наружной стенке пипетки для всасывания и затем тонкой стеклянной иглой рассекают надвое внутриклеточную массу и около 40% зоны пеллюцида. Оставшийся слой трофобласта эмбриона затем подобным же образом рассекают надвое в пределах зоны пеллюцида. Половину каждого разделенного в собственной зоне пеллюцида и оставшуюся половину без зоны пеллюцида хирургическим методом пересаживают в рог матки свинки-реципиента с синхронным эстральным циклом с возрастом эмбриона и эстральным циклом свинки-донора. Половинки эмбрионов размещают в роге матки на 5 см проксимально к соединению матки с яйцеводом. При пересадке 16 половинок от 8 эмбрионов родилось 4 поросенка (3 свинки и 1 хрячок).

Полученные первые результаты дают основание считать, что упрощенный метод разделения эмбрионов свиней на более поздней стадии развития может обеспечить получение жизнеспособных половинок эмбрионов для пересадки реципиентам.

Получение химер методом микрохирургии. Химерных животных получают пока в экспериментальных целях. Техника получения химер во многом противоположна разделению эмбрионов на половинки. Зоны пеллюцида снимают с двух

(иногда больше) предимплантационных эмбрионов, которые затем агрегируют в одной зоне.

После соединения химерные эмбрионы пересаживают. Приживляемость химер после нехирургической пересадки очень высокая, на что, вероятно, влияет число клеток в одном эмбрионе. Их в 4 раза больше, чем в половинах эмбрионов.

Другой способ создания химер заключается в разделении эмбрионов и агрегации двух разных половин в одной зоне. Так называемые инъекционные химеры можно создать путем инъекции некоторых бластомеров одного эмбриона во внутриклеточную массу другого эмбриона. Относительные вклады эмбрионов в сформировавшийся организм могут оказаться неравными. Имеются сообщения об успешном создании химер овец, коз и крупного рогатого скота, а также химер овец и коз путем агрегации половин или четвертей эмбрионов этих видов животных.

Химеры овец получают инъекцией эмбриобласта, выделенного методом микрохирургии, в полость бластоцеля эмбриона-реципиента разных пород. Оболочку донорских бластоцист удаляют 0,5%-ным раствором фермента проназы с аккуратным пипетированием. Бластоцисты затем культивируют при температуре 37°C в кроличьей сыворотке с содержанием 5% диоксида углерода (CO_2) в течение часа. Антисыворотку получают после 3 еженедельных внутривенных инъекций клеток селезенки овцы (4×10^8 клеток). Для приготовления антисыворотки кровь получают при пункции сердца через 10 дней после последней инъекции. Эмбрионы затем 3-кратно отмывают и помещают в сыворотку морской свинки в разведении 1:4 на 1 ч.

Лизированные клетки трофобласта аккуратно удаляют отсасыванием пипеткой. Изолированный эмбриобласт забирают в микропипетку с внешним диаметром около 50 мкм, прикрепленную к микроманипулятору. Эмбрион-реципиент удерживают за полярный трофобласт, накрывающий эмбриобласт, пипеткой с внешним диаметром около 125 мкм. Затем донорский эмбриобласт вводят, прокалывая зону пеллюцида и трофоэктодерму, в бластоцель бластоцисты-реципиента. Инъекционную пипетку располагают рядом с эмбриобластом реципиента и инъецируют донорский эмбриобласт.

Бластоцисты культивируют 12 ч, а затем ведут микроскопическое наблюдение на предмет включения инъецированных клеток. При этом методе 85% донорских клеток включается в структуру эмбриобласта бластоцисты-реципиента. У остальных 15% эмбрионов наблюдается отторжение донорского эмбриобласта. Только эмбрионы с нормальным включением пересаженного эмбриобласта пересаживают овцам-реципиентам. При этом получают 83% приживляемости агрегированных эмбрионов. Степень химеризма составляет 40%.

Для получения химер крупного рогатого скота применяют более простой метод микрохирургии, аналогичный получению монозиготных близнецов. Используют эмбрионы на стадии развития поздней морулы и ранней бластоцисты в возрасте 5—6,5 дня. После разделения две различные половинки эмбрионов агрегируют в одну зону пеллюцида или 4 полуэмбриона, полученные от животных разных пород. Химеры от коров можно получать при агрегировании 5—6,5-дневных эмбрионов и немедленной пересадке их после манипулирования.

При получении химер объединяют две или четыре половинки эмбрионов разных пород в одной зоне. Через 1—3 ч после микроманипулирования эмбрионы трансплантируют нехирургическим методом телкам с синхронизированным эстральным циклом с возрастом эмбрионов. Максимальные потери при делении эмбрионов не превышают 5%. Продолжительность деления зародыша составляет в среднем около 10 мин.

В нашей стране первые эксперименты по получению двухпородных химер были проведены в 1984 г. Разделили 8 эмбрионов крупного рогатого скота (4 черно-пестрой и 4 айрширской пород), которые после микроманипуляций по объединению половинок зародышей были пересажены 8 телкам-реципиентам черно-пестрой породы. Стельность была зарегистрирована у 5 животных (62,5%). Получено 6 телят (5 телочек и 1 бычок). От телки-реципиента № 2653 получена двойня (две телочки). По окраске кожного покрова четкий химеризм отмечен у двух телят (на красном фоне окраски кожного покрова разбросаны черные пятна). Один теленок имел черно-пеструю окраску, три — красно-пеструю.

В связи с пространственным делением селекционных стад доноров и реципиентов транспортировка эмбрионов или половинок является необходимым звеном в общей технологии трансплантации эмбрионов. Установлено, что транспортировка разделенных эмбрионов снижает на 10—15% результаты пересадки. Стельность от пересадки половинок эмбрионов разным реципиентам выше, чем при пересадке двух половинок в разные рога матки одному реципиенту. Это необходимо учитывать в практической программе эмбриопересадок для повышения числа телят от разделенных эмбрионов. Вместе с тем в практической работе необходимо получать однайцевых близнецов, предпочтительно от пересадки двух половинок в оба рога матки одному реципиенту.

Получение однайцевых близнецов открывает большие возможности при изучении материнского и маточного влияния на потомство. Поэтому современная микрохирургия на эмбрионах крупного рогатого скота приобретает при всех трудностях все большее значение в повышении эффективности пересадок. Затраты на микрохирургию меньше, чем при получении допол-

нительных эмбрионов посредством гормонального вызывания суперовуляции. Это может значительно снизить расходы на эмбриопересадки.

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОЛА ЭМБРИОНОВ

Определение пола эмбриона открывает возможность регулировать пол потомства крупного рогатого скота при использовании метода трансплантации.

Трансплантация двух однополых эмбрионов позволяет избежать бесплодия (фримартинизма) телок, рождающихся в разнополых двойнях.

Применение метода криоконсервирования эмбрионов делает реальным создание банка эмбрионов с заранее определенным полом от животных с выдающимся генотипом.

Цитогенетический метод определения пола эмбрионов крупного рогатого скота состоит из пяти основных операций: 1) микробиопсии трофобласта; 2) кратковременного культивирования клеток трофобласта; 3) приготовления препаратов хромосом; 4) микроскопирования препаратов и 5) кратковременного сохранения эмбриона после микробиопсии.

Микробиопсия трофобласта. Микробиопсия клеток трофобласта может быть эффективно выполнена на 9—15-дневных эмбрионах. Форма 9-дневных эмбрионов крупного рогатого скота круглая или овальная, 14—15-дневных — палочковидная.

Микробиопсию клеток трофобласта эмбрионов небольшого размера выполняют на микроманипуляторе. Для этого эмбрион сначала фиксируют при помощи двух микропипеток-присосок, а затем микроскальпелем отсекают участок трофобласта, контролируя эту микрооперацию под микроскопом. Микробиопсию крупных эмбрионов при соответствующем навыке можно сделать офтальмологическими ножницами под бинокулярной лупой.

Для успешного цитогенетического анализа отторгнутый микробиопсией участок трофобласта должен содержать до 500 клеток.

Операция микробиопсии одного эмбриона занимает 3 мин. В это время эмбрион находится на предметном стекле в лунке, заполненной сбалансированным солевым раствором Дюльбекко комнатной температуры.

Необходимо соблюдать асептические условия — простерилизовать ультрафиолетом микроинструменты и посуду.

Культивирование клеток трофобласта. Задача данного этапа обработки — накопление митотически делящихся клеток трофобласта. Используется питательная среда 199. Для нормализации среды (особенно длительного срока хранения) в нее необходимо добавить α -глутамин (0,1 мл 1%-ного раство-

ра на 10 мл) и 20% сыворотки крови эмбриона крупного рогатого скота. рН среды должен составлять 7,2—7,3.

Для остановки деления клеток на стадии метафазы в среду вносят 0,001 мг/мл колхицина.

Питательную смесь в количестве 1 мл заливают в 2-миллилитровую ампулу, куда пастеровской пипеткой переносят полученный микробиопсией участок трофобласта, и пропускают через объем жидкости газ, содержащий 5% CO_2 . Ампулу запаивают и помещают на 24 ч в термостат при температуре 37°C.

Приготовление препаратов хромосом. По окончании культивирования участок трофобласта извлекают пастеровской пипеткой из ампулы и переносят в лунку предметного стекла, заполненную 1%-ным раствором лимоннокислого натрия. Гипотоническую обработку клеток ведут в течение 20 мин при температуре 37°C.

Затем клетки трофобласта 1 мин обрабатывают 60%-ной уксусной кислотой и на предметном стекле в течение 5 мин фиксируют в 4 каплях смеси метилового спирта с ледяной уксусной кислотой (3:1). Уксусная кислота и фиксатор должны иметь температуру 4°C. Последние две операции выполняют под микроскопом.

Полученные препараты хромосом клеток трофобласта эмбрионов в течение 5 мин окрашивают 2%-ным раствором краски Гимзы (см. схему).

Микроскопия препаратов хромосом. Нормальный кариотип крупного рогатого скота состоит из 60 хромосом, среди которых 58 акроцентрического типа аутосом и две — субметацентрического типа половые хромосомы: большая — X и маленькая — Y. Набор половых хромосом коровы — XX, быка — XY (рис. 43).

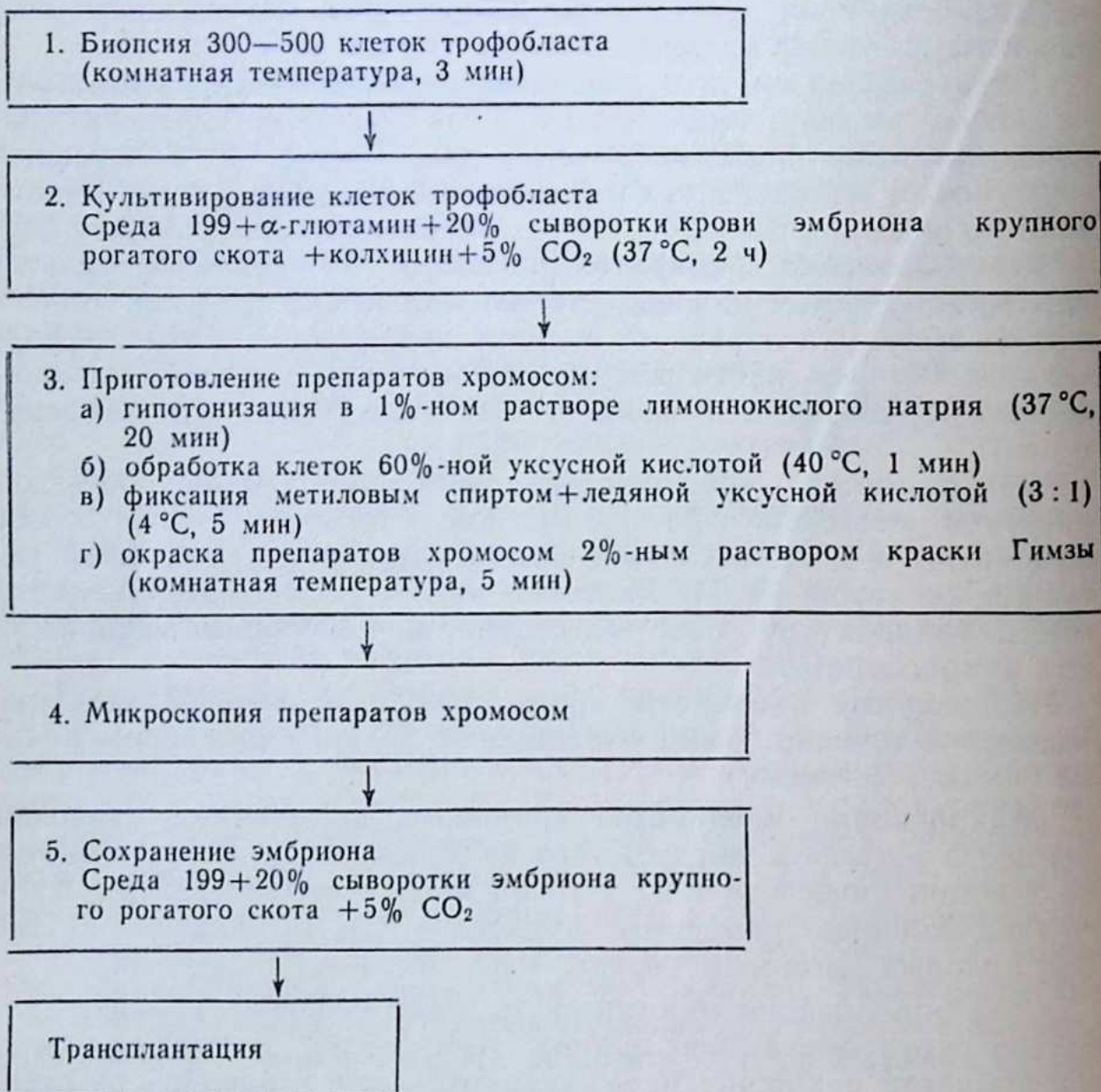
Для определения генетического пола эмбриона крупного рогатого скота достаточен анализ нескольких метафаз клеток трофобласта с хорошо идентифицируемыми половыми хромосомами (рис. 44), на что требуется около 5 мин.

Общее время, затраченное на цитогенетическое определение пола эмбриона крупного рогатого скота, — 3 ч.

Цитогенетическое исследование клеток трофобласта предимплантационных эмбрионов позволяет, помимо определения их пола, выбраковывать эмбрионы с различными структурными аномалиями (абберациями) хромосом.

В препаратах хромосом клеток трофобласта встречаются полиплоиды, в основном тетраплоиды, количество которых в отдельных случаях может составлять до 50% всех делящихся клеток. Физиологическая полиплоидизация клеток трофобласта не является противопоказанием для проведения трансплантации эмбрионов, так как клетки эмбриобласта в большинстве случаев имеют стабильный диплоидный набор хромосом.

**Принципиальная схема цитогенетического определения пола
эмбриона крупного рогатого скота**



Кратковременное сохранение эмбрионов. Эмбрион после операции микробиопсии переносят в ампулу емкостью 2 мл в среду 199 с 20% сыворотки эмбриона крупного рогатого скота, газифицируют 5% CO₂. Ампулу с эмбрионом запаивают и помещают в термостат при температуре 37 °C до момента трансплантации.

**ОСНОВНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ, МАТЕРИАЛЫ И РЕАКТИВЫ, НЕОБХОДИМЫЕ
ДЛЯ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОЛА ЭМБРИОНОВ КРУПНОГО
РОГАТОГО СКОТА**

Оборудование и инструменты. Бокс для стерильной работы, автоклав или стерилизующий шкаф, дистиллятор, стерилизатор для инструментов, термостат или водяная баня с авторегулятором температуры (37,5 °), бы-

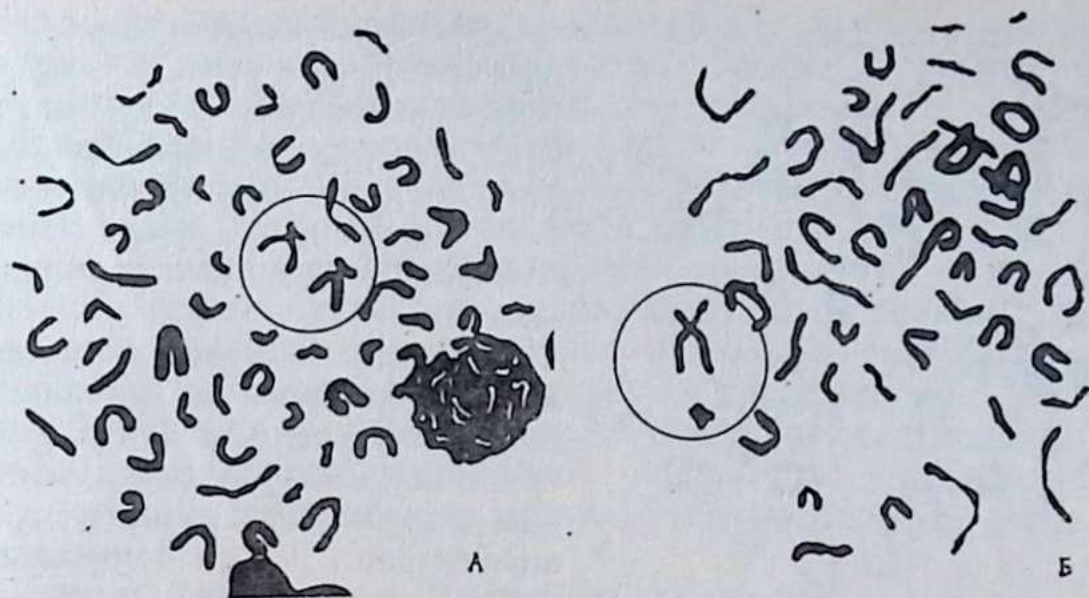


Рис. 43. Метафазные хромосомные соматические клетки крупного рогатого скота:

А — хромосомы коровы; Б — хромосомы быка. Половые хромосомы в кружках

товой холодильник, лабораторная центрифуга (до 1000 об/мин), баллон с газовой смесью, содержащий 5% CO_2 , бинокулярная лупа, световой микроскоп типа МБИ, микроманипулятор, микроскальпель, офтальмологические ножницы, шприцы на 1—2 мл, предметные стекла с лунками, предметные и покровные стекла, цилиндры мерные на 10—15 мл, пипетки пастеровские и мерные на 1—5 мл, спиртовая горелка, стеклянные ампулы на 2 мл, фильтровальная бумага, марля и вата.

Реактивы. Солевой раствор Дюльбекко, среда 199, сыворотка крови эмбрионов крупного рогатого скота, α -глутамин, колхицин или колцемид, лимоннокислый натрий, этиловый спирт, метиловый спирт, ледяная уксусная кислота, краситель Гимзы, буферный раствор 2SSC, иммерсионное масло.

Работы по извлечению клеток растущего эмбриона крупного рогатого скота 12—15-дневного возраста начались более 15 лет назад. Эти работы были связаны также с исследованием половых хромосом с помощью цитогенетических методов.

Позднее удалось извлечь и выявить половую хромосому из 6—7-дневных эмбрионов крупного рогатого скота с помощью микроманипулятора без повреждения эмбриона. При этом следует иметь в виду, что исследование хромосом удастся лишь в том случае, если клетки находятся в стадии деления (митоз).

У ранних эмбриональных клеток уровень деления очень низок, да и техника по их извлечению пока оставляет желать лучшего. В результате только в исключительных случаях положительные результаты могут превысить 50%. Даже при использовании половины эмбриона не удастся с достаточной достоверностью определить хромосому. Кроме того, при большом количестве эмбрионов определение пола занимает много времени. Поэтому этот метод при имеющемся уровне знаний мало применяется в практике трансплантации эмбрионов.

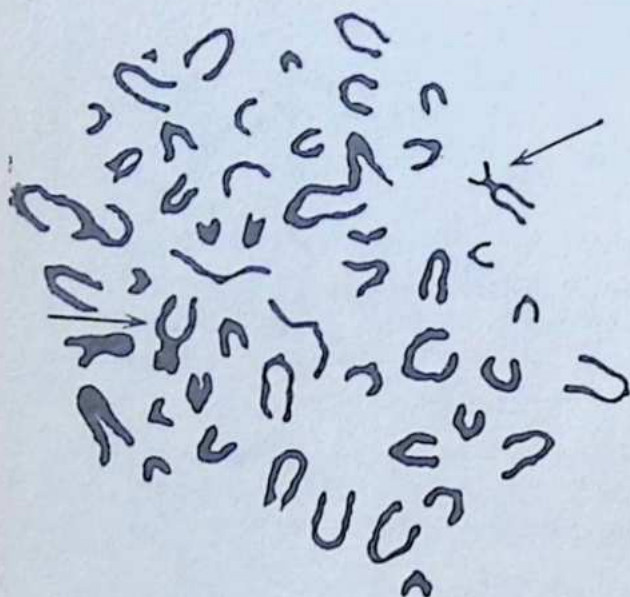


Рис. 44. Метафаза клетки трофобласта 14-дневного эмбриона коровы. X-хромосомы указаны стрелками

Считается доказанным, что антиген П-У — продукт мужской хромосомы, и он оказывает влияние на дифференциацию пола и представляет собой составную часть всех мужских детерминированных клеток.

В начале 80-х годов появились сообщения о возможности получения специфических (моноклональных) антител, которые можно использовать для определения пола эмбрионов мышей и крупного рогатого скота.

Реакцию антитела и антигена определяют с помощью флуоресцирующего второго ан-

титела. Под флуоресцентным микроскопом у мужских детерминированных эмбрионов можно различить светло-зеленые участки, а у женских детерминированных эмбрионов возникает слабое диффузное свечение или же их клетки остаются темными. Вероятно, не следует опасаться повреждения эмбрионов в результате добавления антител и светящегося красителя. Окончательного вывода об эффективности метода еще не сделано. Возникают трудности с приобретением моноклональных антител, направленных против антигена П-У.

В связи с этим необходимы дальнейшие исследования на моноклональных антителах с целью получения их в неограниченном количестве для проведения работ по определению пола эмбрионов при их трансплантации.

ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ ЭМБРИОНОВ И ИХ ПОЛОВИН

Приживляемость пересаженных эмбрионов крупного рогатого скота и овец зависит от их качества, определяемого по морфологическим показателям на стадии бластоцисты, метода пересадки, кормления и содержания реципиентов.

Неприживание эмбрионов дает основание предполагать, что они могут погибать в условиях матки.

При хирургической пересадке число перегулявших телок с удлиненным эстральным циклом составляет 14%. После нехирургической пересадки 28% реципиентов проявляют охоту между 25-м и 60-м днями. О гибели эмбрионов в матке имеется много сообщений. Так, 28% эмбрионов погибает в матке после пересадки между 35-м и 60-м днями, 25% — между 45-м и 90-м днями, 29% — между 21-м и 60-м днями (G. Neuman, 1985).

Пока нет прямого метода определения жизнеспособности эмбрионов в матке в первые три недели после пересадки. Поэтому приведенные данные весьма относительны и не отражают полностью истинную долю гибели эмбрионов. Выживание эмбрионов определяют на более поздних стадиях развития, когда амниотический пузырек может быть прощупан ректально, или при помощи ультразвуковой эхографии реципиента.

Более раннюю стельность устанавливают косвенными методами, основанными на определении активности желтого тела в яичнике реципиента по концентрации прогестерона в плазме крови. Сравнивая результаты определения концентрации прогестерона и результаты ректального выявления стельности до 3 мес, можно установить размеры потерь эмбрионов после их пересадки.

Принято считать, что стельность после пересадки нормально развивается, если содержание прогестерона в плазме крови реципиента находится на уровне более 1 нг/мл в период между 19-м и 24-м днями и если у реципиента отсутствуют признаки охоты. Для подтверждения стельности через 3 мес проводят ректальное исследование.

Эмбриональную смертность рассчитывают по следующей формуле:

$$\text{ЭС} = \frac{\text{НСТ} - \text{Ст}}{\text{НСТ}},$$

где ЭС — эмбриональная смертность; НСТ — начальная стельность, определенная по прогестерону; Ст — стельность на 80-й день, установленная ректальной пальпацией.

При пересадке 8-дневных бластоцист через 2 ч после извлечения эмбриональная смертность составляет около 32%, что намного выше эмбриональной смертности при искусственном осеменении коров и телок. Не исключено, что наибольшая часть этой потери может быть следствием повторных манипуляций с реципиентом во время эхографии или ректального исследования.

Высокая эмбриональная смертность может быть также связана с пересадкой эмбрионов, полученных от суперовулировавших животных. Процент стельности после пересадки эмбрионов от доноров с суперовуляцией ниже, чем после пересадки от доноров без суперовуляции со спонтанной охотой.

Выживаемость свежеполученных, замороженно-оттаянных и культивированных эмбрионов после пересадки к 21-му дню начавшейся стельности примерно одинакова, но к 90-му дню стельности она в опытах составила соответственно 55,4, 46,8 и 33,3%. Эмбриональная смертность после пересадки свежеполученных эмбрионов составила 28%, замороженно-оттаянных — 28,5 и культивированных — 46,4%. Потери стельности между

60-м и 90-м днями очень незначительны. После замораживания и культивирования эмбрионов смертность их повышается, что, вероятно, связано с повреждением эмбриональных клеток в процессе этих манипуляций.

Гистологическими и ультраструктурными исследованиями показано, что после замораживания число дегенерированных клеток возрастает до 25% при значительном показателе изменчивости (65%) между эмбрионами. У свежеполученных эмбрионов этот показатель равен 8%. После культивирования (зародыши овец) клетки эмбрионального диска повреждаются в большей степени, чем клетки трофобласта.

Возможно, после пересадки замороженно-оттаянных и культивированных эмбрионов в некоторых случаях в матке развиваются только ткани трофобласта. Это вызывает антилютические сигналы, что приводит к удлинению эстрального цикла у реципиентов.

ВЛИЯНИЕ ЧИСЛА ПЕРЕСАЖЕННЫХ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ КЛЕТОК НА ИХ ПРИЖИВЛЯЕМОСТЬ

Процент стельности повышается по мере увеличения числа пересаживаемых клеток; так, от пересадки половин эмбрионов — около 40%, от двух целых бластоцист — 69%. Аналогично повышается процент стельности от пересадки замороженно-оттаянных эмбрионов с 20% (одна половинка замороженной бластоцисты) до 64% (две замороженные целые бластоцисты). С числом пересаживаемых в матку эмбриональных клеток, вероятно, связана интенсивность сигналов, подаваемых эмбрионом на рецепторы матки реципиентов, что приводит к преждевременному рассасыванию желтого тела.

Без предварительного отбора эмбрионов по качеству перед микроманипуляцией и замораживанием стельность от пересадки одной половинки эмбриона составляет около 16% по сравнению с 62% от пересадки двух половин эмбрионов. Ультраструктурные исследования показывают, что, кроме 2-кратного уменьшения числа клеток в процессе деления, многие клетки исключаются из-за травмирования вследствие самого деления. Поэтому для получения приемлемого уровня приживляемости эмбрионов необходимо определенное число эмбриональных клеток, чтобы матка реципиента получила достаточной силы сигнал для начала стельности.

Введение гормона хориогонина в дозе 1000 МЕ в середине эстрального цикла способствует продлению функции желтого тела приблизительно на 6 дней, что дает возможность отодвинуть лютеолиз и обеспечить эмбриону дальнейшее развитие и достаточную лютеотрофную стимуляцию, исходящую от него.

ВЛИЯНИЕ СИНХРОННОСТИ ЭСТРАЛЬНЫХ ЦИКЛОВ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ И РАЗВИТИЕ ЭМБРИОНОВ

Максимальный процент стельности у крупного рогатого скота после пересадки наблюдается при синхронном эстральном цикле у донора и реципиента. Аналогично проявляется влияние возраста эмбрионов на их приживляемость в зависимости от эстрального цикла у реципиента.

У мышей, крыс и свиней, наоборот, более молодые эмбрионы выживают хуже при синхронном эстральном цикле. Возраст эмбрионов должен опережать эстральный цикл реципиента в пределах суток.

При асинхронном эстральном цикле доноров и реципиентов у эмбрионов снижается жизнеспособность в результате влияния не соответствующей их возрасту маточной среды. Имеются межвидовые различия. Так, у крыс развитие эмбрионов после пересадки не зависит от воздействия внутриматочной среды. Эмбрионы старше на одни сутки по отношению к эстральному циклу успешно приживляются. Наоборот, опережение эстрального цикла реципиента на сутки вызывает гибель эмбрионов в течение нескольких часов. У крыс и мышей внутриматочная среда в период, предшествующий приживлению, находится на границе допустимого для развития эмбриона.

Первое требование к синхронности у этих видов проявляется перед самой имплантацией, поскольку эмбрионы на стадии бластоцисты начинают реагировать на специфические секреты. Эмбрионы, не способные реагировать на новые условия, не приживляются и погибают. Из внутриматочного содержимого крыс и мышей выделены маточные белки, специфичные для изменяющихся в этот период стадий развития эмбриона. Пока неизвестно, каким образом эти белки оказывают влияние на содержание и скорость процессов развития эмбриона. И, вероятно, это влияние будет трудно изучить на этих животных, поскольку имплантация эмбрионов происходит на ранней стадии.

У свиней прикрепление эмбрионов в матке происходит на 18-й день, то есть на более поздней стадии развития, чем у крыс и мышей. Известно, что внутриматочная среда стимулирует удлинение бластоцисты на 11-й день. Однако и у этого вида животных требуются дополнительные исследования по определению времени, когда внутриматочные секреты впервые оказывают влияние на развитие эмбриона.

Имеются прямые доказательства, что у овец развитие эмбрионов после пересадки изменяется под влиянием внутриматочной среды. Эмбрионы, которые слишком асинхронны (48 ч) с эстральным циклом реципиента, попадая в маточную среду, через несколько дней становятся аномальными и разрушаются. Эмбрионы, отставшие в своем развитии от эстрального цикла

реципиента, попадая во внутриматочную среду, развиваются быстрее, чем при синхронной пересадке, эмбрионы старшего возраста по отношению к внутриматочной среде развиваются в замедленном темпе.

Степень влияния на эмбрионы внутриматочной среды зависит от стадии их развития во время пересадки. Так, эмбрионы при пересадке реципиентам, не совпадавшим по фазе цикла на трое суток (эмбрионы 3-суточные, реципиенты на 6-й день эструса), нормально развиваются и дают высокий процент суягности. Следовательно, более поздняя внутриматочная среда (плюс 3 дня) не оказывает заметного влияния на развитие и приживляемость эмбрионов. В этих условиях эмбрионы имеют тенденцию к более быстрому развитию, чем при синхронной пересадке. Эмбрионы, полученные на 6-м дне развития и пересаженные реципиенту на 8-м дне цикла, испытывают четкое влияние внутриматочной среды. Они становятся после трех дней пребывания в матке более развитыми, чем нормальные эмбрионы этого возраста, но теряют способность приживляться и индуцировать суягности.

Различие в реакции 3- и 6-суточных эмбрионов на внутриматочную среду показывает, что в конце первой недели суягности происходят изменения в эмбрионе, в секретах матки или одновременно в том и другом. Асинхронно пересаженные эмбрионы овец, не способные вызывать беременность, могут продолжать развитие до четырех недель при нормальном уровне прогестерона и исчезают с возобновлением охоты у реципиентов.

У крупного рогатого скота наблюдается четко выраженное сходство с овцами во влиянии асинхронности на жизнеспособность эмбрионов, хотя вполне вероятны различия между этими двумя видами во времени наступления отмеченных изменений.

МЕХАНИЗМ ГОРМОНАЛЬНОЙ РЕГУЛЯЦИИ БЕРЕМЕННОСТИ

Структура гормональных изменений, необходимых для перехода к состоянию беременности, изучена у нескольких видов животных. Для выяснения механизма регуляции беременности вводили стероидные гормоны овариоэктомизированным животным или создавали условия, предотвращающие влияние этих гормонов у осемененных животных. Так, овариоэктомизированным животным пересаживали эмбрионы и вводили стероидные гормоны. При этом были выявлены три фазы гормональной обработки, необходимые для становления беременности (прогестерон в течение 5 дней перед осеменением, эстрадиол в день охоты, прогестерон после осеменения). Отсутствие любой инъекции гормонов приводило почти к отсутствию беременности.

Введение прогестерона перед осеменением имитирует уровень этого гормона в течение фазы желтого тела предыдущего

цикла. Данные относительно концентрации и продолжительности курса инъекции прогестерона для достижения максимального эффекта практически отсутствуют.

У крупного рогатого скота наблюдается связь между концентрацией прогестерона и оплодотворяемостью яйцеклеток.

Более высокий уровень прогестерона совпадает с более высокой оплодотворяемостью коров и телок, что является отражением позитивного влияния прогестерона перед осеменением. Повидимому, у животных, имеющих более высокий уровень прогестерона в одном цикле, имеется склонность к повторению схожего уровня и в других циклах. У овец вероятность повторения уровня прогестерона по циклам составляет всего 15—20%.

Содержание эстрадиола должно соответствовать уровню, который соответствует синтетической деятельности фолликулов яичника перед овуляцией.

Используют два совпадающие в основном курса введения препарата. Несмотря на то что суммарное количество препарата в одном случае было вдвое больше, чем в другом, процент суягности в обоих вариантах был почти одинаковым.

Роль введения прогестерона после осеменения сводится в основном к следующему. Во-первых, для имитации нормальной ситуации необходимо поддерживать базовый уровень прогестерона до 4—5-го дня после охоты. Во-вторых, на 4-й и 5-й день нужно создать уровень прогестерона, типичный для фазы желтого тела. В-третьих, уровень прогестерона в период фазы желтого тела имеет решающее значение для жизнеспособности эмбриона. При этом матка способна реагировать на уровень прогестерона, характерный для фазы желтого тела, сразу же после охоты.

В норме развитие зародыша до 4-го дня не зависит от повышения уровня прогестерона, однако матка способна реагировать на более высокие уровни гормона только в том случае, если имеется его базовый уровень к моменту наступления охоты и сразу после него. Поскольку матка способна реагировать на концентрацию прогестерона, соответствующую фазе желтого тела, то сразу же после наступления охоты базовый уровень этого гормона следует рассматривать как условие, при котором сохраняется способность матки к такой реакции. Если овариоэктомизированным овцематкам не вводили экзогенный прогестерон до имплантации гормона на 4-й или 5-й день, то суягными из них становились только 18%. Если же прогестерон вводили до имплантации, то суягными становились 69,2% маток. Причина потери у эмбрионов жизнеспособности при отсутствии прогестерона не выяснена.

Создание определенного уровня прогестерона, характерного для фазы желтого тела с помощью подкожной имплантации гормона у овариоэктомизированной овцы, позволило определить

оптимальное время для проведения имплантации. Если ее проводили на 4—5-й день, то процент суяжности был выше, чем при имплантации на 3-й день. От времени создания уровня прогестерона, характерного для фазы желтого тела, зависит оптимальное время пересадки эмбриона. Возможно, что увеличение концентрации гормона способствует изменениям в секреторной функции матки в конце первой недели суяжности.

Отдельные овцематки становятся суяжными при очень низких уровнях прогестерона, что, вероятно, определяется индивидуальной изменчивостью концентраций прогестерона, необходимых для поддержания нормального развития эмбриона. Изменчивость такого рода наблюдается и у осемененных овец.

Если обеспечить соответствующий уровень прогестерона в крови животного, характерный для фазы активного желтого тела, то пересаженные эмбрионы нормально приживляются. Но при этом время пересадки необходимо корректировать на тот же интервал, с каким опережением вводится прогестерон. Это исключительно важно, поскольку открывает возможность управления временем наступления гормональных изменений у реципиента путем введения прогестерона до подъема его уровня эндогенным путем.

Хотя потребность в прогестероне для синхронизации охоты может быть одинаковой для всех млекопитающих, действующий в этом случае механизм у разных видов животных существенно различается. Так, у мышей и крыс появление беременности зависит от последовательного влияния прогестерона после осеменения, а затем эстрогенов. Еще до имплантации эстрогены из фолликулов яичников изменяют секреторную деятельность матки, в результате которой, в свою очередь, происходят изменения и в эмбрионе. У кроликов изменения внутриматочной среды после осеменения зависят исключительно от прогестерона. Эти изменения в матке можно задержать введением после осеменения эстрадиола или ускорить введением прогестерона до овуляции. Поскольку у кроликов овуляция происходит во время спаривания, то доминирующими стероидами перед осеменением являются эстрогены в отличие от видов животных, у которых овуляция происходит спонтанно.

Можно предположить, что у всех млекопитающих становление беременности зависит от точной последовательности гормональных сдвигов, хотя между отдельными видами имеются различия. В результате этих сдвигов происходят изменения в секреторной деятельности матки и в структуре ее слизистой оболочки, которые играют решающую роль в развитии и приживлении эмбриона.

Общепринято, что динамика гормонов в материнском организме всегда соответствует становлению беременности. Однако доказательств в пользу этого утверждения очень мало. Извест-

но, что процент выживших эмбрионов заметно меньше у овец с низким уровнем прогестерона в нулевой и первый день после случки. Отмечена тенденция к понижению процента приживляемости эмбрионов у овец с пониженным уровнем прогестерона в фазе желтого тела. Однако у таких овец процент оплодотворения яйцеклеток очень высок. Причина подобной корреляции пока неизвестна. Возможно, естественный уровень прогестерона после начала охоты, да и в другие периоды, слишком низок для возникновения беременности. Даже у здоровых овцематок в хороших условиях содержания изменчивость уровня прогестерона может быть высокой, что снижает жизнеспособность эмбрионов.

Связь между приживляемостью эмбрионов и концентрацией прогестерона в первые дни после осеменения наблюдается и у других видов животных. Так, коровы, оказавшиеся впоследствии стельными, имеют более высокую концентрацию прогестерона в период от нулевого до третьего дня от начала охоты. Однако необходимы дополнительные исследования для установления связи сверххранной стадии беременности с концентрацией прогестерона.

Процесс становления беременности зависит от соответствующего взаимоотношения между матерью и эмбрионом. Как уже говорилось, внутриматочная среда материнского организма не всегда может соответствовать потребностям эмбриона. Важна также изменчивость стадии развития эмбриона, что может быть причиной, влияющей на его жизнеспособность.

Подобные различия в стадии развития эмбриона могут быть и у коров, овец. Среди факторов, оказывающих влияние на степень развития эмбрионов,—растянутость во времени овуляции и оплодотворения, а также различие в скорости деления клеток. На темп развития эмбрионов более поздних стадий может оказывать влияние секреторная деятельность матки.

При суперовуляции изменчивость у эмбрионов выражена сильнее, чем при нормальной овуляции. Хорошо известно также, что изменчивость более высокая при использовании эмбрионов от разных доноров, даже если они приходят в охоту в один и тот же день. При трансплантации для повышения ее результативности очень важно уменьшить изменчивость в стадии развития эмбрионов. Но этот вопрос пока не разрешен.

При трансплантации физиологическое состояние донора и реципиента определяют по периоду времени после охоты. Состояние овец и коров можно оценить по времени подъема концентрации прогестерона у реципиента и по стадии развития эмбриона у донора. У осемененных животных оплодотворяемость яйцеклеток и приживляемость эмбрионов могут снижаться в результате изменчивости динамики гормонов и стадии развития зародыша. Пересадка эмбрионов может усиливать эту изменчивость.

При этом могут иметь значение ошибки в определении времени наступления охоты. Возможно, лучше пересаживать эмбрионы от одних животных другим при разрыве в наступлении охоты в 12—24 ч и более. Кроме того, уровень концентрации гормонов, необходимых для управления репродуктивным циклом, у донора и реципиента может модифицировать наступление охоты, а искусственное вызывание суперовуляции может увеличивать изменчивость эмбрионов по стадии развития.

Результативность трансплантации зависит от гормонального профиля у реципиента перед пересадкой эмбриона, находящегося на определенной стадии развития. Существуют три пути, которые могут повысить результативность трансплантации. Во-первых, если динамика прогестерона повторяется, то измерения, проведенные в одном эстральном цикле, могут быть использованы для предсказания физиологического состояния в течение других циклов. Имеющиеся данные указывают на то, что эффективность такого подхода маловероятна. Во-вторых, имеется возможность проводить измерение концентрации прогестерона в ходе цикла, в котором проводится трансплантация. С появлением быстрых методов анализа гормонов этот путь может стать более эффективным. В-третьих, единственная доступная альтернатива в настоящее время — введение прогестерона для регулирования времени трансплантации эмбриона.

После прихода реципиента в охоту его матка приобретает способность реагировать на повышенные концентрации прогестерона в любое время. Для регулирования времени этих сдвигов необходимо просто ввести прогестерон до времени повышения его концентрации эндогенным путем. Прогестерон или прогестаген можно вводить внутримышечно или интравагинально. Этот прием приближает время сдвига в функциях матки. Возникновение беременности будет зависеть от корректировки времени трансплантации эмбрионов. Корректировка зависит от дозы прогестерона.

На основании результатов наблюдений за осемененными овцами можно считать целесообразным создавать базовую концентрацию прогестерона в первые дни после осеменения, а затем вводить прогестерон дополнительно в фазу желтого тела.

Необходимо только, чтобы инъекции прогестерона не нарушали образования нормального желтого тела.

Применяемая морфологическая оценка стадии развития эмбриона непосредственно перед пересадкой — субъективна. Пересадка в различное время по отношению к времени введения прогестерона эмбрионов, находящихся на разных стадиях развития, дала возможность определить, что ранние бластоцисты лучше пересаживать через 45 ч после введения прогестерона и поздние — через 52 ч. Так, эмбрионы от суперовулировавших доноров имеют различия в развитии, эквивалентные 24 ч и бо-

лее. Оценить возможные преимущества этого подхода пока трудно.

Проявление фенотипических признаков обусловлено генетическим и внешним компонентами. Если жизнеспособность или выживание эмбриона рассматривать как фенотипический признак, то его гибель может происходить в результате отклонения от нормы генетического или внешнего компонента или от взаимодействия отклонений между ними.

С внедрением в практику животноводства искусственного осеменения свежей и замороженной спермой, трансплантации эмбрионов хирургическим и нехирургическим методом, их замораживания и микрохирургического вмешательства, оплодотворения вне организма, «инъекции генов» процент стельности (суягности и т. п.) используется как показатель гибели эмбрионов, связанный с применением этих методов. Исследования выявили три общих тенденции: во-первых, независимо от метода, определенный процент гибели эмбрионов всегда имеется; во-вторых, чем большему воздействию подвергается эмбрион, тем выше эмбриональная смертность; в-третьих, процент успеха повышается по мере совершенствования метода.

Из присущих эмбриону факторов, отрицательно действующих на него, известны хромосомные аномалии и моногенные мутации. Летальные моногенные мутации, которые начинают отражаться на эмбриональном развитии уже при первом дроблении зиготы, выявлены у мышей. Однако имеется еще один класс присущих эмбрионам факторов, способных вызывать гибель эмбрионов, — он представлен индуцированными мутагеном необратимыми модификациями ДНК.

Представление о важности этих факторов можно составить путем экстраполяции результатов исследований на культурах клеток и эмбрионов. Долговременное отрицательное влияние на клетки оказывают факторы, которым эмбрионы подвергаются при трансплантации, хотя первоначальный дефект в этих условиях обусловлен кратковременным воздействием внешнего фактора.

ХРОМОСОМНЫЕ АНОМАЛИИ

Они передаются по наследству или возникают в ходе гаметогенеза, оплодотворения и на начальных стадиях дробления яйцеклетки. Во время гаметогенеза при нарушении мейоза могут образовываться гаметы с несбалансированным набором хромосом. Чаше встречаются дупликация или делеция участков хромосомы, целых хромосом или отсутствие редукционного деления. Такие гаметы могут принимать участие в оплодотворении, в результате чего возникают эмбрионы с хромосомными аномалиями. При этом возникают или полиплоиды (чаще триплоиды),

20. Частота встречаемости цитогенетических аномалий у сельскохозяйственных животных в зависимости от типа овуляции (по Wilmut и др., 1985)

Вид животного	Гонадо-тропин	Возраст эмбрионов, дней	Аномалии в процессе, %		
			мейоза	оплодотворения	дробления
Естественная овуляция					
Крупный рогатый скот	—	1—56	15,4	—	—
	—	13	3,9	—	—
Овцы	—	2—3	5,0	1,3	1,3
Свиньи	—	10	1,1	5,7	—
	—	25	1,3	—	—
Стимулированная охота гонадотропинами					
Крупный рогатый скот	СЖК	7	—	11,8	23,5
	СЖК	12—18	—	1,9	—
	ФСГ	2—3	—	30,7	—
	ФСГ	7	1,6	—	11,4
	ФСГ	5—7	—	16,6	—
	ФСГ	1,0	6,6	20	—
Овцы	СЖК	2—3	4,4	16,6	1,1
	СЖК	20	—	—	1,2
Свиньи	СЖК	10	—	—	—
	СЖК	1—3	—	12,0	—

или эмбрионы-химеры. Причина такого процесса — множественное оплодотворение, нарушения отделения одного или обоих полярных телец или оплодотворение и яйцеклетки, и полярного тельца.

К нарушениям, возникающим во время первых нескольких дроблений, относятся: неразделение, ведущее к потере одной или более хромосом из одной клетки, и возможное увеличение на то же число хромосом в другой сестринской клетке; нарушение митоза, приводящее к возникновению полиплоидного ядра; нарушение цитокинеза, ведущее к образованию многоядерных клеток.

Цитогенетические исследования, выполненные на ранних эмбрионах домашних животных, можно принципиально разделить на две группы: 1) один родитель или оба гетерозиготны по какой-либо хромосомной аномалии и 2) родители имеют нормальные хромосомы. Кроме присутствия или отсутствия у родителей хромосомных аномалий, во внимание принимаются и другие факторы: тип овуляции (суперовуляция или естественная), возраст доноров (коровы или нетели), место оплодотворения (*in vitro* или *in vivo*). Распределение аномалий по их наиболее вероятным причинам приведено в табл. 20.

Частота возникновения хромосомных аномалий во время мейоза значительно выше для эмбрионов, гетерозиготных по

хромосомным аномалиям (40%), чем для эмбрионов от нормальных животных (5%). Следует ожидать нарушение мейоза у носителей аномалий, и это вызывает необходимость отбора производителей и доноров эмбрионов, свободных от хромосомных аномалий.

Исследования эмбрионов от неселектированных животных показали, что частота нарушений оплодотворения составляет 31% и зависит от типа овуляции, места оплодотворения, вида животных и возраста донора.

Эмбрионы, полученные у овец после суперовуляции (1000 МЕ гонадотропина СЖК), чаще имели хромосомные аномалии, характерные для оплодотворения, чем эмбрионы, полученные в результате естественной овуляции (16,6% против 1,3%). У свиней суперовуляция (800 МЕ гонадотропина СЖК) не сопровождалась ростом хромосомных аномалий при анализе на 10-й день. В то же время 12% аномалий, связанных с оплодотворением, отмечались у 1—3-дневных зародышей, полученных от доноров с использованием СЖК (2000 МЕ) для стимуляции у них овуляции. Аномалии, связанные с оплодотворением, отмечались у 30,7% эмбрионов крупного рогатого скота, полученных после суперовуляции (33 мг ФСГ), при оценке на стадии 1—8 клеток. Среди ооцитов крупного рогатого скота, полученных путем стимуляции гонадотропином (33 мг ФСГ) и оплодотворенных *in vitro*, у 27% имеются аномалии, возникшие при оплодотворении в результате полиспермии или мейоза (анеуплоид). Полиспермия и образование множественных пронуклеусов могут происходить в 30% случаев при оплодотворении яйцеклетки. Эти аномалии связаны с типом стимуляции ооцитов у донора, продолжительностью периода пребывания их в культуре до оплодотворения. При анализе кариотипов эмбрионов, полученных от оплодотворения *in vitro*, выявлены 2 дефекта мейоза. Яйцеклетки с несколькими пронуклеусами имеют дефекты мейоза в 17% случаев, у мышей анеуплоиды встречаются при оплодотворении яйцеклеток чаще *in vitro*, чем *in vivo* (1,9% против 0,7%).

Аномалии, возникающие в начале дробления, встречаются реже. У рожденных живыми домашних животных отмечены случаи мозаичности в связи с врожденными уродствами, возникающими, возможно, в результате дефектов дробления. У дегенерирующих 7-дневных эмбрионов коров, полученных при суперовуляции с использованием ФСГ, наблюдается наличие миксоплоидности (эмбрионы с диплоидными и полиплоидными клетками) до выхода из прозрачной оболочки. Это нормальное явление для трофобласта эмбрионов начиная с 12-го дня. Частота хромосомных аномалий в дегенерирующих 7-дневных эмбрионах выше при стимуляции доноров препаратом СЖК по сравнению с препаратом ФСГ (35% против 13%).

Эмбрионы коров имеют несколько больше аномальных кариотипов, чем эмбрионы телок (9% против 6%).

Проявление хромосомных аномалий. Несбалансированные хромосомные аномалии у домашних животных сопровождаются уменьшением размера помета и повторным осеменением. Имеется совсем немного данных о рождении животных с хромосомными аномалиями, и они касаются в основном нежизнеспособных врожденных уродов. Установлено, что эмбрионы разного возраста, полученные в различных условиях, имеют определенные типы аномалий, которые связаны с конкретными стадиями развития, при общей тенденции к их исчезновению в дальнейшем.

Аномалии, возникающие при мейозе, в большинстве своем исчезают в течение первого месяца беременности, например у свиней. При этом некоторые зародыши погибают еще на стадии двух клеток. Химеры, наблюдаемые как на стадии двух клеток, так и у 5—7-дневных эмбрионов крупного рогатого скота, не встречаются у новорожденного потомства. Поскольку эти эмбрионы химерные и происходят, по крайней мере, от трех гамет, подобную аномалию можно ожидать и в крови. Однако химерность не встречается у новорожденных телят, полученных методом трансплантации эмбрионов. Поэтому можно предположить, что аномальные эмбрионы или погибают, или гаплоидные клетки не играют роли в дальнейшем их развитии.

У овец такие химеры исчезают в течение первых 20 дней. Чисто триплоидные эмбрионы коров наблюдаются только на стадии двух клеток и в возрасте 12—15 дней. Случаи диплоидно-полиплоидной мозаики, отмеченные у дегенерирующих 7-дневных эмбрионов, вероятно, устраняются, поскольку эмбрионы такого типа редко выходят из яйцевой оболочки *in vitro* и дают низкий процент стельности при трансплантации. Мозаика такого типа не зарегистрирована ни у живых, ни у мертворожденных плодов домашних животных.

Моногенные локусы. Отдельные гены, отражающиеся на раннем утробном развитии домашних животных, не обнаружены, хотя и известно много генов, обуславливающих врожденные уродства и гибель плода. Но у мышей известно несколько генных локусов, отражающихся на раннем эмбриональном развитии. Эти мутации оказывают специфическое действие, которое не связано с определенными стадиями развития. Идентификации этих мутаций способствовало изучение инбредных и родственных линий мышей. Такой уровень гомозиготности практически невозможен у домашних животных и поэтому у них идентификация отдельных летальных мутаций генов затруднена. Однако если экстраполировать данные, полученные на мышах, то определенные гены, генные продукты и стадии развития могут

иметь отношение к внутриутробному развитию домашних животных.

Одним из примеров может служить ген РЕД (предимплантационное развитие эмбриона), в котором выделено 2 функциональных аллеля: быстрый (доминантный) и медленный, который отражается на скорости первых дроблений. Этот ген связан с важным комплексом тканевой совместимости у мышей. Считается, что подобный ген имеется и у домашних свиней.

Требуется еще много фундаментальных исследований для понимания активизации генома у эмбрионов и оценки влияния одиночных генных мутаций на их жизнеспособность. Один из подходов в понимании этих проблем — изучение трансгенных линий мышей, у которых известная группа генов внедрена с помощью ретровирусов. Поскольку эти вирусы могут быть внедрены в нескольких различных участках генома хозяина, то их присутствие может активизировать или нарушать функцию соседних генов. Такие нарушения могут приводить к формированию мутантного фенотипа после спонтанной интеграции вирусов, как в случае летального желтого волосяного покрова у мыши. Они могут быть получены также путем экспериментального введения гена, как в случае с рецессивным летальным локусом MOV-13, который блокирует проявление гена коллагена $\alpha 1$ и фактически приводит к смерти эмбриона.

ПРИБРЕТЕННЫЕ И ПРИСУЩИЕ ЭМБРИОНУ ФАКТОРЫ

Как уже отмечалось выше, операции с эмбрионами в процессе их трансплантации увеличивают процент гибели эмбрионов. Эти потери эмбрионов могут происходить сразу или постепенно. Например, после замораживания эмбрион может оказаться дегенерированным, но морфологически выглядеть жизнеспособным, вызывать увеличение цикла у реципиента, а впоследствии все же гибнет. Можно вполне обоснованно предположить, что такая потеря эмбриона — результат стойких изменений (мутаций) в ДНК эмбриона, вызванных воздействием мутагенов *in vitro* до пересадки. Среди возможных мутагенов можно отметить факторы, воздействующие во время инкубации в гетерологичной сыворотке, — воздействие ультрафиолетовых лучей, связывающие ДНК красители, радиоактивное излучение, криопротекторы и остаточные количества оксида этилена. Информация о возможном мутагенном и(или) токсическом воздействии этих факторов содержится во многих сообщениях. Одним из тестов является определение уровня того или иного мутагена, при котором ингибируется развитие не менее 50% эмбрионов. Другая методика состоит в изучении обмена сестринскими хроматидами. Это один из наиболее надежных цитологических методов определения хромосомных повреждений.

Цитогенетическими методами можно выявить разрывы хромосом и обмен молекулами ДНК в гомологичных локусах парных хроматид или в пределах одной хроматиды. Такие изменения не выявляются при использовании других методов окрашивания.

В культуре клеток и культуре эмбрионов в матке или *in vitro* вероятность обмена сестринскими хромосомами увеличивается после воздействия различных токсических веществ и мутагенных элементов среды. Базовая частота обмена хроматидом других эмбрионов в условиях матки значительно ниже, чем в культуральной среде, что указывает на эффект воздействия экзогенных факторов, не встречающихся в нормальных условиях.

При обмене сестринскими хроматидами изменения сохраняются в течение не менее трех циклов клеточного деления после повреждения ДНК. Серьезность нарушений, вызванных повреждением ДНК, зависит от функции пораженного участка ДНК и способности соответствующей системы восстанавливать повреждение ДНК.

Из числа внешних факторов, которые могут вызвать токсическое и мутагенное воздействие на эмбрионы, сопровождаемое их гибелью, может быть гонадотропин — СЖК.

Кроме увеличения частоты полиспермии, отмеченного у овец и мышей, миксоплоидии у эмбрионов коров, у мышей отмечено прямое токсическое действие СЖК на развитие эмбрионов. Наблюдается значительное увеличение числа разрушенных эмбрионов и частоты обмена хроматидами в группах мышинных эмбрионов, полученных путем суперовуляции с использованием 3 и 10 м.е. СЖК, в сравнении с контролем и вариантом с введением 1,5 м.е. СЖК.

Культуральная среда и сыворотка имеют существенное влияние на базовую частоту обмена хроматидом в культуре лимфоцитов. Рост эмбрионов в среде с сывороткой от различных доноров варьирует значительно больше, чем в среде сыворотки одного донора. Среда, содержащая сыворотку от разных доноров, приводит к различиям в частоте обмена хроматидом. После термической обработки сыворотки эти различия сглаживаются. Очевидно, не все партии сыворотки содержат факторы, вызывающие обмен сестринскими хроматидами. Причиной этому могут быть различия в технологии приготовления сыворотки.

Ультрафиолетовые лучи — мощное средство, вызывающее обмен хроматидом между эмбрионами. Нарушения, вызванные воздействием ультрафиолетовых лучей, не восстанавливаются за один цикл клеточного деления, а сохраняются в нескольких поколениях клеток.

Близкие к ультрафиолетовым лучи (длина волны 300—360 нм) могут вызывать обмен хроматидом, если в культуральной среде имеются некоторые светочувствительные вещества — индикаторы рН и антибиотики. Различные красители, связыва-

ющие ДНК (например, акридиноранж), повышают частоту обмена хроматидом. Однако при изучении потенциальной токсичности флуоресцентных витальных красителей (флуоресцеин-диацетат) на эмбрионах коров процент успешной трансплантации был почти одинаков при использовании обработанных и необработанных эмбрионов.

Известно несколько видов ионизирующей радиации, повреждающей ДНК или способствующей химическим модификациям ДНК и вызывающей хромосомные перестройки. Высокоэнергетическая радиация (например, рентгеновские лучи) не является активным индикатором обмена хроматидом между эмбрионами. Культивирование эмбрионов с использованием обработанных тритием аминокислот (β -радиация) показало 50%-ную летальность в концентрации 0,03—0,13 микрокуб в 1 мл в зависимости от используемой аминокислоты, и около 50% эмбрионов погибает при обработке их тритием тимидина в дозе 0,08 микрокуб мм/мл. Но такие низкие концентрации, как 0,1 нанокуб мм/мл, снижают процент эмбрионов, способных формировать зародышевый диск. В целом эмбрионы животных перед имплантацией крайне чувствительны к β -радиации, происходящей от обработанных тритием соединений, включаемых как материал для синтеза.

Оксид этилена, известный своими мутагенными свойствами, содержится в остаточных количествах в пластмассовых сосудах для культивирования эмбрионов, отрицательно влияет на их развитие и качество.

У коров среди эмбрионов, полученных после суперовуляции, половина имеют к 8-му дню аномалии развития. Даже при пересадке только морфологически нормальных эмбрионов в последующем происходят значительные дополнительные их потери. Хромосомные аномалии и мутации по одному или нескольким генам относятся к числу присущих эмбриону факторов, на долю которых приходится значительная часть этих потерь.

Хромосомные аномалии, возникающие на стадии мейоза, обычно встречаются чаще, если отец и мать гетерозиготны по сбалансированной хромосомной аномалии. Отбор доноров эмбрионов и отбор спермы могут уменьшать этот риск, и новые работы о природе вводимых гормонов и методах их введения могут способствовать повышению жизнеспособности получаемых после суперовуляции эмбрионов. Этого можно достичь и путем снижения восприимчивости полученных при суперовуляции ооцитов к полиспермии и (или) митотической активности полярных телец и уменьшения числа нарушений в период дробления.

Даже малые изменения в ДНК при мутации одного гена могут приводить к гибели эмбриона. Возможность блокировки специфических функций генов включением сегментов вирусного

генома свидетельствует в пользу предположения о возможности достичь тех же результатов при воздействии мутагенами. Знание типа мутагена, который может встречаться при работе с эмбрионами, будет способствовать снижению их смертности.

СОСУДИСТЫЙ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКТОРЫ ПОДДЕРЖАНИЯ БЕРЕМЕННОСТИ У ЖИВОТНЫХ

Изменения, происходящие в токе крови матки и яичников, имеют существенное значение в период раннего эмбрионального развития. Определяют ранний период беременности (24—48 ч), когда материнский организм впервые реагирует на присутствие эмбриона в матке и критический период ощущения беременности.

При вымывании эмбрионов из матки до 13-го дня у овец и свиней и до 16-го дня у коров регрессия желтого тела и проявление следующего эстрального цикла происходят у этих видов в нормальное время. Если эмбрионы не удалять до 12-го дня (овцы, свиньи) и до 16-го дня (коровы), то желтое тело сохраняется на 5—6 дней дольше обычного. На этом основании было сделано заключение о том, что в начальный период своего существования эмбрион предохраняет желтое тело от регрессии, в то время когда материнский организм начинает ощущать беременность. Такое заключение подтверждается тем, что введение в матку гомогенизированных зародышей, извлеченных в период, близкий ко времени первоощущения беременности, приводит к сохранению желтого тела у овец, свиней и коров. Поэтому за критический период в ощущении беременности материнским организмом принят 12—13-й день у овец и свиней и 16—17-й день — у коров от начала охоты. Однако это не исключает возможности поступления дополнительных сигналов от эмбрионов и(или) матки к материнскому организму до или после этого периода, которые, несомненно, нужны для становления и поддержания нормальной беременности.

КРОВЕНОСНАЯ СИСТЕМА КАК ПОСРЕДНИК ФУНКЦИИ ЯИЧНИКОВ

Во время эстрального цикла у овцы, коровы и свиньи кровообращение в матке и яичниках сильно различается. Маточное кровообращение наиболее интенсивно во время охоты, а в фазе желтого тела находится на низком уровне. Кровообращение в яичниках по интенсивности противоположно по характеру маточному. Оно минимально в период охоты и максимально в фазе желтого тела.

Повышение интенсивности маточного кровообращения во время охоты положительно коррелирует с динамикой соотношения эстрогенов и прогестинов в крови этой системы. В то же

время между интенсивностью кровообращения в яичниках и соотношением $E : P_4$ эстрогенов и прогестинов в крови этой системы корреляция отрицательная. Поскольку кровь, протекающая через желтое тело, составляет 90% всего кровотока в яичниках у овец и свиней, то положительная зависимость между содержанием прогестерона в системе и интенсивностью кровообращения в яичнике отражает резкое увеличение в размере сосудистого основания яичников в фазе желтого тела. После регрессии желтого тела размер сосудистого основания яичников резко уменьшается. Этим можно объяснить очевидную отрицательную зависимость между содержанием эстрогенов и интенсивностью кровообращения в яичниках. Отмечено, что эстрадиол 17β эффективно расширяет сечение сосудов матки у овец, коров и свиней и стимулирует повышение интенсивности кровообращения в яичниках у супоросных и холостых свиней.

Кратковременное повышение интенсивности маточного кровообращения совпадает по времени с материнским первоощущением беременности. Повышение интенсивности маточного кровообращения наблюдается раньше вторичного повышения, связанного с имплантацией зародыша. Кроме того, раннему кратковременному повышению интенсивности маточного кровообращения сопутствуют кратковременное повышение интенсивности кровообращения в яичниках у коров и свиней и выделения прогестерона у овец.

Поддержание функции желтого тела в начальный период беременности у овец и коров происходит путем местного сосудистого переноса лютеотропного и (или) антилютеолитического вещества из беременной матки к яичникам. Подобный механизм переноса может быть и у свиней, поскольку одностороннее внутриматочное введение эстрадиола 17β — гормона, который у свиней является антилютеолитическим, — удлиняет период секреции прогестерона у холостых свиноматок и избирательно стимулирует секрецию прогестерона у холостых свиноматок и также секрецию прогестерона яичником на той стороне, где имеется желтое тело. Повышение интенсивности кровообращения в матке и яичниках может усиливать перенос образовавшегося под влиянием плода лютеотропина из беременной матки в яичник, имеющий желтое тело. Это предположение подтверждается данными о том, что повышение уровня прогестерона совпадает с первоощущением беременности и повышением интенсивности маточного кровообращения.

Важнейшим фактором естественной и вызванной простагландином $F_{2\alpha}$ регрессии желтого тела может служить снижение интенсивности поступления крови к желтому телу. Повышение интенсивности кровообращения в яичниках в результате повышения тока крови к желтому телу, а не к другим участкам яичника положительно коррелирует с секрецией желтым телом

прогестерона. Расширение сосудов яичника, совпадающее с началом ощущения беременности, может, таким образом, ингибировать лизис желтого тела путем поддержания интенсивности его кровоснабжения и продолжения выделения им прогестерона.

РОЛЬ ЗАРОДЫША В ИЗМЕНЕНИИ СОКРАТИМОСТИ МАТОЧНЫХ И ЯИЧНИКОВЫХ АРТЕРИЙ

Известно, что диаметр сосудов матки и яичников контролируется адреночувствительными сосудосуживающими нервами. Сосудосуживающая реакция, осуществляющаяся через рецепторы, чувствительные к адреналину, является основной для кровеносных сосудов матки и яичников. Сосудосуживающая реакция матки овец на введение норэпинефина (адреноподобный нервно-трансмиссивный препарат) менее выражена в середине и конце суягности по сравнению с эстральным циклом. Снижение происходит главным образом в результате уменьшения влияния эпинефрина на сосудистую строму карункулов плаценты. При этом отсутствует влияние препарата на сосуды внутренней и мышечной оболочек матки.

Кратковременное повышение интенсивности маточного кровообращения в начале беременности происходит до имплантации и формирования плаценты и, следовательно, не в результате расширения сосудов плаценты. Сократительная способность артерий матки снижается в период, критический для ощущения беременности материнским организмом. Однако содержание в артериях матки рецепторов норэпинефрина и адреналина, а также соотношение эстрогенов и прогестерона в крови этой системы подобны наблюдаемым в фазе желтого тела эстрального цикла.

У свиней реакция сосудов яичников на хлористый калий, который стимулирует потребление Ca^{++} клетками гладкой мускулатуры сосудов и приводит к сужению сосудов, менее выражена на 13-й день супоросности в сравнении с эквивалентным днем эстрального цикла, хотя величина соотношения эстрогенов и прогестина в системной крови была близкой. Поэтому можно предположить, что уровень норэпинефрина и активность адреночувствительных рецепторов в сосудах яичников и матки в начале беременности поддерживаются на достаточно высоком уровне и что сам зародыш вызывает расширение сосудов через неспецифическое влияние на гладкую мускулатуру сосудов матки и яичников. Вероятно, такое влияние оказывается через изменение потребления Ca клетками гладкой мускулатуры кровеносных сосудов.

Это предположение может объяснить снижение сократимости артерий матки при введении простагландина $F_{2\alpha}$ в сочетании со стимуляцией нервов в критический период у овец и коров и

быстрое возобновление симпатической тонизации маточных артерий после устранения сосудорасширяющего действия зародыша.

Подобная ситуация возможна в маточном кровообращении в конце беременности и при родах. Кровоток в матке коров и свиней не снижается до рождения плода и выхода плаценты.

Высокая интенсивность маточного кровообращения в конце беременности скорее результат неспецифического влияния сосудорасширяющих факторов, выделяемых плодом, чем прямого воздействия на периартериальные симпатические сосудосуживающие нервы. При этом быстро восстанавливается способность сосудов матки сужаться после рождения плода и выхода плаценты, в результате чего быстро снижается интенсивность кровотока в матке.

Как отмечалось ранее, эстрадиол 17β является мощным расширителем сосудов матки. Он стимулирует также интенсивность кровообращения в яичниках у суягных и несуюгных овец. Повышенное содержание эстрадиола в крови маточных вен у коров и свиней совпадает по времени с критическим периодом первоощущения беременности у самок каждого из этих видов. В крови маточных вен у суягных овец он отсутствует. Однако содержание эстрадиола в маточных смывах овец, находящихся в критическом периоде первоощущения суягности, всегда повышенное, что подтверждает изложенные выше наблюдения на коровах и свиньях. Определено взаимодействие между зародышем овцы и внутренней оболочкой матки в синтезе эстрогенов на 14-й день. Наоборот, зародыш — основной источник эстрогенов у коров в начале стельности и у свиней в начале супоросности, а эндометрий синтезирует малое количество эстрогенов или совсем не синтезирует их. Таким образом, зародыш овцы может вызывать синтез эстрогенов тканями внутренней оболочки матки, а эмбрионы коров и свиней сами способны синтезировать эстрогены.

Предполагают, что воздействие эстрогена на клетки гладкой мускулатуры маточных артерий может усиливаться при повышении содержания его, которое отмечено в лимфе свиней на 11—15-м дне супоросности. Кроме того, сама лимфа может служить средством переноса эстрогенов из беременной матки в яичники, где они могут вызывать усиление кровотока. Это предположение подтверждается данными о том, что краткосрочное усиление кровотока в матке свиней отмечалось на 11-й день, тогда как повышение кровотока в яйцеводах и желтом теле наблюдается на 24—48 ч позже. Введение эстрадиола 17β в объеме, равном обычному выделению его маткой во время первоощущения беременности, в изолированный рог матки холостой свиньи или в матку нестельных телок поддерживало функцию желтого тела в течение нескольких дней. Однако

эстрадиол не оказывает влияния на секрецию прогестерона желтым телом свиньи *in vitro* в условиях культуры и ингибирует вызванную лютеонизирующим гормоном секрецию прогестерона культурой клеток желтого тела коровы. Это указывает на то, что прямое участие эстрадиола в стимуляции выделения прогестерона желтым телом маловероятно и подчеркивает его возможную антилютеолитическую роль, осуществляемую через расширение сосудов матки и яичников при выделении этого гормона зародышем на ранней стадии развития и (или) беременной маткой.

Получены определенные результаты при изучении механизма, посредством которого эстроген выполняет роль посредника в повышении интенсивности кровотока в матке. Они могут пролить свет на его роль в поддержании функции желтого тела в начале беременности. Тонус маточной артерии заметно снижается при повышении уровня эстрогена, и она остается растянутой и вялой в начальный период беременности (до 13-го дня).

Тонус маточной артерии проявляется как сопротивление растяжению сосуда, которым определяется базовый уровень кровотока. Тонус определяется количеством кальция, доступного для сократительных белков гладкой мускулатуры артерии. Кальций для тонизации берется из внеклеточных источников, и его поступление в клетку регулируется открыванием и закрыванием кальциевых канальцев на поверхностной мембране в соответствии с изменениями мембранного потенциала. Изменения в тоне маточной артерии происходят медленно — в течение многих минут. Определена возможность определения проницаемости этих потенциально чувствительных канальцев при культивировании путем сравнения перфузионного давления (сопротивление растяжению) только что вырезанных сосудов с давлением, определяемым во время введения лекарственных средств, вызывающих максимальную и минимальную тонизацию.

Максимального тонуса можно достичь введением в сосуды деполяризующих концентраций хлористого кальция или жидкостей, богатых кальцием. Минимальный тонус наблюдается в присутствии веществ, блокирующих потенциально чувствительные канальцы. Маточные артерии свинок, находившихся на 13-м дне супоросности, имеют низкий тонус и под воздействием высоких концентраций кальция или деполяризующих концентраций хлористого калия проявляют пониженный тонус в сравнении с сосудами неосемененных животных в эквивалентные дни после охоты. Это указывает на то, что чувствительные к разности потенциалов кальциевые канальцы этих сосудов частично блокируются. При введении вытяжки 13-дневных зародышей в сосуды, вырезанные у несупоросной свиньи на 13-м дне после охоты, они приобретают тонус, типичный для сосудов супоросных свинок. Эстрон и эстрадиол, называемые катехолэстрогенами, пре-

терпевают ароматическое гидроксирование в двух или четырех позициях.

Установлено, что 13-дневные эмбрионы свиньи могут синтезировать катехолэстрогены из свободных эстрогенов в культуральной среде и что значительное количество этих соединений содержится в маточных смывах свиней на 13-м дне супоросности. После введения в маточные артерии холостой свиньи на 13-м дне цикла катехолэстрогенов в условиях культуры базовое давление перфузии через 20—30 мин снижалось до 60% от первоначального уровня. С этим связано снижение на 75% чувствительности артерии к деполяризующим дозам хлористого калия.

Вызванные введением катехолэстрогенов изменения представляются специфичными для маточной артерии, поскольку именно катехолэстрогены, а не эстрон и не эстрадиол 17β , снижают поглощение кальция маточной артерией свиньи. Однако катехолэстрогены не влияют на поглощение кальция брыжеечной артерией, поскольку они одинаковы по эффективности со свободными эстрогенами в повышении интенсивности кровотока в матке. При введении в маточную артерию кастрированных свинок и аорту крыс они, вероятно, играют роль как возможные посредники между эстрогенами и вызываемой зародышем гиперемией матки. Катехолэстрогены могут также оказывать прямое лютеотропное действие.

СОСУДОРАСШИРЯЮЩИЕ ФАКТОРЫ, ОБУСЛОВЛЕННЫЕ НАЛИЧИЕМ ЗАРОДЫША

Доказано, что введение простагландина E_2 стимулирует усиление кровотока в матке овец и коров. Однако простагландин E_2 значительно менее эффективен, чем простагландин E_2V , в стимуляции расширения сосудов матки. Простагландин E_2 вырабатывается в культуральной среде тканями как зародыша, так и эндометрия на 14-м дне у овец и на 13-м дне у коров. Кроме того, отмечено повышенное содержание простагландина в маточных смывах коров и свиней, в маточных смывах и венозной крови овец, совпадающее с первоощущением беременности.

Внутриматочное введение больших объемов простагландина E_2 увеличивает продолжительность периода сохранения функционирующего желтого тела у холостых овец и коров. Лютеотропный эффект простагландина E_2 — следствие его способности к прямой стимуляции секреции прогестерона клетками желтого тела. Показано, что простагландин E_2 ингибирует вызванный простагландином $F_{2\alpha}$ лизис желтого тела при введении обоих простагландинов одновременно в яичниковую артерию или в ножку яичника несукляной овцы. Простагландин E_2 , поступающий в ранний период беременности из матки и зародыша, мо-

жет непосредственно стимулировать секрецию прогестерона желтым телом. Введение малых доз простагландина E_2 в матку свиньи и коровы не оказывает влияние на секрецию прогестерона желтым телом. Однако если внутриматочное введение простагландина E_2 проводить совместно с простагландином E_2B , то увеличивается период секреции желтым телом прогестерона по сравнению с введением одного простагландина E_2B .

Расширение сосудов матки и яичников, вызываемое, вероятно, эстрогенами (свободными и гидроксिलированными) зародышевого происхождения, необходимо для переноса простагландина E_2 из беременной матки в яичник, имеющий желтое тело. Простагландин E_2 в этих условиях оказывает прямое стимулирующее действие на секрецию прогестерона желтым телом. Это не исключает определенную роль простагландина E_2 в стимуляции кровотока в матке и яичниках. Отмечено сосудорасширяющее действие простагландина E_2 на сосудистую строму матки независимо от его влияния на высвобождение норэпинефрина околосоудистыми симпатическими нервами. Это похоже на неспецифическое действие зародыша на гладкую мускулатуру сосудов матки и яичников, и, вероятно, простагландин E_2 частично ответствен за кратковременное повышение интенсивности кровотока в матке и яичниках в период, критический для ощущения беременности материнским организмом.

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МЕЖДУ ТРАНСПЛАНТАТОМ И ОРГАНИЗМОМ ЖИВОТНОГО

У позвоночных тканевые трансплантаты от одного животного к другому генетически неоднородному (аллогенному) животному того же вида неизменно отторгаются. Выяснено, что отторжение пересаженных клеток обусловлено генетически контролируемым комплексом антигенов тканевой совместимости, находящимся на поверхности клеток. Отторжение трансплантатов рассматривается как иммунный процесс, осуществляемый в первую очередь через посредство лимфоидных клеток (а не через посредство антител сыворотки). Интенсивность отторжения зависит от антигенных различий в тканевой совместимости между трансплантатом и хозяином.

Иммунологическое взаимодействие между зародышем и материнским организмом перед имплантацией. Комплекс антигенов тканевой совместимости (МНС) уникален у каждого индивида, за исключением животных, полученных от очень тесного инбридинга, и идентичных двоен, и является биологическим маркером для отделения себя от не себя. Антигены МНС играют главную роль во взаимодействии клетки с клеткой при иммунной реакции и могут выполнять много других биологических функций. Примером участия МНС в воспроизводстве служат

связь между повышенной яйценоскостью и комплексом В₁, а также влияние комплекса роста и воспроизводства на плодовитость, связанную с РТ-1.

У мышей встречаемость влагалищных перегородок, преимущественное спаривание и скорость эмбрионального развития связаны с комплексом Н-2 (МНС мышей). У людей повторяющиеся спонтанные аборты связаны с комплексом лимфоцитарных антигенов человека и ассоциируются с повышенной тканевой совместимостью между партнерами. Этот факт вызвал большой интерес, поскольку клинические наблюдения подтверждаются экспериментальными данными, указывающими на отрицательное влияние тканевой совместимости между плодом и материнским организмом, особенно в отношении ограничения размера помета, а также роста плода и плаценты.

Указанные наблюдения заставили переоценить старую проблему о выживании плодов как аллогенных трансплантатов. В настоящее время считается, что для выживания зародыш должен быть аллогенным, что его тканевая несовместимость служит для материнского организма сигналом о необходимости успешной имплантации и что, если этот механизм не срабатывает, может произойти аборт. Эта гипотеза важна и представляет большой научный и практический интерес (S. P. Ford, 1985).

Комплекс антигенов тканевой совместимости у свиней называется комплексом лимфоцитарных антигенов свиней. Данные о числе живых и мертворожденных поросят в пометах позволяют предположить, что этот комплекс может быть также связан с показателями воспроизводства. Неизвестно пока, какие из антигенов МНС присутствуют на эмбрионе свиньи ориентировочно на 12-м дне и на эмбрионе коровы в период, предшествующий имплантации. Нет прямых свидетельств разрушительных иммунореакций против эмбрионов млекопитающих перед прикреплением или имплантацией. Однако у крупного рогатого скота и свиней высокая эмбриональная смертность отмечается в первые 25 дней беременности.

Возможно, иммунные реакции материнского организма оказывают губительное действие в определенных условиях на эмбрионы, способствуя их смертности.

Роль иммунодепрессивных факторов в сохранении жизнеспособности эмбрионов на ранних стадиях. Имеется много предположений о составе иммунодепрессоров, действующих во время беременности. К ним относят стероиды, специфические для беременности гликопротеины, систему полиамин — полиаминоксидаза, фактор раннего периода беременности и др. В какой степени каждый из них или вместе взятые необходимы для поддержания беременности? Неизвестен до конца характер изменений в иммунной системе, которые они вызывают. Однако имеется общая черта для большинства предполагаемых иммунодепрессо-

ров. Если они плацентарного происхождения или возникают в результате стимулов из плаценты, то, вероятно, не играют существенной роли до полного формирования плаценты. Основное внимание уделено нескольким иммунодепрессивным веществам, которые, как известно, выделяются местно перед имплантацией зародышем и(или) маткой во время или около критического периода первоощущения беременности у животных.

Имеются противоречивые данные о пониженной способности материнского организма отторгать чужеродные антигены в период беременности по сравнению с другими периодами жизни. Предполагают, что депрессия иммунной реакции у животных обусловлена главным образом клетками тимуса в конце беременности. Некоторые данные указывают на наличие материнских иммунорегулирующих веществ (макромолекул), которые могут оказывать зародышу местную защиту путем подавления материнского лимфоцитарного цитотоксикоза. У овец, коров и свиней индуцированные прогестероном белки внутриматочной жидкости, взятые у животных этих видов в период, близкий к моменту материнского первоощущения беременности, подавляли в культуральной среде бластогенез тимоцитов, обработанных митогеном и смешанными культурами лимфоцитов. Большое значение имеет тот факт, что быстрое удлинение и увеличение объема эмбрионов происходят именно в это время, что сопровождается тесным прилеганием трофобласта к внутренней оболочке матки, а у свиней и появлением комплекса лимфоцитарных антигенов. Эти изменения вызывают необходимость возрастания потребности в иммунологической защите.

Вероятно, подавление тимоцитов происходит только на уровне матки. При этом тимоциты, извлеченные из маточной жидкости у неосеменных животных, в меньшей степени реагировали на стимуляцию ФГА (фитогемагглютинаина), чем лимфоциты, полученные из крови яремной вены.

Как отмечалось выше, выделение трофобластом и желтым телом эстрогена и прогестерона увеличивает критический период до материнского первоощущения беременности у овец, коров и свиней. Эстроген и прогестерон имеют существенное значение с иммунологической точки зрения для сохранения беременности. Оказывают ли эти гормоны прямое иммунодепрессивное действие или действуют путем индукции специфических иммунодепрессивных маточных белков, пока неизвестно. Обработанные лютогеном лимфоциты внутриматочной жидкости подавляются иммунологически. Присутствие иммунодепрессивных факторов (или фактора) во внутриматочной жидкости необходимо для выживания зародышей (аллогенных трансплантатов) в критический для их жизни период.

ВЕТЕРИНАРНЫЕ ТРЕБОВАНИЯ К ДОНОРАМ, РЕЦИПИЕНТАМ И ЭМБРИОНАМ

Для охраны здоровья доноров и реципиентов, предупреждения распространения заразных болезней, обеспечения нормального воспроизводства сельскохозяйственных животных необходимо строго выполнять ветеринарно-санитарные правила, утвержденные Главным управлением ветеринарии Госагропрома СССР, а также требования Ветеринарного устава СССР.

В соответствии с вышеуказанными ветеринарными правилами и требованиями запрещается доступ на территорию центра людей и транспорта, не связанных с обслуживанием животных, бродячих животных, а также содержание на территории других видов скота и птицы. При входе в центр или пункт должен быть санпропускник, предусматривающий душевые установки и комнаты со шкафами для хранения домашней и специальной одежды.

Въезд транспорта на территорию центра должен осуществляться через дезбарьер, который оборудован в виде бетонной ванны, заполненной 2—3%-ным раствором едкого натра с добавлением 10%-ного раствора поваренной соли. В санпропускнике предусматриваются необходимые условия для полной обработки транспортных средств.

Центры и пункты по пересадке эмбрионов комплектуют только клинически здоровыми донорами (коровами, телками) эмбрионов и реципиентами из хозяйств, благополучных по различным болезням, что должно быть подтверждено ветеринарными свидетельствами или сертификатом.

Коров и телок — доноров и реципиентов — перед вывозом из хозяйств обязательно исследуют на бруцеллез — комплексным методом РА и РСК, розбенгалпробой (РПБ); на туберкулез — двойной туберкулиновой пробой сухим очищенным туберкулином для млекопитающих (ППД); на паратуберкулезный энтерит — методом аллергической внутрикожной реакции паратуберкулином или птичьим туберкулином или серологическими исследованиями крови (СРК), бактериологическими исследованиями фекалий на хламидиозный аборт — РСК с сывороткой крови; на лептоспироз — реакцией микроагглютинации (РМЛ) с сывороткой крови на те сероварианты, которые имеют распространение в данной местности; на лейкоз — гематологическим методом и серологическим исследованием (РИД); на инфекционный ринотрахеит и пустуллезный вульвовагинит (ИРТ-ИПВ) — серологически (реакцией нейтрализации — РН); на вирусную диарею — серологически (РН и РСК); на трихомоноз и кампилобактериоз — методом выделения культур (посевом проб маточной слизи на питательные среды трижды с интервалом в 10 дней).

В центрах и пунктах по пересадке эмбрионов исследования на туберкулез, бруцеллез, лептоспироз, кампилобактериоз, трихомоноз проводят через каждые 6 мес; на лейкоз, ИРТ-ИПВ и паратуберкулезный энтерит — через каждые 12 мес.

Коров-доноров эмбрионов и телок-реципиентов перед отправкой из хозяйств должны исследовать на патологию репродуктивных органов (эндометрит, сальпингит, вульвовагинит, софорит). Животных, имеющих патологию репродуктивных органов, выбраковывают.

Результаты исследований на инфекционные и гинекологические болезни доноров и реципиентов должны быть отражены в ветеринарном свидетельстве. В период 30-дневного профилактического карантина (на карантинном дворе) доноры и реципиенты должны быть исследованы повторно на перечисленные инфекционные и гинекологические болезни.

Перевозят доноров и реципиентов всеми видами транспорта (автомобильный, железнодорожный, водный, авиатранспорт). В пути следования животные не должны иметь контакта с местным скотом. Хозяйство на время перевозки обеспечивает животных необходимым количеством кормов.

За животными, находящимися на карантине, закрепляют отдельный обслуживающий персонал, обеспечивают соответствующий санитарный режим. После проведения диагностических исследований доноров вакцинируют в соответствии с планом противоэпизоотических мероприятий в данной местности. В случае осложнения эпизоотической обстановки в районе, где расположен центр или пункт по трансплантации эмбрионов, вакцинацию реципиентов проводят против той болезни, которая угрожает здоровью животных. Карантинированым животным выделяют очищенные загоны, а в летнее время их выпасают на изолированных участках пастбища. Категорически запрещается использовать животных в качестве доноров и реципиентов в период их карантина.

Из карантина животных переводят в зону А после окончания карантинного срока и получения отрицательных результатов исследования на болезни, на что составляют акт. Перевод коров-доноров и телок-реципиентов, телят-трансплантатов из центра (пункта) по трансплантации эмбрионов в другие хозяйства допускается только после оформления ветеринарного свидетельства согласно требованиям, существующим для реализации племенного скота.

К работе по уходу за животными лица, больные туберкулезом и бруцеллезом, не допускаются. Инвентарь, тару, спецодежду, обувь, предметы ухода за животными маркируют и закрепляют за обслуживающим персоналом.

Склады фуража и другие подсобные помещения центра подвергают генеральной очистке и дезинфицируют 2 раза в год.

Дезинфекцию и дератизацию производственных и складских помещений производят в соответствии с инструкцией, утвержденной Главным управлением ветеринарии Госагропрома СССР.

Доноров эмбрионов и реципиентов содержат в светлых, хорошо вентилируемых помещениях с полами, позволяющими содержать животных в чистоте. Помещения, операционные, предметы ухода за животными и инвентарь периодически обрабатывают дезинфицирующими средствами в соответствии с действующей инструкцией по дезинфекции, дезинсекции, дезинвазии, дератизации. Животных ежедневно чистят. В летнее время при температуре выше 20 °С их купают под душем. За каждым донором и реципиентом закрепляют индивидуальные предметы ухода (щетки, скребницы, суконки, полотенца, ведра и т. д.).

Корма для доноров и реципиентов заготавливают в местности, благополучной по заразным болезням животных. Питательную ценность кормов периодически проверяют в агрохимических лабораториях, а санитарное их состояние — в ветеринарных. Не допускаются в рацион корма, содержащие токсические вещества, вредные примеси, корма, подвергшиеся гниению.

В центрах по трансплантации эмбрионов должен быть составлен календарный план проведения санитарных мероприятий. Ежедекадно проводят тщательную очистку производственных помещений. Очищают от пыли, грязи стены, окна, потолки, полы, кормушки, инвентарь и прочее оборудование. Загрязненные места стен, перегородок и столбов моют горячей водой и дезинфицируют. Один раз в месяц (в определенное число) следует устанавливать ветеринарно-санитарный день. В этот день проводят ветеринарный клинический осмотр доноров и реципиентов; при необходимости делают расчистку и обрезку копыт, взятие проб слизи из влагалища для определения степени микробной контаминации с целью оценки санитарного состояния донора и реципиента; дезинфицируют помещения, инвентарь и предметы ухода за животными.

Ветеринарный осмотр доноров и реципиентов проводят ежедневно в утренние часы. Животных с подозрением на заболевание изолируют в ветлечебницу центра и проводят соответствующее лечение, которое регистрируют в истории болезни.

Результаты исследований и данные о перенесенных болезнях заносят в специальный ветеринарный паспорт. При появлении инфекционных и инвазионных болезней принимают меры, предусмотренные соответствующей инструкцией. Ветеринарные мероприятия проводят в соответствии с планом, утвержденным руководством центра и согласованным с главным ветеринарным врачом района. Всю проводимую ветеринарную работу заносят в специальный журнал. Больных животных выбраковывают при участии представителя госветслужбы.

В лаборатории по получению и подготовке эмбрионов к криоконсервированию или пересадке должны соблюдаться ветеринарно-санитарные правила для предприятий закрытого типа. В лаборатории и боксе, где проводят работу с эмбрионами, и в помещении для криоконсервирования и хранения эмбрионов имеют право находиться только работающие там сотрудники. Ежедневно в помещениях лаборатории, где подготавливают инструменты и оборудование для получения, пересадки и криоконсервирования эмбрионов, проводят влажную уборку.

Операционные должны быть оборудованы бактерицидными лампами марок БУФ-15, БУФ-30, БУФ-60. Количество ламп устанавливают из расчета 2—2,5 Вт на 1 м³ помещения. Лампы в операционной включают за 10—12 ч до начала работы.

Извлечение или пересадку эмбрионов проводят с помощью стерильных катетеров, инструментов и посуды в соответствии с Инструкцией по трансплантации эмбрионов крупного рогатого скота.

Биологически полноценные эмбрионы используют для пересадки или криоконсервирования. Часть среды в объеме 5 см³ после осаждения эмбрионов и подготовки их к замораживанию передают в ОБК (отдел биологического контроля) центра для определения санитарного состояния эмбрионов с указанием в сопроводительном документе даты их получения, клички и номера донора.

Криоконсервирование эмбрионов проводят согласно Инструкции по трансплантации эмбрионов крупного рогатого скота. После пересадки эмбрионов реципиентов содержат отдельной группой, проводят ежедневный контроль за возможным проявлением у них повторной охоты. Через 90 дней после пересадки эмбрионов животных ректально исследуют на наличие стельности. В случае возникновения абортывающих плодов доставляют в ветлабораторию для исследования на инфекционные заболевания. Абортывавших реципиентов изолируют и исследуют на инфекционные и гинекологические заболевания.

Боксы, где проводят работу с эмбрионами, должны быть обработаны бактерицидными лампами в течение 3—4 ч из расчета 2—3 Вт на 1 м³. Помещение бокса не реже одного раза в неделю тщательно убирают; моют пол, стены и протирают мебель 3%-ным раствором перекиси водорода с моющим средством «Прогресс» или «Сульфанол». Для приготовления перекиси водорода с моющими средствами используют любую посуду, в которой разводят пергидроль водой (добавляют в воду пергидроль, а затем моющее средство).

Для приготовления 10 л раствора берут 1200 мл пергидроля, 50 г моющего вещества и 8750 мл воды температурой 40—50 °С. Норма расходования дезинфицирующего раствора 70—100 см³ на 1 м². Раствор готовят непосредственно перед употреблением.

В боксе в день работы с эмбрионами проводят дополнительную обработку столов и оборудования 80%-ным этанолом.

Стерильность посуды, используемой для получения эмбрионов, проверяют путем смывов с внутренней поверхности. Для проверки отбирают один цилиндр, колбу, чашку Петри и т.д. Смыв с внутренней поверхности осуществляют путем обмывания ее тиогликолевой питательной средой или МПБ. Посевы инкубируют в течение 48 ч при температуре 37 °С. При необходимости делают высев на твердую питательную среду (МПА).

Стерильность инструментов (катетеров для вымывания и пересадки эмбрионов) проверяют путем смывов сразу после того, как инструмент вынут из стерилизатора. Смывы с инструментов проводят 2 раза в неделю ватно-марлевыми тампонами или марлевыми салфетками размером 5×5 см, простерилизованными в бумажных пакетах.

Для увлажнения в пробирки с тампонами наливают по 0,2 мл 6,5%-ного солевого бульона. Тампоны увлажняют непосредственно перед взятием смывов. Смывы с катетеров производят по всей поверхности.

Для посева на стерильность используют: тиогликолевую среду для выявления анаэробных и аэробных бактерий или мясопептонный бульон с 0,5% глюкозы для выявления аэробных бактерий, среду Китта — Тароцци с 0,15% агар-агара для выявления анаэробов. Посевы инкубируют при температуре 37 °С в течение 48 ч. В случае пророста необходимо обратить внимание на подготовку посуды, катетеров и других инструментов к стерилизации и на режим стерилизации.

Спецодежду стирают один раз в неделю (при необходимости чаще) с обязательным кипячением и проглаживанием горячим утюгом. Сотрудники должны работать в халатах или специальных костюмах и колпаках (косынках), а в боксе — в стерильных халатах и сменной обуви. Обувь регулярно (по окончании работы в операционной или боксе) моют и обеззараживают 2%-ным раствором хлорамина.

Употребляемые для работы с эмбрионами инструменты, посуда должны быть стерильными, для чего их предварительно моют щетками и ершами в горячем 2%-ном растворе двууглекислой соды, в моющем порошке «Чистоль», тщательно ополаскивают дистиллированной водой, сушат и стерилизуют.

Стерилизация кипячением. Чистые разобранные шприцы, посуду, инструменты обертывают ватой или марлей, помещают в стерилизатор, залитый на 2/3 объема дистиллированной водой, накрывают крышкой, нагревают до кипения и кипятят в течение 15—20 мин. Не снимая крышки стерилизатора, дают остыть содержимому, затем стерильным пинцетом извлекают его и заворачивают в стерильные бумагу или салфетки. В та-

ком виде посуду и инструменты хранят в соответствующем шкафу.

Стерилизация сухим жаром. В сушильный шкаф помещают сухие чистые стеклянные инструменты, посуду, шприцы в разобранном виде. Доводят температуру до 140—180 °С и выдерживают 1—2 ч, затем дают остыть. Запрещается стерилизовать сухим жаром посуду и инструменты из пластмассы и резины.

Стерилизация химическими и физическими средствами. Изделия из пластмассы или резины погружают в 0,5%-ный раствор хлорамина на 24 ч. Наружную поверхность предметов можно стерилизовать, облучая с двух сторон лампами БУВ-30 в течение 40 мин на расстоянии 20 см от источника ультрафиолетовых лучей.

Среды, гормональные и другие препараты, применяемые для получения, криоконсервирования и пересадки эмбрионов, должны быть проверены на стерильность, безвредность, биологическую активность и должны храниться в соответствии с наставлением по их применению. Нестерильные среды, а также препараты с истекшим сроком годности бракуют, на что составляют соответствующий акт.

При необходимости образцы сред и препаратов исследуют в ОБК центра или направляют для исследования во Всесоюзный государственный научно-контрольный институт ветеринарных препаратов Госагропрома СССР (ВГНКИ ветпрепаратов).

Перевозка эмбрионов. Потребность в закупке эмбрионов крупного рогатого скота определяет научно-производственное объединение по племенному делу в животноводстве республики (области, края) на основании двусторонних договоров. Предприятия по трансплантации составляют договор с заинтересованными хозяйствами о плане завоза эмбрионов с указанием родительских пар, их пород, времени поставки эмбрионов с приложением зоотехнических и ветеринарных требований к родительским парам, условий поставки эмбрионов.

Заказчик эмбрионов несет полную ответственность за их сохранение, трансплантацию при полном выполнении поставщиком ветеринарно-санитарных требований. Ввоз эмбрионов на предприятия по трансплантации в другие республики (края, области) допускается только с разрешения Главного управления ветеринарии Госагропрома СССР или Главного управления ветеринарии агропрома союзных республик при наличии ветеринарных свидетельств, выданных ветеринарной службой республики (области, края), на русском языке по установленной форме.

Прием завезенных в республику (край, область) эмбрионов проводят только при наличии племенных зоотехнических и ветеринарных свидетельств. Копия племенного свидетельства

должна быть на каждого быка и корову, от которых получены эмбрионы.

Ветеринарное свидетельство подтверждает, что племенные быки и коровы-доноры, от которых получены эмбрионы, здоровы и происходят с предприятий по трансплантации, которые свободны от заразных болезней, перечисленных выше.

Ветеринарное свидетельство должно содержать следующие сведения: количество эмбрионов, кличка, инвентарный номер быка-производителя и коровы-донора, состав среды для консервирования эмбрионов, даты обследования донора, получения и контроля эмбрионов, результаты исследований, температура хранения эмбрионов, подтверждение проверки перед отправкой санитарного качества эмбрионов и даты выдачи ветеринарного свидетельства.

Ветеринарное свидетельство составляют отдельно на эмбрионы каждой коровы-донора. Допускается в одном ветеринарном свидетельстве указывать несколько партий эмбрионов, заготовленных от одного животного. В таких случаях к ветеринарному свидетельству прикладывается опись, характеризующая санитарное и биологическое качество каждой в отдельности партии эмбрионов.

Ветеринарное свидетельство выдается не более чем за 10 дней до отправки эмбрионов. Если отгрузка эмбрионов за 10 дней не будет осуществлена, то ветеринарное свидетельство теряет свою силу.

Ввоз эмбрионов немедленно прекращается, если в местности, где расположен центр по трансплантации эмбрионов животных, возникли болезни, указанные выше. При этом ветеринарное свидетельство считается недействительным.

Поставляемые эмбрионы транспортируют в контейнерах (сосудах Дьюара), предварительно продезинфицированных согласно временному наставлению, утвержденному Главным управлением ветеринарии Госагропрома СССР, наполненных жидким азотом не менее $\frac{2}{3}$ объема емкости и обеспечивающих ее хранение в замороженном состоянии на все время транспортировки, но не менее 20 дней.

ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ РАБОТЫ ПЕРСОНАЛА

Работа по трансплантации эмбрионов требует выполнения существующих правил безопасности при обращении с животными, электроприборами, автоклавами, при использовании жидкого азота, биологически активных препаратов и других веществ.

К работе допускаются лица, имеющие соответствующую квалификацию и знающие технику безопасности. Все работающие по трансплантации 2 раза в год проходят инструктаж, а вновь поступившие лица допускаются к работе после вводного инст-

руктажа по технике безопасности. Сотрудники и рабочие центра (пункта) обязаны: полностью соблюдать требования по технике безопасности, производственной санитарии и противопожарной охране, предусмотренные соответствующими правилами и инструкциями; пользоваться выданной спецодеждой и предохранительными приспособлениями; содержать в порядке и чистоте рабочее место, соблюдать чистоту в помещении и на территории объекта; соблюдать правила хранения и использования токсических, биологически активных веществ и других препаратов; сообщать в соответствующие инстанции о неисправностях электрооборудования, канализации, водопровода и предохранительных приспособлений.

Запрещается загромождать проходы к средствам противопожарной охраны, водопроводным кранам, аптечкам; пользоваться неисправными электроприборами и оборудованием, грязной и битой посудой; проводить опыты и работы с агрессивными и токсическими веществами одному человеку; пользоваться ядовитыми и агрессивными веществами в больших количествах (более потребности для работы в течение одного дня); принимать пищу и курить в помещении лаборатории.

Для предупреждения производственного травматизма и возможного травмирования животных необходимо на территории центра иметь выровненные, освещенные дороги, проезды и прогоны, огражденные колодцы, жижеборники, ямы, санузлы и др.

В животноводческих помещениях оборудование для раздачи кормов, водоснабжения и уборки навоза, приточно-вытяжная вентиляция должны соответствовать нормам технического и санитарного проектирования. Электросветильники должны быть защищены герметическими стеклянными плафонами. Окна и светильники следует чистить не реже 2 раз в месяц. На случай отключения электроэнергии в помещении должно быть аварийное освещение (фонари «летучая мышь» или электрические).

Двери и ворота должны легко раскрываться, высота порогов не должна превышать 10 см, пол не должен быть грязным и обледеневшим. Проходы, ворота, столбы, кормушки и прочее оборудование не должны иметь острых углов, торчащих гвоздей, крючков и др.

При обращении с животными нужно обходиться уверенно и спокойно, не выпускать и не впускать их во время работы навозоуборочного транспортера и при выполнении других производственных процессов, не стоять в воротах или на проходе животных, не допускать к тяжелой работе подростков до 18-летнего возраста и беременных женщин.

Все работы на животных проводить в специальных станках или операционных столах с соблюдением соответствующих пра-

вил фиксации головы и конечностей. Категорически запрещается дразнить и бить животных.

Операции и другие манипуляции на животных, связанные с трансплантацией эмбрионов, проводят в присутствии двух помощников, один из которых обязан фиксировать и успокаивать животное.

При перегонах и транспортировке животных разделяют по возрасту и живой массе, прогон осуществляют по заранее предусмотренному и безопасному для движения скота маршруту.

Животных в транспортные средства погружают при хорошем освещении по широким трапам, имеющим боковые перила. Для транспортировки используют специальные автомашины-скотовозы. В случаях перевозки скота на обычной грузовой автомашине борта ее должны иметь дополнительную решетку высотой не менее 100—110 см. Перед погрузкой прогоны, трап, кузов осматривают, очищают, удаляют или устраняют источники возможного травмирования.

Животных размещают головой по направлению движения машины и привязывают. На дне кузова разбрасывают подстилку.

При перегонах и транспортировке запрещается: оставлять животных на дороге без надзора; лицам находиться в кузове автомашины со скотом; избегать резкого изменения скорости и направления движения машины.

При работе персонала с жидким азотом и сосудами Дьюара возможны обморожения открытых участков тела при контактах с охлажденными поверхностями или жидким азотом; головокружение, обморок или удушье при испарении большой массы жидкого азота, из-за снижения концентрации кислорода в воздухе; взрыв сосуда Дьюара вследствие внезапной потери вакуума, быстрой десорбции газов при отоплении сосуда, из-за испарения жидкого азота при герметично закрытой горловине; конденсация на охлажденных жидким азотом поверхностях кислорода воздуха и возгорание при контакте с горючими материалами.

В связи с этим обращаться с сосудами Дьюара необходимо осторожно, в строгом соответствии с инструкцией по их эксплуатации.

Эксплуатировать или отоплять в рабочих помещениях неисправные сосуды Дьюара категорически запрещается. Потерявший вакуум сосуд Дьюара освобождают от содержимого (эмбрионы, жидкий азот), а затем ставят на отопление в течение трех суток в свободное от людей помещение.

Закрывают сосуды Дьюара только предназначенными для них крышками. Запрещается плотно закрывать горловину сосуда; испарение части жидкого азота предотвращает попадание

в сосуд кислорода из наружного воздуха. Повышение давления создает опасность повреждения сосуда.

При транспортировке сосуд Дьюара и находящиеся рядом предметы надежно закрепляют во избежание повреждений или утечки жидкого азота.

Заливать жидкий азот в сосуд Дьюара следует через гибкий металлический рукав диаметром 18 мм, опущенный в сосуд до дна, под давлением не более 0,5 атм. Из другого сосуда Дьюара заливку ведут через широкую металлическую воронку, избегая утечки жидкости.

Запрещается заполнять сосуды Дьюара жидким азотом одному человеку. Особую осторожность следует соблюдать во время заполнения теплых сосудов Дьюара. Пинцет и другие предметы вводят в жидкий азот постепенно, во избежание разбрызгивания. Хранят эмбрионы в полностью заполненных сосудах Дьюара, поэтому их периодически дозаправляют.

Жидкий азот содержит в виде примеси кислород. Поскольку жидкий азот более летучий компонент, то в процессе испарения содержимое сосуда Дьюара постепенно обогащается кислородом. Содержание жидкого кислорода в смеси свыше 15% не допускается, так как такая смесь может вызвать воспламенение при контакте с органическими веществами.

Содержание кислорода контролируют газоанализатором типа ГХП-3. При отсутствии газоанализатора через каждые 12 дозаправок жидкость из сосуда Дьюара сливают и сосуд заполняют свежим жидким азотом. Слив производится на специальной открытой площадке в безопасном месте, в отдалении от органических веществ (дерево, бумага, асфальт и т. п.).

Для предотвращения загрязнения сосудов Дьюара гибкие металлические рукава и воронки хранят в чехлах, а сосуды время от времени промывают для удаления «ила» или твердых частиц. Промывку проводят только в центрах или пунктах трансплантации эмбрионов. Для этого содержимое сосуда Дьюара сливают, промывают его чистым жидким азотом и ставят на обогрев. Через трое суток промывают теплым (30 °С) водным раствором моющего средства ОП-7, а затем ополаскивают горячей водой температурой не выше 70 °С. После обезвоживания, которое должно быть проведено строго по инструкции, сосуд Дьюара готов к работе. Не допускается нагревание сосуда, поскольку это может привести к взрыву.

Персонал, работающий с сосудах Дьюара и жидким азотом, обязан надевать защитные щитки (очки), одежду без карманов, брюки без манжет, закрывающие верх обуви, свободные рукавицы.

Помещение, где производится работа с жидким азотом или хранятся сосуды Дьюара, должно быть оборудовано принудительной приточно-вытяжной вентиляцией, обеспечивающей со-

держание кислорода в воздухе не менее 19%. Снижение концентрации кислорода в воздухе до величины менее 16% приводит к головокружению, обморокам или удушью без каких-либо предварительных симптомов. При естественной вентиляции работа с жидким азотом допускается в помещении, объем которого в 7000 раз больше объема находящегося там жидкого азота.

При попадании жидкого азота на кожу пораженный участок следует немедленно обильно обмыть водой.

При головокружении, обмороке, удушье пострадавшего нужно немедленно вынести на свежий воздух, в необходимых случаях провести искусственное дыхание. Следует помнить, что фильтрующий противогаз не предохраняет от кислородной недостаточности.

Учет и отчетность. Метод трансплантации эмбрионов требует четкой организации и последовательности работ, пунктуального и добросовестного оформления документации. Правильный учет на всех этапах технологии трансплантации эмбрионов необходим для постоянного контроля и анализа результатов применения отдельных схем, режимов и методов в работе, что позволит повысить эффективность применения этого метода в практике животноводства.

На каждого животного-донора и реципиента, поступающего в центр или пункт по трансплантации эмбрионов, заполняется соответственно оформленная карточка племенной коровы, телки (форма 2 МОЛ). К карточке прилагают пояснительную записку или зоотехническо-гинекологическую карточку с характеристикой воспроизводительной способности животного и других показателей, перечисленных в требованиях при отборе коров-доноров. На выбракованных из молочного стада коров указывают причину выбраковки.

На быков-производителей, сперму которых используют для осеменения коров-доноров, заполняется карточка племенного быка (форма 1 МОЛ) или племенное свидетельство.

В карточке племенного учета отмечают тип крови животного (для генетического контроля происхождения потомства).

На каждого теленка, полученного методом трансплантации эмбрионов, в день его рождения составляют акт на оприходование приплода (форма № 95 Сельхозучета), ведется журнал регистрации приплода и выращивания молодняка крупного рогатого скота (форма 4 МОЛ).

Генетический контроль происхождения телят-трансплантатов регистрируют в журнале на основании экспертизы систем групп крови родителей и потомства в возрасте 1—1,5 мес.

На каждого племенного быка и телочку заполняют соответственно карточки племенного учета (формы 1 МОЛ и 2 МОЛ).

Оперативный учет работ, непосредственно связанных с технологией трансплантации эмбрионов, ведут с помощью специальных карточек для животных-доноров, реципиентов и телят-трансплантатов. Лицевую сторону карточки донора и реципиента заполняют при отборе животных в хозяйстве на основании данных первичного зоотехнического племенного учета, клинической и гинекологической диспансеризации, а также непосредственного осмотра и ректального контроля родополовых органов. Обратная сторона карточки предназначена для учета и контроля исполнения каждого элемента технологии трансплантации эмбрионов.

Одновременно центры (пункты) по трансплантации эмбрионов ведут учет и регистрацию работ в следующих рабочих журналах:

- «Учет поступления и использования доноров»;
- «Гормональное вызывание суперовуляции доноров»;
- «Извлечение, оценки качества и использования эмбрионов»;
- «Криоконсервирование и использование эмбрионов»;
- «Учет результатов пересадки эмбрионов».

Всю информацию в процессе работы сразу заносят в карточку или журнал с указанием даты и непосредственного исполнителя работ.

По результатам работы за каждый месяц заведующий (руководитель) пункта по трансплантации эмбрионов составляет отчет, в который включает итоговые показатели работы по трансплантации эмбрионов, опись и карточки на каждого использованного в работе донора, реципиента и полученного методом пересадки эмбрионов теленка, ведомость или копию акта результатов ректального исследования реципиентов на стельность, пояснительную записку с дополнительными сведениями о животных-донорах, реципиентах и телятах-трансплантатах для внесения их в карточки оперативного учета (перемещение и использование животных, подтверждение достоверности происхождения и др.).

По итогам работы за год составляют годовой отчет с анализом деятельности пункта по основным элементам технологии и экономической эффективности применения метода в производстве.

Месячные отчеты представляют в центр по трансплантации эмбрионов (в зоне деятельности пункта) и в вышестоящую организацию (РАПО, комитет Агропрома или Госплемобъединение) не позже первого числа последующего месяца, а годовой — до 5 января.

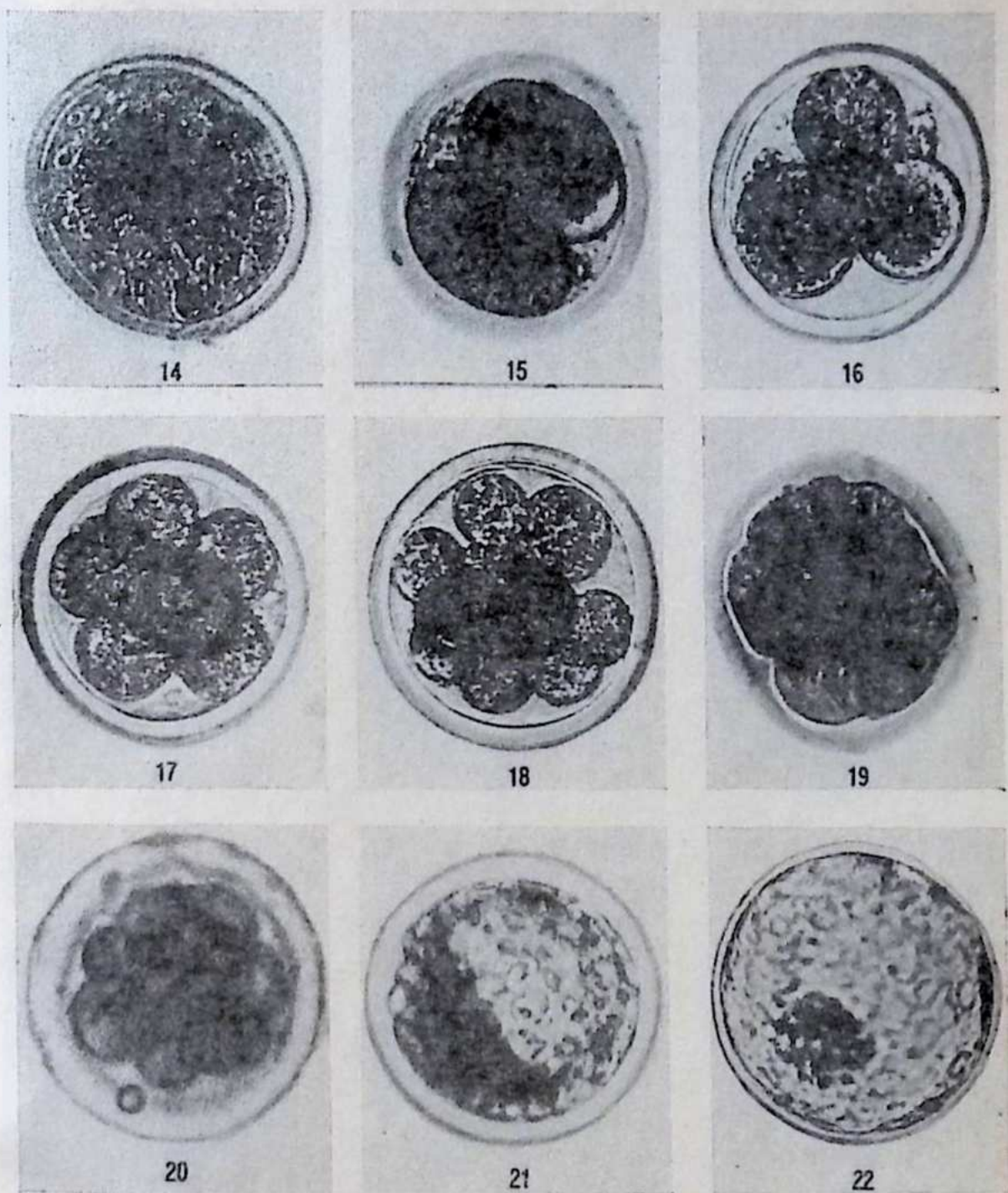


Рис. 14. Неоплодотворенная яйцеклетка крупного рогатого скота

Рис. 15. Зигота двухбластомерная

Рис. 16. Зигота трехбластомерная

Рис. 17. Зигота шестибластомерная

Рис. 18. Ранняя морула (10 бластомеров)

Рис. 19. Ранняя морула (16 бластомеров)

Рис. 20. Ранняя морула (32—64 бластомера)

Рис. 21. Бластоциста ранняя — начало образования полости

Рис. 22. Бластоциста поздняя — хорошо выражена

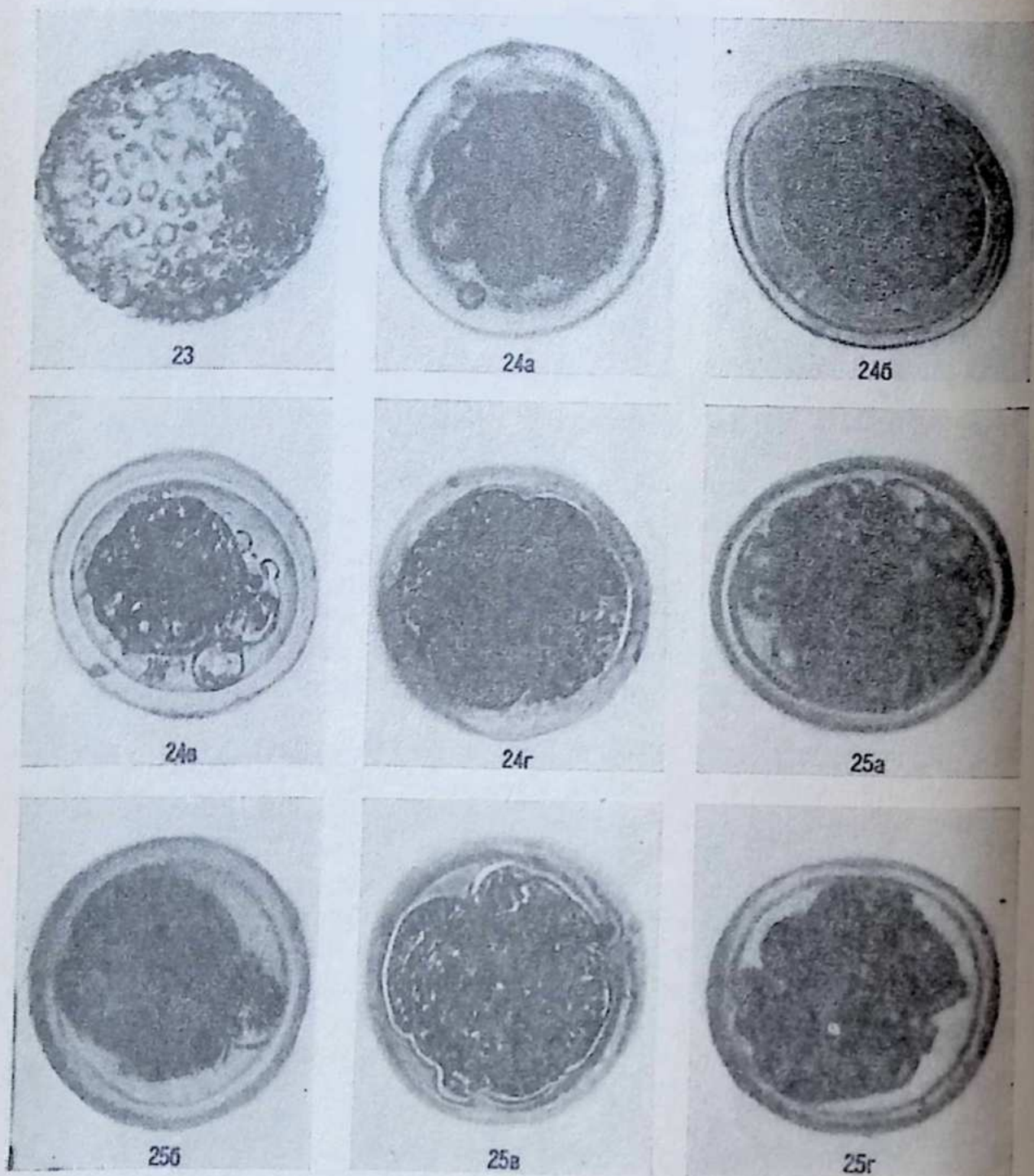


Рис. 23. Блaстоциста без зоны пеллюцида (9-й день)

Рис. 24. Морула ранняя:

a — отличная (Мо ++); *б* — хорошая (Мо I+); *в* — удовлетворительная (Мо I+—); *г* — дегенерировавшая (Мо I—)

Рис. 25. Морула поздняя:

a — отличная (Мо II ++); *б* — хорошая (Мо II +); *в* — удовлетворительная (Мо II +—); *г* — дегенерировавшая (Мо II —)

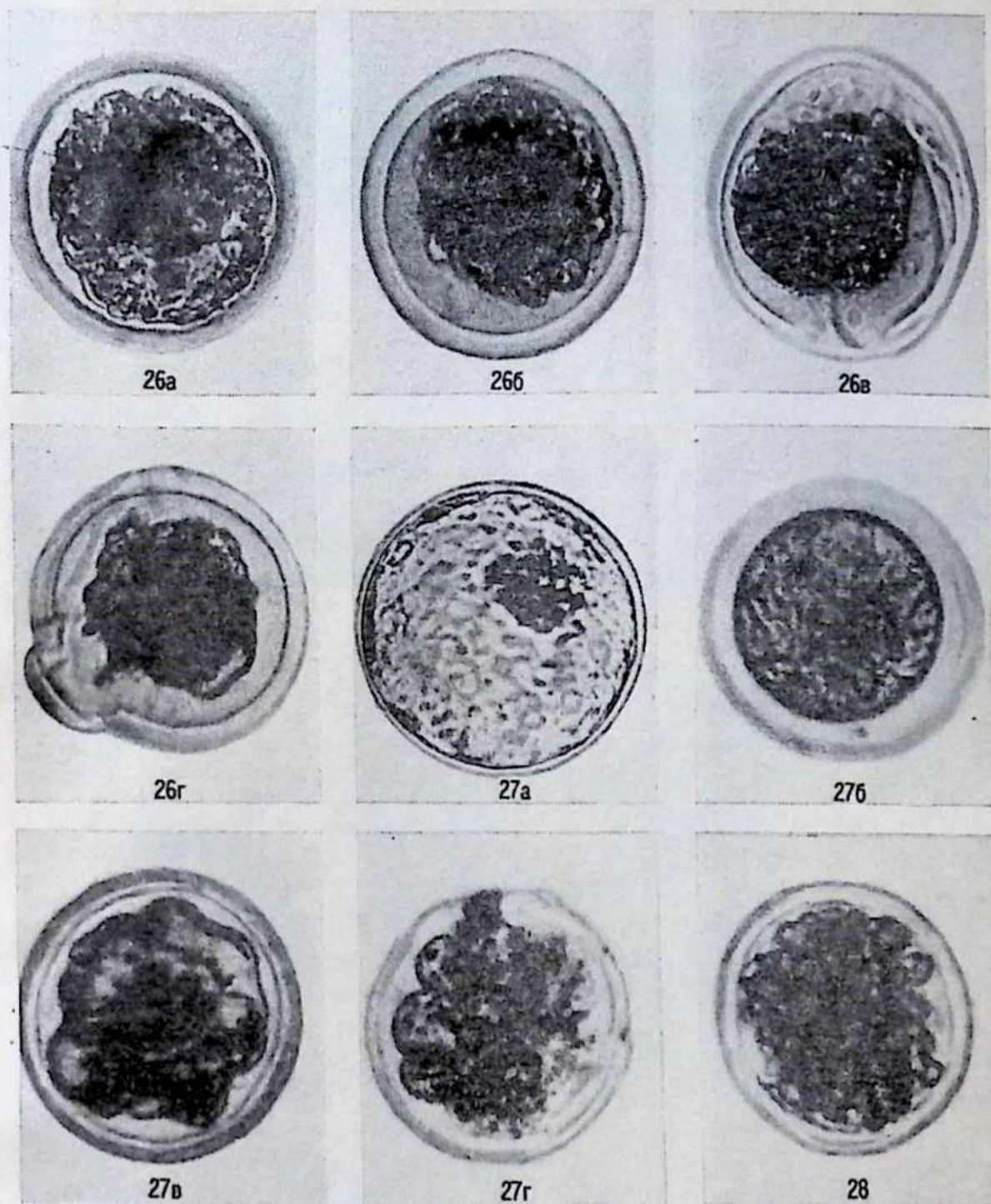


Рис. 26. Бластоциста ранняя:

а — отличная (Бл I ++); *б* — хорошая (Бл I +); *в* — удовлетворительная (Бл I +—);
г — дегенерированная (Бл I —)

Рис. 27. Бластоциста поздняя:

а — отличная (Бл II ++); *б* — хорошая (Бл II +); *в* — удовлетворительная (Бл II +2);
г — дегенерированная (Бл II —)

Рис. 28. Зигота двухбластомерная — видно разрушение клеточного комплекса

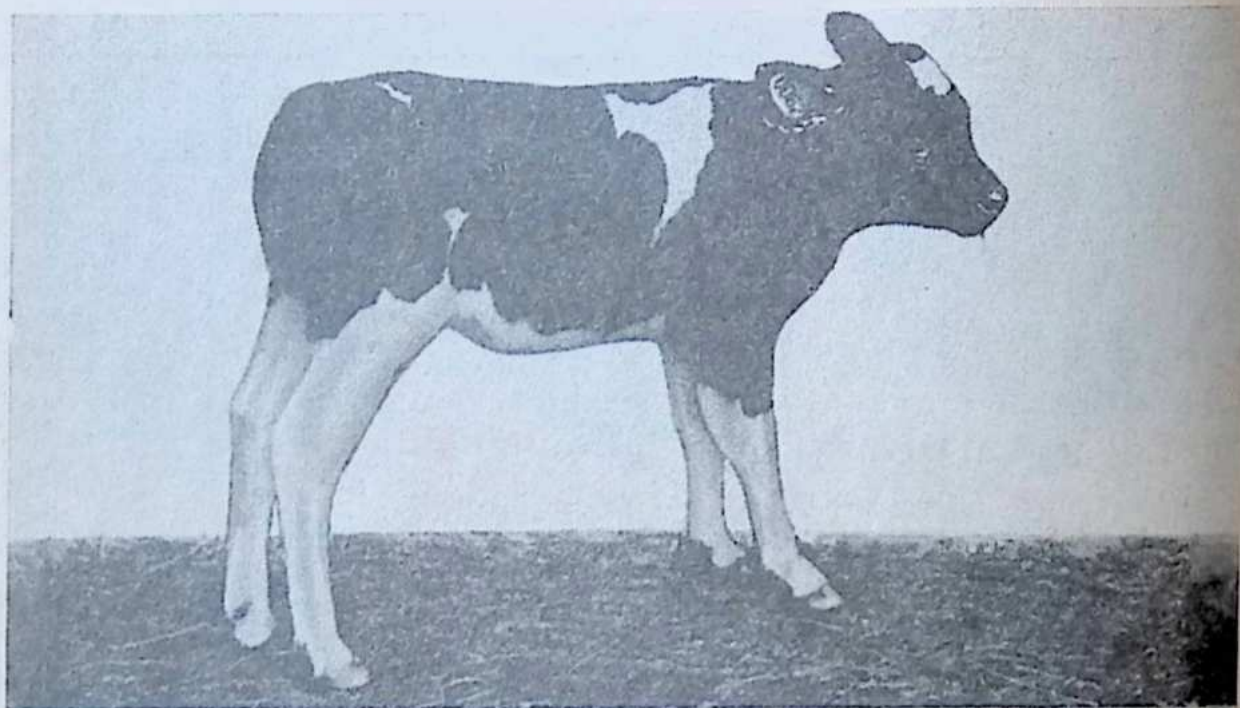


Рис. 42. Первый бычок в стране после хирургической пересадки замороженно-оттаянного эмбриона (*вверху*); монозиготная двойня (две телочки) от нехирургической пересадки замороженно-оттаянного 7-суточного эмбриона (*внизу*)

Введение	3
РАЗВИТИЕ МЕТОДА ТРАНСПЛАНТАЦИИ ЭМБРИОНОВ . . .	5
Современный уровень использования трансплантации эмбрионов крупного рогатого скота	5
Значение трансплантации в селекции крупного рогатого скота . .	9
БИОТЕХНОЛОГИЯ В ЖИВОТНОВОДСТВЕ	13
Клеточная инженерия	14
Метод агрегации ранних эмбрионов	16
Определение пола эмбрионов	17
Микроманипуляции с ядром	22
Межвидовая трансплантация	22
Партеногенез	23
Культивирование ооцитов	32
Генная инженерия сельскохозяйственных животных	36
Использование биотехнологии в селекции животных	39
Развитие методов биотехнологии животных	42
Пересадка ядер яйцеклеток земноводных	43
Пересадка ядер яйцеклеток млекопитающих	45
Основные методы генной инженерии животных	47
Методы введения генов	52
Перенос генов путем инъекции в пронуклеус зиготы	58
Определение трансгенных мышей	64
Использование интродукции и регулирования клонированных генов для совершенствования сельскохозяйственных животных . .	64
Пересадка генов и получение трансгенных млекопитающих . .	66
Механизмы генетического регулирования	68
Генно-инженерные манипуляции с гормоном роста	70
Генетическая регуляция процессов роста мышечной ткани . .	73
Генная инженерия и воспроизводство животных	75
Картирование генов домашних животных	81
Методы картирования генов	82
Применение генной инженерии в ветеринарии	84
Генная инженерия в селекции симбиотических микроорганизмов сельскохозяйственных животных	85
ТЕОРИЯ И ПРАКТИКА ТРАНСПЛАНТАЦИИ РАННИХ ЭМБРИОНОВ	88
Теоретические и практические основы гормонального вызывания суперовуляции у крупного рогатого скота и овец	89
Внутрияичниковые процессы регулирования полового цикла . .	100
Отбор животных в программе селекции молочного скота	105
Гормоны для вызывания суперовуляции у животных	111
Методы вызывания суперовуляции	117
Синхронизация охоты у доноров и реципиентов	121
Повторные гормональные обработки коров-доноров	124

Осеменение коров-доноров	125
Гормональное вызывание суперовуляции у овец	127
Факторы, влияющие на эффективность гормонального вызывания суперовуляции и оплодотворяемость яйцеклеток	129
Получение эмбрионов у коров, овец и свиней	131
Хирургические методы извлечения эмбрионов	132
Нехирургическая техника получения эмбрионов у крупного рогатого скота	137
Оценка качества эмбрионов, кратковременное их хранение и культивирование	145
Помещение и оборудование для работы с эмбрионами	148
Приготовление среды Дюльбекко	150
Приготовление сыворотки крови овцы	151
Морфологическая оценка качества эмбрионов	152
Оценка эмбрионов с использованием флуоресцентных красителей	159
Оценка эмбрионов методом культивирования	160
Пересадка эмбрионов животным-реципиентам	162
Хирургические методы пересадки эмбрионов	162
Нехирургический метод пересадки эмбрионов	165
Получение двоен методом пересадки эмбрионов	173
Гормональное взаимодействие при возникновении беременности	176
Эндокринные аспекты механизма материнского опознания беременности в связи с приживляемостью эмбрионов при трансплантации	184
Криоконсервирование эмбрионов	190
Механизм процесса замораживания эмбрионов	191
Механизм процесса оттаивания эмбрионов	195
Криопротекторы при замораживании эмбрионов	196
Подготовка эмбрионов к замораживанию	204
Криотехника для глубокого замораживания	206
Режимы замораживания и оттаивания эмбрионов	209
Пересадка замороженно-оттаянных эмбрионов	222
Дальняя транспортировка замороженных эмбрионов	233
Трансплантация и хранение эмбрионов свиней, лошадей	235
Теоретические основы и методы микроманипуляции с эмбрионами животных	243
Методы определения пола эмбрионов	256
Основное оборудование, материалы и реактивы, необходимые для цитогенетического определения пола эмбрионов крупного рогатого скота	258
Факторы, влияющие на выживаемость эмбрионов и их половин	260
Влияние числа пересаженных эмбриональных клеток на их приживляемость	262
Влияние синхронности эстральных циклов на жизнеспособность и развитие эмбрионов	263
Механизм гормональной регуляции беременности	264
Хромосомные аномалии	269
Приобретенные и присущие эмбриону факторы	273
Сосудистый и иммунологический факторы поддержания беременности у животных	276
Кровеносная система как посредник функции яичников	276
Роль зародышей в изменении сократимости маточных и яичниковых артерий	278
Сосудорасширяющие факторы, обусловленные наличием зародыша	281
Иммунологические аспекты взаимодействия между трансплантатом и организмом животного	282
Ветеринарные требования к донорам, реципиентам и эмбрионам	285
Техника безопасности работы персонала	291

Эрнст Лев Константинович, Сергеев Николай Иванович

**ТРАНСПЛАНТАЦИЯ ЭМБРИОНОВ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ**

Зав. редакцией *В. И. Орлов*
Художественный редактор *М. Д. Северина*
Технический редактор *В. А. Зорина*
Корректор *А. П. Шахрова*

ИБ № 6095

Сдано в набор 12.09.88. Подписано к печати 21.10.88. Формат 60×88¹/₁₆.
Бумага кн.-журнальная. Гарнитура Литературная. Печать офсетная. Усл.
печ. л. 18,62. Усл. кр.-отт 18,62. Уч.-изд. л. 20,43. Изд. № 237. Тираж 9500 экз.
Заказ № 508. Цена 1 руб.

Ордена Трудового Красного Знамени ВО «Агропромиздат», 107807, ГСП-6,
Москва, Б-78, ул. Садовая-Спаская, 18.

Московская типография № 11 ~~при~~ при Государственном
комитете ~~по~~ по делам издательств, полиграфии и книжной торговли.
113105, Москва, Нагатинская ул., д. 1.

ВО «АГРОПРОМИЗДАТ» В 1989 г.

выпустит следующие книги:

Завертяев Б. П. Биотехнология в воспроизводстве и селекции крупного рогатого скота. — Л.: Агропромиздат. — 18 л., 4 р.

Приведены данные о высокой потенциальной плодовитости крупного рогатого скота, показаны причины ее низкой реализации при традиционных способах воспроизводства. Указаны перспективные направления развития новых методов биотехнологии: получение монозиготных двоен, вегетативных гибридов; определение пола эмбрионов; клонирование животных; пересадка генов. Рассмотрены современные методы получения, оценки и хранения спермы, синхронизации половой охоты, регулирования отелов, трансплантации эмбрионов.

Для научных работников — генетиков и селекционеров.

Генетические основы селекции животных: Учеб. пособие для вузов/Петухов В. Л., Гудилин И. И., Голубев А. К. и др.; Под ред. Петухова В. Л., Гудилина И. И. — М.: Агропромиздат. — 28 л., 1 р. 40 к.

Изложены современные данные о генетических основах эволюции животных, их domestикации. Говорится о генетической инженерии, трансплантации эмбрионов клонировании животных, сохранении и использовании генофондов. Освещены основы селекции молочного и мясного скота, свиней, овец, лошадей и птицы, создание и совершенствование пород. Описаны генные, хромосомные болезни и методы селекции животных на резистентность к болезням, пригодность к условиям промышленной технологии. Рассмотрены проблемы крупномасштабной селекции.

Для студентов по специальности «Зоотехния».

1005.

