

НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
КАФЕДРА РОЗВЕДЕННЯ ТА ГЕНЕТИКИ ТВАРИН
ім. М.А. КРАВЧЕНКА

БІОТЕХНОЛОГІЯ

*Методичні вказівки до виконання лабораторної роботи з розділу
біотехнології “Пошук та оцінка ембріонів корів-донорів”*
Напрямок підготовки 6.130200 – технологія виробництва і переробки
продукції тваринництва

Київ 2008

УДК 636.082.4: 591.044

Викладено основні моменти підготовки обладнання, проведення пошуку ембріонів різних стадій розвитку у середовищі, вимитому з матки корів-донорів та оцінки їх придатності до пересадження і замороження.

Розраховані для студентів факультету технології виробництва і переробки продукції тваринництва.

Рекомендовано навчально-методичною радою факультету технології виробництва і переробки продукції тваринництва Національного аграрного університету

Укладачі: В.І.Шеремета, Журавель М.П., Себа М.В.

Рецензенти: завідувач кафедрою технології, економіки та менеджменту у тваринництві професор Ю.В.Засуха;
завідувач кафедрою конярства, доцент І.І.Глушак

Біотехнологія відтворення сільськогосподарських тварин

Методичні вказівки до виконання лабораторної роботи з розділу дисципліни “Біотехнологія “ Пошук та оцінка ембріонів корів-донорів”

Напрямок підготовки 6.130200 – технологія виробництва і переробки продукції тваринництва

Укладачі: Шеремета Віктор Іванович, Журавель Михайло Петрович, Себа Микола Васильович.

Відповідальний за редактування та випуск професор В.І.Шеремета

Зав. видавничим центром А.П.Колесніков

Редактор З.І.Маренець

Підписано до друку Формат 60x84 1/16

Ум. друк. арк..1.0.

Обл.-вид.арк..0.9. Тираж 100 пр.

Видавничий центр НАУ.

03041, Київ, вул. Героїв Оборони 15.

Вступ

Біотехнологія – це інтегроване використання фундаментальних досліджень у біології та біоінженерії для промислової реалізації потенційних можливостей біологічних об'єктів з метою задоволення потреб людства. За значенням для людства сучасна біотехнологія стоїть у одному ряду з такими досягненнями науки як розщеплення атома, подолання земного тяжіння і створення приладів електроніки.

Термін „біологічний об'єкт” охоплює всі види мікроорганізмів, вірусів, клітини й тканини людини тварини і рослин, їхні складові до молекулярного рівня, а також позаклітинні речовини, які використовуються в біологічних процесах.

Втручання людини в процес розмноження тварин призвело до виникнення ряду методів, що були названі біотехнологічними методами відтворення. Запровадження в медичній практиці та сільському господарстві біотехнологічних методів (штучного осіменіння, трансплантації ембріонів, довготривале збереження сперми та зародків, клонування, запліднення яйцеклітин і культивування *in vitro*, отримання трансгенних тварин та інших) дозволяє вирішити ряд проблем пов'язаних із подоланням неплідності, профілактикою захворювань, збереження видів і порід, селекційним процесом, отримання тварин з новими продуктивними властивостями та підвищення продуктивності сільськогосподарських тварин. Найбільш практичного значення в Україні в галузі тваринництва набули штучне осіменіння та трансплантація ембріонів.

Сучасна селекційна робота з виведення нових порід великої рогатої худоби та удосконалення існуючих неможлива без використання біотехнологічних методів відтворення, зокрема трансплантації ембріонів, який забезпечує отримання від високопродуктивних корів значної кількості нащадків, у тому числі бугайців для племінної оцінки з метою поліпшення генетичної структури поголів'я, а також прискорення створення племінних репродукторів.

Трансплантація ембріонів - один із найбільш широко впроваджених у практику тваринництва методів біотехнології відтворення, який включає два способи отримання та пересадки ембріонів - хірургічний та нехірургічний. Після організації в 1974 році Міжнародного товариства з трансплантації ембріонів розпочалися інтенсивні дослідження з удосконалення нехірургічного методу з метою підвищення його ефективності. Проведені дослідження показали, що нащадки, отримані із використанням трансплантації

ембріонів, більш життєздатні, що пов'язують із дією добору на рівні ембріонів.

Метод трансплантації ембріонів, суть якого полягає в пересадженні їх доімплантаційних стадій розвитку (морул та бластоцист) від корови-донора телиці-реципієнту, в організмі якої відбувається його ріст і розвиток до народження, складається з важливих взаємозв'язаних ланок біотехнологічного процесу, а саме: стимуляції суперовуляції у донорів, їх осіменіння, нехірургічного вимивання, пошуку, оцінки життєздатності ембріонів та підготовки реципієнтів і пересадження їм зародків. Кожна із цих ланок ще остаточно не досліджена і їх методики удосконалюються. Завдяки розробці методик замороження ембріонів та довготривалого зберігання їх у рідкому азоті, метод трансплантації можна умовно розділити на два етапи: перший закінчується замороженням ембріонів та їх реалізацією; другий - включає добір реципієнтів, техніку підготовки та трансплантацію зародків. Ці етапи набули самостійного генетико-селекційного та економічного значення в тваринницькій галузі.

Однією із важливих ланок трансплантації ембріонів є пошук та оцінка ембріонів після нехірургічного вимивання їх у корів-донорів. Нині розроблені середовища та велика кількість інструментів для його здійснення. Освоєння цієї ланки методу трансплантації потребує знання методичних особливостей підготовки обладнання, середовищ, донорів, техніки постановки катетерів, оцінки результатів роботи.

ПОЗНАКИ ТА СКОРОЧЕННЯ

♀ – донор (корова або телиця)

♂ – бугай плідник

Бл – бластомер

ПО – прозора оболонка

ВКМ – внутрішня клітинна маса

ПП – перивітеліновий простір

ДСЦ – день статевого циклу

КЯ – код класу якості

1 Обладнання та середовища, необхідні для проведення пошуку та оцінки ембріонів

Пошук та оцінку ембріонів проводять у спеціально обладнаній кімнаті, яку називають боксом. Бокс повинен бути обладнаний бактерицидними лампами, приладами для нагрівання повітря (температура приміщення повинна бути в межах 22...25 °С), шафами для зберігання інструментів, закритим боксом з бактерицидною лампою (стерилізація інструментів), лабораторними столами, покритими склом, мікроскопічними біокулярними лупами, що забезпечують збільшення в 14 – 100 разів (МБС- 9 або МБС -10).

Для проведення пошуку ембріонів необхідні наступне обладнання та середовища: одноразові стерильні шприци на 1, 5, 10, 20, 50–60 мл; стерильні одноразові чашки Петрі діаметром 20, 40, 90 мм; сифон, прилад для переносу ембріонів, спиртові тампони, спиртівка, пайєти, скляні капіляри, мембранні фільтри з діаметром пор 0,2 мкм, прилади для замороження ембріонів, циліндри мірні місткістю 500 см³ повинні відповідати вимогам ГОСТ 1770 або флакони місткістю 450 - 500 см³, сосуди Дьюара різної ємкості, стерильні халат та шапочка, фосфатно-буферне середовище Дюльбекко, фетальна (ембріональна) сироватка або сироватковий альбумін бугая, трипсин (розчин з масовою часткою 0,25 %), антибіотики (гентаміцин, ампіцилін) спирт ректифікат 70⁰ та 96⁰, середовище для культивування, перекис водню.

2 Підготовка обладнання та середовищ

Перед проведенням пошуку ембріонів у вимивному середовищі необхідно вимити підлогу в боксі, витерти вологою ганчіркою пилюку. Потім необхідно включити бактерицидні лампи на одну годину. Краще це зробити звечора і лампи включити на всю ніч. Ранком вимкнути лампи і 45- 60 хвилин не заходити до боксу, час який необхідний для (розкладання) зникнення озону.

Біотехнолог одягає стерильний халат і шапочку. Потім обробляє 70⁰ спиртом руки і готує середовища для вимивання та культивування. Протирає ватним тампоном змоченим у 96⁰ спирті гумовий корок флаконів з Дюльбекко і ампіциліном.

2.1 Методика приготування середовища для вимивання та культивування

1. У флакон з ампіцеліном (500 тис.ОД) додати 10 мл середовища Дюльбекко. Після повного розчинення антибіотику відбирають із флакона 1мл розчину і додають у флакон (500 мл) із середовищем Дюльбекко для вимивання ембріонів. При цьому виходить концентрація антибіотику 100 ОД/мл середовища.

2.3 ампули з 4%-м розчином гентаміцину відбирають 0,15 мл і додають у той же флакон із середовищем Дюльбекко, одержуючи при цьому концентрацію 12 мкг/мл.

Комплекс антибіотиків гентаміцин-ампіцилін має широкий спектр антимікробної дії. Крім цього, він не шкодить розвитку ембріонів при культивуванні *in vitro* [1].

3. Перед роботою з вимивання ембріонів у корів-донорів до розчину Дюльбекко з антибіотиками додають 2% (10 мл на 500 мл) фетальної сироватки великої рогатої худоби. Інколи через те, що наявність сироватки в вимивному середовищі зумовлює утворення піни, що затрудняє пошук ембріонів, її не добавляють у середовище для вимивання. У такому випадку необхідно як можна швидше вилучити ембріони з такого середовища.

4. Для приготування середовища для культивування до розчину Дюльбекко з антибіотиками додають 15-20% (10 мл на 50 мл) фетальної сироватки великої рогатої худоби або сироватковий альбумін бугая із розрахунку 4 г/л середовища.

3 Проведення пошуку ембріонів у середовищі після вимивання

Метод трансплантації є інструментом інтенсифікації селекційної роботи, особливо, в скотарстві. Тому слід твердо пам'ятати, що від кожного донора ембріони повинні знаходитися в окремих чашках Петрі, на кришках яких необхідно написати його індивідуальний номер. Ембріони для пересаджування мають бути отримані від клінічно здорових корів-донорів, яких осіменяли спермою плідників-поліпшувачів згідно з ДСТУ 3535.

За умови вимивання ембріонів у стерильний, теплий флакон, на ньому також пишуть індивідуальний номер донора та ріг матки з якого їх вимивали. Після передачі флакону з вимивним середовищем до боксу, проводять седиментацію (осідання) ембріонів, для чого його ставлять на 30 хвилин на пінопласт. Потім за допомогою сифона

верхні шари середовища відсмоктують, залишаючи в флаконі 60– 100 мл рідини, яку обережно круговими рухами перемішавши, виливають в 2-3 чашки Петрі. Після чого флакон промивають вимивним середовищем (10...20 мл), яке теж виливають у чашки. Попередньо у чашок необхідно розліняти дно, що сприятиме упорядженню та поліпшенню пошуку. Відстань між лініями повинна буди в межах 8...10 мм.

У разі вимивання ембріонів асептично, закритою системою середовище для вимивання фільтрується через фільтри та їх порук проводять в цій кюветі.

Мікроскоп фокусують за нижнім шаром рідини про який судять за утвореним осадом клітин на дні чашки, оскільки ембріони повинні знаходитися саме в ньому. Пошук проводять за 16 – 32-кратному збільшенні стереомікроскопу, поступово проглядаючи кожне його поле. Чашку Петрі або ембріональний фільтр рухають «змійкою» зліва направо і навпаки так, щоб в полі зору мікроскопа було повністю захвачено площину між двома лініями. Знайдені в полі зору ембріони переносять приладом (одноразовий шприц ємкістю 1см³ з'єднаний з капіляром чи пайєтою) в маленьку чашку Петрі з середовищем для культивування. На верхній кришці пишуть індивідуальний номер донора. Після проглядання всієї площі дна чашки Петрі або фільтра, круговими рухами перемішують середовище, дають йому відстоятися і проводять повторний пошук.

4. Характеристика яйцеклітин і ембріонів різних стадій розвитку

У зв'язку з тим, що під час суперовуляції фолікули овулюють не одночасно, а цей процес розтягнутий у часі, це зумовлює вимивання у донорів на 7...8 день статевого циклу ембріонів різних стадій розвитку. Під час роботи біотехнолога для прискорення фіксації інформації про отримані ембріони, були розроблені коди класифікації ембріонів різних стадій розвитку. У кожній країні була розроблена своя класифікація. Міжнародне товариство ембріотрансплантації (IETS) запропонувало класифікацію, якої нині притримується більшість країн експортерів ембріонів. У таблиці 1 представлена порівняльна характеристика кодів що використовуються в Україні і згідно IETS.

Враховуючи вступ України в СОТ необхідно користуватися міжнародною класифікацією стадій розвитку ембріонів.

1. Класифікаційний код стадій та підстадій розвитку ембріонів та гамет

Класифікаційний код		Стадія розвитку
IETS ¹	чинний в Україні	
1	Яц	Яйцеклітина
2	РСР	Рання стадія розвитку (2-14-клітинна стадія)
3	Мр	Рання морула
4	М	Морула
5	Бр	Рання бластоциста
6	Б	Бластоциста
7	Бе	Бластоциста експандована (розширена)
8	Бв	Бластоциста, що вилуплюється
9	Бви	Бластоциста, що вилупилася

Примітка 1.. IETS¹ – Міжнародне товариство ембріотрансплантації

4.1 Вікова та морфологічна характеристика ембріонів і гамет, яких вимивають на 7...9 день статевого циклу корови-донора

Яйцеклітина – 1 (Яц), на 7-9-й день статевого циклу має діаметр 0,14 мм, інколи неправильну сферичну форму; цитоплазма об'ємно стиснута; лізис цитоплазми зумовлює неоднорідність за складом, фрагментарний розпад; явні ознаки дегенерації; іноді в перивітеліновому просторі знаходиться полярне тіло.

Ранні стадії розвитку ембріонів – 2 (РСР). Вік – 2 – 4 діб. Клітинна маса складається від 2-х, до 14-и бластомерів.

Морула рання – 3 (Мр). Вік 5 -- 6 діб. Клітинна маса складається із 16-32-х бластомерів, займає 50-60% перивітелінового простору (див. рис.1).

Морула – 4 (М). Вік – 6 – 7 діб. Клітинна маса складається із 32 – 64 бластомерів, займає 60-70% перивітелінового простору, бластомери утворюють компактну масу. Перивітеліновий простір виражений чітко. Діаметр – 0,14 – 0,17 мм (див. рис.2).



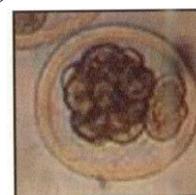
ДСЦ-6
КЯ – 1 (1/5)



ДСЦ-6,5
КЯ – 1 (1/5)



ДСЦ-6,5
КЯ – 2 (2)



ДСЦ-6,5
КЯ – 2 (2)

Рисунок 1. Рання морула (код стадії розвитку – 3 або Mr, КЯ – код класу якості ембріона згідно табл. 2)

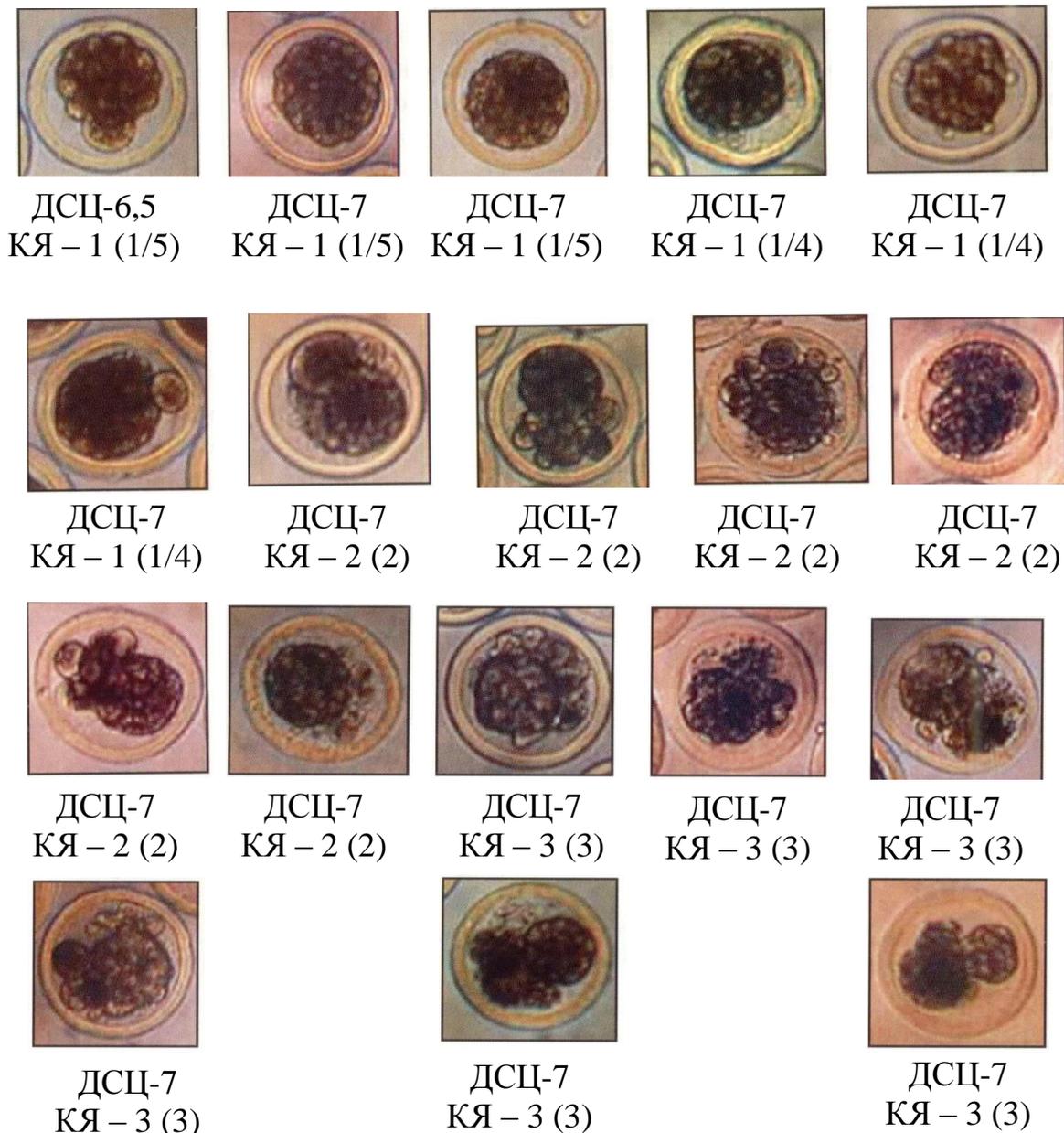
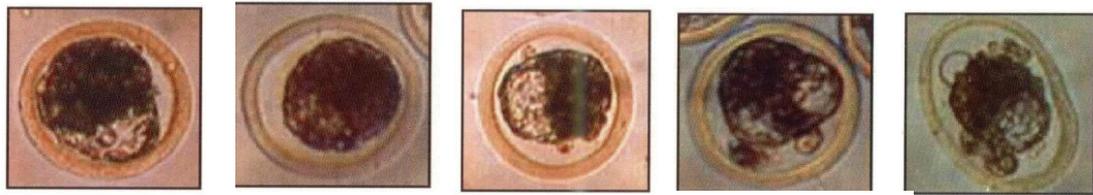


Рисунок 2. Морула (код стадії розвитку – 4 (М), КЯ – код класу якості ембріона згідно табл. 2)

Бластоциста рання – 5 (Бр). Вік – 7 – 8 діб. Клітинна маса складається із 65-120 бластомерів, займає 70-80 % перивітелінового простору, в компактній масі бластомерів наявна невелика заповнена рідиною асиметрично розміщена порожнина (бластоцель).

Ембріобласт і трофобласт візуально ще погано розрізняються. Чітко виражений перивітеліновий простір. Діаметр – 0,14 – 0,17 мм.

Поверхня клітинної маси гладенька, рівномірна (див. рис.3).



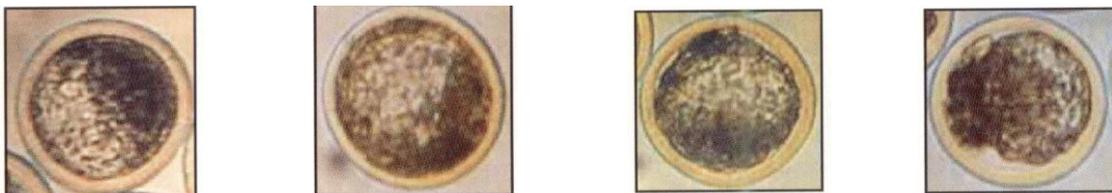
ДСЦ-7
КЯ – 1 (1/5) ДСЦ-7
КЯ – 1 (1/5) ДСЦ-7
КЯ – 1 (1/4) ДСЦ-7
КЯ – 1 (1/4) ДСЦ-7
КЯ – 2 (2)



ДСЦ-7
КЯ – 2 (2) ДСЦ-7
КЯ – 2 (2) ДСЦ-7
КЯ – 3 (3) ДСЦ-7
КЯ – 3 (3)

Рисунок 3. Рання бластоциста (код стадії розвитку – 5 (Бр), КЯ – код класу якості ембріона згідно табл. 2)

Бластоциста – 6 (Б). Вік – 7 - 8 діб. Клітинна маса складається із 80-120 бластомерів, займає 70-80 % перивітелінового простору. Чітко виявлена диференціація зовнішнього шару трофобласту і більш темний і компактний шар ембріобласту. Діаметр – 0,14 – 0,17 мм. (див. рис.4).



ДСЦ-7
КЯ – 1 (1/5) ДСЦ-7
КЯ – 1 (1/5) ДСЦ-7
КЯ – 1 (1/4) ДСЦ-7,5
КЯ – 2 (2)

Рисунок 4. Бластоциста (код стадії розвитку – 6 (Б), КЯ – код класу якості ембріона згідно табл. 2)

Бластоциста експандована – 7 (Бе). Вік – 7–9 діб. Клітинна маса складається із 130-220 бластомерів, Перивітеліновий простір повністю зникає. Прозора оболонка розтягнута і тонша – до 1/3 початкової величини. Трофобласт у вигляді сплющеного ланцюга розміщується безпосередньо під прозорою оболонкою. Ембріобласт –

у вигляді компактного скупчення клітин. Діаметр – 0,18 – 0,22 мм (див. рис.5).



ДСЦ-7,5 ДСЦ-7,5 ДСЦ-7,5 ДСЦ-7,5 ДСЦ-7,5
 КЯ – 1 (1/5) КЯ – 1 (1/5) КЯ – 1 (1/4) КЯ – 1 (1/4) КЯ – 2 (2)

Рисунок 5. Бластициста експандована (код стадії розвитку – 7 (Бе), КЯ – код класу якості ембріона згідно табл. 2).

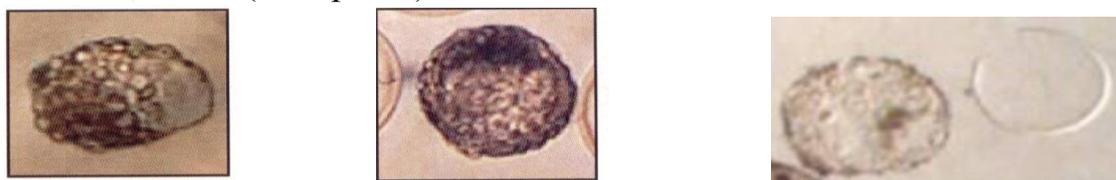
Бластициста, що вилуплюється. – 8 (Бв), Вік – 8 – 9 діб. Трофобласт і ВКМ стиснуті і виходять через отвір у прозорій оболонці (див. рис.6).



ДСЦ-8 ДСЦ-8 ДСЦ-8,5
 КЯ – 1 (1/5) КЯ – 1 (1/5) КЯ – 1 (1/5)

Рисунок 6. Бластициста, що вилуплюється (код стадії розвитку – 8 (Бв), а – код якості ембріона згідно табл. 2).

Бластициста, що вилупилась – 9 (Бви). Вік – 9 діб. Клітинна маса складається із 200-800 бластомерів. Блискуча оболонка відсутня. Ембріон має неправильну сферичну форму, поверхня бугриста, ембріобласт та трофобласт чітко виражені, є бластоцель. Діаметр – 0,22 – 0,80 мм (див. рис.7).



ДСЦ-8 ДСЦ-9 ДСЦ-9
 КЯ – 1 (1/5) КЯ – 1 (1/5) КЯ – 1 (1/5)

Рисунок 7. Бластициста, що вилупилася (код стадії розвитку – 9 (Бви), КЯ – код якості ембріона згідно табл. 2).

5. Визначення життєздатності ембріонів

Ембріони на відміну від спермійів не рухаються. Їх рух в статевих органах забезпечується спеціально нейрогормонально-морфологічно відрегульованою системою репродуктивного апарата самиці. Тому для визначення життєздатності доїмплантаційних зародків було розроблено ряд способів, частина з яких використовується в практиці методу трансплантації ембріонів. Серед розроблених способів слід назвати наступні:

1. Вітальне фарбування;
2. Редуктазна проба;
3. За рівнем біопотенціалу;
4. Відповідність стадії розвитку ембріона його віку;
5. Морфологічна оцінка;
6. За приживлюваністю ембріонів у телиць-реципієнтів (арбітражний спосіб);
7. За зміною об'єму бластомерів у гіпертонічному розчині хлориду натрію.

У практиці використовують в основному останні три способи.

6 Морфологічна оцінка ембріонів

Після того як були знайдені і перенесені всі ембріони та гамети в середовище для культивування, приступають до їх оцінки. Для класифікації ембріонів за морфологічною оцінкою використовують коди їх якості, представлені в таблиці 2.

2. Клас та позначки морфологічної оцінки якості ембріонів

Морфологічна оцінка– код класу якості за IETS	Морфологічна оцінка – код класу якості в Україні
Відмінно, добре – 1	Відмінно – 1/5, Добре – 1/4
Задовільно – 2	Задовільно – 2
Погано - 3	Непридатний –3
Мертвий, чи дегенерований – 4	

За 98-кратного збільшення в стереоскопічному мікроскопі, першу чергу, проводять оцінку розвитку ембріонів. Ембріони вважаються придатними для пересаджування тоді, коли після їх вимивання у донорів на 6–8-й день статевого циклу, вони мають

стадію розвитку, яка відповідає їх віку. Ранні морули за класом якості 1/5, 1/4, які вимивають у донорів на 7-й день статевого циклу, вважаються задовільними

Якісна оцінка ембріонів проводиться за морфологічними ознаками: правильна сферична форма і ступінь заповнення ПП; неушкоджені прозора оболонка та бластомери; різниця за розміром бластомерів; щільність міжклітинних контактів; кількість неповноцінних бластомерів із деструкцією цитоплазми.

Ембріонам залежно від стану морфологічних ознак, відповідно до вимог вказаних у таблиці 3, присвоюють відповідний клас якісної оцінки.

Оцінені ембріони використовують у двох напрямках. По-перше, заправляють у пайети і пересаджують телицям-реципієнтам. Окремо пересаджують тільки «Відмінні» (1/5) та «Добрі» (1/4) ембріони. «Задовільні» ембріони забезпечують низький рівень приживлюваності, тому їх пересаджують тільки в парі з «Відмінним» або «Добрим».

Другий напрям використання ембріонів полягає в їх довготривалому зберіганні в замороженому стані. Для заморожування використовують тільки «Відмінні» та «Добрі» ембріони. Ембріони заморожені, а потім розморожені та оцінені, як перший та другий клас пересаджують тваринам-реципієнтам, а третій вибраковують (табл2.).

7 Санітарна обробка ембріонів

Нативні і призначені для заморожування ембріони не повинні бути контаміновані патогенними і умовно-патогенними мікроорганізмами, грибами, вірусами та іншими мікроорганізмами. Тому після їх оцінки для ліквідації інфекційної контамінації перед пересадженням або заморожуванням використовують санітарну обробку ембріонів. Для цього використовують два способи.

1 спосіб. Ембріони проводять поступово через ряд стерильних середовищ для культивування (5–10). Для цього мікропіпеткою їх переносять з мінімальною кількістю середовища (біля 0,01 см³) із однієї стерильної чашки в іншу. Це дозволяє уже в третій чашці отримати концентрацію 1/1000 вихідного розчину. Цей спосіб дозволяє звільнитися від збудників і таких інфекційних захворювань, як бруцельоз, лейкоз, інфекційна діарея, туберкул юз, ящур, пустульозний вагініт, вульвовагініт, хламідіоз та інш.

Таблиця 3 Характеристика морфологічних показників якості ембріонів відповідного класу

Стадія розвитку ембріона	Морфологічні показники якості ембріонів та код їх класу			
	1- («Відмінні» - 1/5)	1- («Добрі» - 1/4)	2- («Задовільні» - 2)	3,4 – («Непридатні» - 3)
1	2	3	4	5
Морула рання 3 (Mr),	Ембріони правильної сферичної форми; ПО без ушкоджень, з'єднана із цитоплазмою ПП., який немає цитоплазматичних гранул та інших включень; Бл чіткі; різниця за розмірами Бл приблизно 2:1; слабкий ступінь ущільнення між клітинами; частка повноцінних Бл – 85-95%.	Ембріони правильної сферичної форми; ПО без ушкоджень, з'єднана із цитоплазмою ПП, який не має цитоплазматичних гранул та інших включень; у ПП із загальної маси клітин трохи випинаються 1-2 Бл; на поверхні бластомерів допус-кається невелика вакуоль; Бл мають чіткі контури; різниця за розмірами Бл приблизно 2:1; розміщені асиметрично, міцно з'єднані; частка повноцінних Бл .- 75-85%.	Ембріони правильної сферичної форми або з невеликою деформацією, ПО може мати невеликі ушкодження (тріщину чи відкол); у ПП гранули та окремі бластомери; частка повноцінних Бл – 35-60%.	Ембріони зморщені, неправильної форми; ПО ушкоджена, легко змінює форму при дотику або натисканні гістологічною голкою; Бл із деструкцією цитоплазми; ПП містить окремі зруйновані бластомери; зв'язку між бластомерами немає; значна частина їх темного кольору, спостерігається пікноз.

Продовження таблиці 3

1	2	3	4	5
Морула 4 (М)	Ембріони правильної сферичної форми; ПО без ушкоджень, з'єднана із цитоплазмою ПП, який немає цитоплазматичних гранул та інших включень; Бл чіткі; різниця за розмірами Бл приблизно 2:1; поверхня середньо-горбкувата; середній ступінь ущільнення зв'язку між клітинами; частка повноцінних Бл – 85-95%.	Ембріони правильної сферичної форми; ПО без пошкоджень, з'єднана з цитоплазмою ПП; середній ступінь зв'язку між бластостоме-рами; у ПП із загальної маси клітин, які утворюють горбкувату поверхню трохи випинаються 1-2 Бл; різниця за розмірами Бл приблизно 2:1; частка повноцінних Бл – 75-85%.	Ембріони правильної сферичної форми або з невеликою деформацією; прозора оболонка ціла або з невеликими тріщинами чи відколками, з'єднана з цитоплазмою ПП, в якій є гранули; на поверхні загальної маси клітин є пухирці; окремі бластомери темного кольору; бластомери розталовані асиметрично й можуть бути зміщені відносно центра; частка повноцінних Бл – 35-60%.	Ембріони неправильної, зморщеної форми; ПО ціла або пошкоджена, легко змінює форму при дотику чи натисканні гістологічною голкою; Бл із деструкцією цитоплазми; ПП заповнений окремими зруйнованими Бл; зв'язок між Бл дуже слабкий або відсутній; значна частина бластомерів темного кольору, спостерігається пікноз.

Продовження таблиці 3

1	2	3	4	5
Бластоциста рання 5 (Бр),	Ембріон правильної сферичної форми; ПО товщиною 12 мкм, без пошкоджень, з'єднана з витоплазмою ПП, який немає цитоплазматичних гранул та інших включень; є невелика ексцентрична бластоцель, яка може займати 1/3 об'єму ВКМ; трофобласт на фоні клітинного комплексу виявляється у вигляді більш яскравого просвітління.	Ембріон правильної сфери-ної форми; ПО товщиною 12 мкм, без пошкоджень, з'єднана з цитоплазмою ПП, який має незначну кількість цитоплазматичних гранул та інших включень; є невелика ексцентрична бластоцель, яка може займати 1/3 об'єму ВКМ; трофобласт на фоні клітинного комплексу виглядає яскравішим просвітлінням.	Ембріон правильної сферичної форми; ПО товщиною 12 мкм деформована, з невеликими тріщинами та дефектами, з'єднана з цитоплазмою ПП, у якому є гранули та включення; трофобласт зміщений відносно центру; 40-50% Бл темного кольору.	Ембріон неправильної сферичної форми; ПО деформована, має значні тріщини або відколи; ПП заповнено окремими зруйнованими Бл; зв'язок між Бл дуже слабкий або відсутній; понад 50% зруйнованих Бл .

Продовження таблиці 3

1	2	3	4	5
Бластоциста 6 (Б)	Ембріон правильної сферич-ної форми; ПО товщиною 12 мкм, без пошкоджень, з'єднана з цитоплазмою ПП, який немає цитоплазматич- них гранул та інших включень; ембріобласт та трофобласт добре помітні; об'єм бластоцелі та ВКМ у співвідношенні ~ 1:1.	Ембріон правильної сфери-ної форми; ПО товщиною 12 мкм, без пошкоджень, з'єднана з цитоплазмою ПП, який має окремі цитоплазма-тичні гранули або включення; ембріобласт та трофобласт добре помітні; об'єм бластоцелі та ВКМ в співвідношенні ~1:1.	Ембріон правильної сферичної форми; прозора оболонка товщиною 12 мкм з незначною деформацією, без пошкоджень, з'єднана з цитоплазмою ПП, який має гранули та включення; до 40 – 50% Бл ембріобласту та трофобласту з деструкцією цитоплазми; об'єм бластоцелі та ВКМ у співвідношенні ~ 1:1.	Ембріон неправильної сферичної форми; прозора оболонка деформована, має значні тріщини або відколи; ембріобласт та трофобласт майже непомітні, зустрічаю- ться великі темні включення; понад 50% Бл зруйновані; зв'язок між Бл дуже слабкий або відсутній

Продовження таблиці 3

1	2	3	4	5
Бластоциста експондована 7 (Be)	Ембріон правильної сфери-ної форми; ПО розтягнута та стоншена до 8 мкм, без пошкоджень; ПП відсутній; ембріобласт та трофобласт чітко виражені з наявністю щільного контакту між Бл; клітини трофобласта дуже плоскі, контрастні; бластоцель займає більшу частину ембріона, прозора.	Ембріон правильної сферичної форми; ПО розтягнута та стоншена до 8 мкм, без пошкоджень; ПП відсутній; ембріобласт та трофобласт чітко виражені з наявністю щільного контакту між Бл, клітини трофобласта дуже плоскі контрастні; до 20% клітин трофобласта та ембріобласта з деструкцією цитоплазми;; бластоцель займає більшу частину ембріона, прозора, з окремими включеннями.	Ембріон правиль-ної сферичної фор-ми; ПО розтягнута та стоншена до 8 мкм, без пошкодь-жень; ПП відсут-ній; ембріобласт та трофобласт чітко виражені з наявніс-тю щільного контакту між клітинами; клітини трофобласта дуже плоскі і контраст-ні; до 50% клітин трофобласта і ембріобласта з деструкцією цитоплазми; бластоцель займає більшу частину ембріона, прозора з включеннями.	Ембріон неправильної сферичної форми; ПО ціла, має тріщини або відколи, легко змінює форму при дотику гістологічною голкою; ПП відсутній; ембріобласт та трофобласт рихлі, зв'язок між більшістю клітин відсутній; бластоцель займає більшу частину ембріона, затемнена, деформована з значною кількістю цитоплазматичних включень; до 80% клітин трофобласта і ембріобласта з деструкцією цитоплазми.

Продовження таблиці 3

1	2	3	4	5
Бластоциста, що вилуплюється 8 (Бв),	Ембріон неправильної сфе-риної форми; ембріобласт чітко обмежений, Бл трофобласту добре розрізняються, чітко окреслені.	Ембріон неправильної сфе-ричної форми; ембріобласт чітко обмежений, Бл трофобласту добре розрізняються, чітко окреслені; до 20% Бл мають деструкцією цитоплазми;.	Ембріон неправильної сферичної форми; ембріобласт нечітко обмежений, бластомери трофобласту майже не розрізняються, нечітко окреслені, до 50% мають деструкцією цитоплазми.	Ембріон неправильної сферичної форми; ембріобласт не виділяється, Бл трофобласту розрихлені, темні, з деструкцією цитоплазми;.
Бластоциста, що вилупилася 9 (Ббо),	Ембріон неправильної сферичної форми; ПО відсутня; ембріобласт і трофобласт чітко виражені; поверхня горбкувата; бластоцель збережена, прозора.	Ембріон неправильної сфе-ричної форми; ПО відсутня; ембріобласт і трофобласт чітко виражені; поверхня горбкувата; бластоцель збережена, непрозора.	Ембріон неправильної сферичної форми; ПО відсутня; ембріобласт та трофобласт нечітко виражені, поверхня горбкувата; бластоцель збережена, непрозора.	Ембріон неправильної сфе-ричної форми; ПО відсутня; ембріобласт та трофобласт нечітко виражені; поверхня горбкувата; бластоцель збережена, непрозора; Бл трофобласту розрихлені, з деструкцією цитоплазми.

Від таких збудників, як інфекційний ринотрахеїт і везикулярний стоматит позбавитися не вдається, оскільки ці збудники взаємодіють з прозорою оболонкою ембріону і залишаються на ній навіть за багатократного його промивання

2 спосіб. Ембріони відмивають у 5 стерильних середовищах для культивування, потім 2–2,5 хвилини в двох розчинах трипсіну з концентрацією 0,25%. Після обробки трипсіном ембріони знову промивають у 5 стерильних середовищах для культивування. Цей спосіб дозволяє позбавитися від усіх наявних збудників інфекційних захворювань.

Обробці цим способом можна піддавати ембріони з непошкодженою прозорою оболонкою, яка перешкоджає проникненню ферменту до бластомерів.

Питання для самоконтролю

1. Які за стадією розвитку вимивають ембріони на 6-9 день статевого циклу?
2. Який код мають морули та бластоцисти?
3. Назвіть методи визначення життєздатності ембріонів.
4. За якими морфологічними критеріями оцінюють ембріони?
5. Назвіть стан морфологічних ознак «Відмінного», «Доброго» і «Задовільного» ембріонів.
6. Як використовують отримані ембріони?
7. Опишіть перший спосіб санітарної обробки ембріонів.
8. Опишіть другий спосіб санітарної обробки ембріонів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

Основна література

1. Герасименко В.Г. Трансгенні тварини.- К.: Вища школа, 1989.- 343 с.
2. Яблонский В.А. Трансплантация эмбрионов у сельскохозяйственных животных.- Кишинев, 1988.- 96 с.
3. Дибан А.П. Раннее развитие млекопитающих.- Л.: Наука, 1988.- 228.
4. Егоров Н.С., Олескин А.В., Самуилов В.Д. Биотехнология проблемы и перспективы.- М.: Высшая школа, 1987.-159 с.
5. Завертяев Биотехнология в воспроизводстве и селекции крупного рогатого скота.- Л.: Агропромиздат, 1989.-255 с.
6. Квасницкий А.В., Мартыненко Н.А., Близнюченко А.Г. Трансплантация ямб-рионов и генетическая инженерия в животноводстве.- К.: Урожай, 1988.-260 с
7. Коваленко В.П., Горбатенко І.Ю. Біотехнологія у тваринництві й генетиці.-К.: Урожай, 1992.-150 с.
8. Осташко Ф. Биотехнология воспроизведения крупного рогатого скота.- К.: Аграрна наука, 1995.- 183 с.
9. Прокофьев М.И. Регуляция размножения сельскохозяйственных животных.- Л.: Наука, 1983.- 263 с.
10. Хантер Р.Х.Ф. Физиология и технология воспроизводства домашних животных.- М.: Колос, 1984.- 320 с.
11. Биотехнология. Принципы и применение.-Под. Ред. И Хиггинса, Д.Беста, Дж.Джонса.-М.: Мир, 1988.-480 с.
12. Генетика, селекція и биотехнология в скотоводстве / М.В. Зубець, В.П.Буркат, Ю.Ф.Мельник и др. Под ред. М.В.Зубца, В.П.Бурката.- К.: «БМТ», 1997.-722.
13. Основы сельскохозяйственной биотехнологии / Г.С.Муромцев, Р.Г.Бутенко, Т.И.Тихоненко М.И.Прокофьев.- М.: Агропромиздат, 1990.-380с.

Додаткова література

1. Рекомендації щодо відбору та підготовки телиць-реципієнтів до трансплантації ембріонів / Богданов Г.О., Шеремета В.І., Поліщук В.П., Лакотош В.М., Опанасенко В.О.- К.: “Міжнародна фінансова агенція”, 1997.- 12 с.
2. Рекомендації щодо стимуляції суперовуляції у корів-донорів з використанням біологічно активних речовин / Шеремета В.І.,

Богданов Г.О., Опанасенко В.О., Поліщук В.П.-К.: Товариство “Знання України”, 1999.-10 с

3. Мікрохірургічне розділення ембріонів і отримання ранс генні близнят / Бугров О.Д., Безуглий М.Д., Данилов С.Б. та інші // Біотехнологія: Методичні рекомендації для науково-практичних і організаційних питань ранс геннііх ембріонів с.-г. тварин / ХЗВІ.- Харків,1998.- 11с.
4. Технологія отримання ембріонів і яйцеклітин від корів та телиць / Бугров О.Д., Безуглий М.Д., Данилов С.Б. та інші // Біотехнологія: Методичні рекомендації для науково-практичних і організаційних питань ранс геннііх ембріонів с.-г. тварин / ХЗВІ.- Харків,1998.- 9с.
5. Кріоконсервація ембріонів / Бугров О.Д., Безуглий М.Д., Данилов С.Б. та інші // Біотехнологія: Методичні рекомендації для науково-практичних і організаційних питань генній інженерії ембріонів с.-г. тварин / ХЗВІ.- Харків,1998.- 10с.