

УДК 636.237.1.082

Шаферівський Б.С., кандидат сільськогосподарських наук

Полтавський державний аграрний університет

ВПЛИВ СУЧАСНИХ МЕТОДІВ РЕПРОДУКТИВНОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ НА ОРГАНІЗАЦІЮ ВІДТВОРЕННЯ СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКИХ ТВАРИН

Представлено літературні дані щодо наукових здобутків та впровадження сучасних методів репродуктивної біотехнології сільськогосподарських тварин. Зроблено висновок про досягнення сучасної біотехнології, які відкривають великі можливості для селекції та генетичного удосконалення тварин.

***Ключові слова:** біотехнологія, клонування, партеногенез, трансплантація, ембріогенез.*

Біотехнологія розмноження тварин – частина загальної біотехнології, – застосування якої дає змогу одержувати необхідні продукти особин бажаного генотипу нетрадиційними способами. У багатьох країнах вважають, що досягнення лідерства в цій галузі – одне з головних і пріоритетних завдань економічної політики держави [4].

Біотехнологами Інституту розведення і генетики тварин УААН виконується розробка та впровадження сучасних методів репродуктивної біотехнології сільськогосподарських тварин. Ряд досліджень проводяться в тісній співпраці з іноземними установами – Інститутом зоотехніки (Польща), Інститутом репродуктивної генетики (США). При цьому розробляється системний підхід до втілення досягнень біотехнології в аграрне виробництво. Планується розробити біотехнологічні методи регулювання репродукції сільськогосподарських тварин та систему біотехнологічного розмноження з використанням клонування і партеногенезу.

Одержання трансгенних тварин – перспективний напрям біотехнології, яким передбачено покращення показників росту, впливу на якість продуктів тваринництва, одержання тварин з підвищеною стійкістю до захворювань. Інтенсивно у світі виконуються дослідження по створенню трансгенних самиць, молоко яких містило б біологічно активні речовини оздоровчої дії, пов'язані з регуляцією обміну речовин. Оскільки одержання таких тварин супроводжується численними проблемами (низький вихід потомства після трансплантації, низька інтеграція ДНК, непередбачуваність експресії чужорідних генів), відпрацювання методики мікроін'єкції в зародковий міхурець (ядро на стадії диплотени профазі і мейозу) незрілих ооцитів або пронуклеус зиготи – одне з невідкладних завдань. Хоча інтерференційно-контрастна оптика сучасних мікроскопів дає змогу бачити ядра в цитоплазмі гамет або зигот у більшості ліній мишей, великий вміст ліпідних гранул у гаметах самок сільськогосподарських тварин вимагає додаткового застосування центрифугування клітин для збиття гранул до полюсів [2, 7].

Використання трансгенних тварин певною мірою відкриває нові можливості розвитку тваринництва. Перспективними є розробки щодо поліпшення якостей домашніх тварин введенням у них генів, що кодують стійкість тварин до різних захворювань, а також генів резистентності до спадкових хвороб, до хвороб кінцівок, маститу тощо та введення генів, спрямованих на оптимізацію отримання тваринницької продукції (якості молока, прискорення темпів росту) [6].

Біотехнологи встановили оптимальні параметри центрифугування незрілих ооцитів корів (14000 g. 25 хв.) для візуалізації зародкового міхурця. Виявлена відсутність негативного впливу центрифугування (14000 g. 15 хв.) на дроблення одержаних *in vitro* зигот великої рогатої худоби.

Доведено, що центрифуговані (14000 g 25 хв.) незрілі ооцити свиней дозрівають поза організмом до метафази II на високому рівні (76,2%). Ооцити після мікроін'єкції дозрівали *in vitro* на істотно нижчому рівні (32,0%), а також значно зростала кількість ооцитів з хромосомними порушеннями (23,8% та

68,0%, відповідно). Негативні наслідки впливу – ін'єкції на структури клітини потребують удосконалення методики мікро маніпуляцій. Незважаючи на складність проблеми, її розв'язання сприятиме значному підвищенню ефективності одержання трансгенних тварин [3].

Біотехнологами розроблено комплексний підхід до одержання зародків свиней поза організмом. У дослідженнях по дозріванню *in vitro* ооцит-кумуляусних комплексів свиней встановлена оптимальна концентрація (3–5 x 10⁶ мл) клітин гранульози в середовищі культивування, що стабілізує умови та виключає використання екзогенних гормональних добавок. На основі детального цитогенетичного аналізу встановлено оптимальний час (46 – 48 год.) дозрівання ооцитів свині поза організмом, що забезпечує досить високий рівень (60,0 – 75,0%) мейотичного дозрівання клітин [3].

У дослідженнях ряду авторів показано, що на здатність ооциту до повноцінного *in vitro* дозрівання, запліднення та наступного розвитку зародка впливає вік тварини-донора незрілих гамет. Встановлено, що використання ооцитів із яєчників нециклюючих свинок ефективніше при одержанні зародків поза організмом. Вилучення гамет із таких яєчників допомагає швидко одержати велику кількість незрілих гамет, оскільки вилучати ооцит з яєчників циклюючих свиноматок складніше через велику кількість в них жовтих тіл. Використання ооцитів дослідних груп при одержанні зародків свиней *in vitro* забезпечило досягнення подібного рівня запліднення, дроблення та розвитку зародків свиней поза організмом [5].

Біотехнологами Інституту розведення і генетики тварини УААН вже розроблений метод заморожування вилучених із придатка сім'яника (епідидиміт) сперматозоїдів кнурів і бугаїв. Враховуючи, що еякульовані гамети кнурів мають підвищену чутливість до заморожування, наявність кріоконсервованих епідидиальних сперматозоїдів забезпечує виконання досліджень по одержанню ембріонів поза організмом будь-коли, незалежно від закупівлі і доставки підготовленої еякульованої сперми кнурів. Виявлено результативне використання кріоконсервованих гамет кнурів та бугаїв після

штучного осіменіння самок. Забезпечено високий рівень запліднення яйцеклітин (60,0% та 68,0%). Дроблення зигот (45,0% та 63,0%) та розвиток зародків до стадії морули (27,0 % та 24,0 %) при одержанні *in vitro* зародків свиней та великої рогатої худоби, відповідно.

Однією з головних причин, які гальмують одержання ембріонів свиней *in vitro*, є високий рівень поліспермного запліднення ооцитів цього виду сільськогосподарських тварин. Під час природного запліднення свиноматок кількість сперматозоїдів, яка досягає яйцеклітини, контролюється будовою статевої системи. Обмеження кількості численної пенетрації сперматозоїдами ооцитів свиней в умовах *in vitro* за умови високого рівня їх запліднення здійснюється зменшенням до мінімуму числа чоловічих гамет, або скороченням часу сумісної інкубації гамет поза організмом. Показано, що при використанні 0,25; 0,60; 1,50 млн. сперматозоїдів у 1 мл міститься однаково високий відсоток запліднених клітин, проте рівень моноспермного запліднених *in vitro* зигот був найвищий (86,7 %) при концентрації сперматозоїдів 0,250 млн./мл [3].

Успішний розвиток зародків ссавців поза організмом потребує оптимальних умов культивування та середовища. Перші успішні спроби культивування *in vitro* ембріонів свиней з використанням простого середовища для культивування на основі розчину Крепса-Рінгера забезпечували розвиток одержаних *in vitro* зародків свиней до доімплантаційних стадій. З'ясовано, що зародки краще розвиваються в простих середовищах, ніж у складних, тому при використанні систем співкультивування важливо, щоб ці середовища містили відповідні добавки, підтримуючі життєздатність соматичних клітин [2].

Партеногенетична активація гамет самиць ссавців необхідна для вирішення загальнобіологічних питань раннього ембріогенезу, вивчення здатності розвитку партеногенетичних бластомерів, агрегованих з бластомерами звичайних зародків. Використання стовбурових клітин, які можуть диференціюватися в клітини практично всіх тканин організму. Сучасний напрям клітинної терапії. Хоча клітинна терапія передбачає використання ранніх ембріонів людини (5-6-денних бластоцист) для одержання

ембріональних стовбурових клітин, проте для здійснення цього потрібне запліднення *in vitro* ооцитів, що й спричиняє певні етичні суперечки. Одержання зародків шляхом партеногенезу дасть змогу нівелювати етичні протиріччя і подолати реакцію відторгнення стовбурових клітин. Так, якщо блокувати редукційне ділення ооцитів під час дозрівання *in vitro*, а потім активувати до партеногенетичного розвитку, то в активованій яйцеклітині і буде збережений повний набір генів. Застосування цих клітин не матиме такого негативного резонансу, як використання ембріональних стовбурових клітин, видалених з ранніх ембріонів [1].

Враховуючи важливість викладеного, біотехнологами Інституту розведення і генетики тварин УААН розроблено метод активації ооцитів свиней до амейотичного партеногенезу, що дає змогу вилучати партеногеноми на різних стадіях розвитку. Оптимальний час додавання цитохалазину D для пригнічення виділення першого полярного тільца є 12 год. від початку дозрівання ооцитів свиней *in vitro*. Обрано найефективніше середовище для культивування партеногеномів поза організмом (NCSU-23) [1].

Вивчено методичні підходи, налагоджено практичне використання і określено шляхи і можливості ефективного комплексного застосування розширеного методу трансплантації ембріонів великої рогатої худоби. Вивчено, що з використанням препарату P-FSH та оптимальної схеми обробки корів-донорів можна вилучити до 20 придатних для пересадки зародків від однієї корови за одну обробку. Застосовано мікрохірургічний поділ свіжовилучених зародків на половинки для одержання монозиготних близнят. Запропоновано новий метод двоетапного ділення бластоцист великої рогатої худоби без застосування мікроманіпуляторів, що призводить до пошкодження меншої кількості внутрішньої маси бластоцисти. Впроваджується в практику трансплантації метод зажиттєвого визначення статі зародків з використанням диференційного C- забарвлення мітотичних хромосом окремих бластомерів та ПЛР-аналізу. Одержані диференційно забарвлені хромосоми ооцитів корів на різних стадіях мейозу та мітотичні хромосоми зародків великої рогатої худоби,

виявлена локалізація центромерного гетерохроматину. Доведено можливість застосування цього методу для визначення статі зародків великої рогатої худоби [5].

Таким чином, досягнення сучасної біотехнології відкривають великі перспективи для селекції сільськогосподарських тварин. Нині створюються умови для комбінації ознак представників віддалених таксономічних груп тварин, що не було можливим в умовах традиційної селекції. Результати досліджень свідчать, що ряд методів біотехнології набувають важливого значення для генетичного удосконалення тварин.

Список використаних джерел

1. Айала Ф., Кайгер Дж. Современная генетика. учебное пособие. Москва: Мир, 1988. В. 3. 300 с.
2. Буркат В.П., Дзісюк В.В., Ковтун С.І. Прикладні аспекти генетики та біотехнології в тваринництві. *Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів*. 2005. Т. 3, №1–2. С. 131–144.
3. Зиновьева Н.А., Эрнст Л.К., Брем Г. Трансгенные животные и возможности их использования: молекулярно–генетические аспекты трансгенеза в животноводстве. ВИЖ. 2001. 128 С.
4. Ковтун С.И. Контроль спонтанного партеногенетического развития яйцеклеток коров и свиней в условиях in vitro. *Актуальные проблемы биологии в животноводстве*: материалы IV междунар. конф. Боровск, 2006. С. 244–245.
5. Кузнецов В.Є. Біотехнологія у тваринництві. Генетика і селекція в Україні на межі тисячоліть: У 4 т. Київ: Логос, 2001. Т. 4 / за ред. В.В. Моргун. С. 31–57.
6. Шаферівський Б.С., Карунна Т.І., Желізняк І.М. Трансгенез у тваринництві: значення і перспективи. *Сучасне матеріалознавство та товаровознавство: теорія, практика, освіта*: матеріали VII Міжнародної науково – практичної інтернет – конференції, м. Полтава, 12–13 березня 2020 р. Полтава: ПУЕТ, 2020. С. 186–189.

7. Wall R.J. Biotechnology for the production of modified and innovative animal products: transgenic livestock bioreactors //Livestock Production Science. 1999. V. 59. P. 243–255.