

В. В. ГОРЫН, І. Н. КАРАНЕЦ,
О. Б. ГЕРАСИМОВИЧ, Т. В. РАСКАЗЕНАК

АТРЫМАННЕ ЗАРОДКАЎ СВІНЕЙ ПРЫ ДАСПЯВАННІ І АПЛАДНЕННІ ААЦЫТАЎ ПА-ЗА АРГАНІЗМАМ

Стварэнне штучных умоў для паспявання аацытаў і іх апладненне па-за арганізмам у спецыяльна падрыхтаваных асяроддзях з наступнай трансплантацыяй атрыманых зіготаў з'яўляецца побач з эксперыментальнай мадэллю таксама адным з важных спосабаў максімальнага выкарыстання, замацавання і паляпшэння генетычнага патэнцыялу высокакаштоўных жывёл.

Паспяванне аацытаў свіней *in vitro* з'яўляецца адказным момантам, які садзейнічае атрыманню біялагічна паўнацэнных яйцаклетак, гатовых да апладнення. Атрыманне ранніх зародкаў свіней *in vitro* ў значнай ступені залежыць ад умоў капацытацыі сперматазоідаў па-за арганізмам, якая забяспечвае наступнае нармальнае апладненне аацытаў.

Для паспявання аацытаў свіней намі вывучалася магчымасць выкарыстання для культывавання аацытаў і эмбрыёнаў розных мадыфікацый асяроддзяў і ўмоў. Усе аперацыі па атрыманні зародкаў свіней *in vitro* праводзілі ў стэрыльным боксе, дзе тэмпература паветра падтрымлівалася на ўзроўні 30—33 °С.

У даследаваннях для культывавання аацытаў з мэтай далейшага апладнення па-за арганізмам быў падабраны наступны склад кампанентаў: пажыўнае асяроддзе 199, эмбрыянальная сываратка, фалікула-стымулюючы гармон і антыбіётыкі. Асяроддзе перад пачаткам доследу стэрылізавалі фільтрацыяй (0,22 мм фільтра «Millipore»).

Капацытацыю спермы кныроў пачыналі пры змяшчэнні аацытаў на паспяванне. Для гэтага адабраную ад кныроў сперму змешвалі з разбавіцелем у залежнасці ад канцэнтрацыі спермы (1:1—1:4) і ставілі на 1 сут у бокс пры $t = 16—20$ °С. Праз 20 гадз паспявання аацытаў іх 3 разы адмывалі ў асяроддзі 199. Пасля апошняга адмывання аацыты змяшчалі ў асяроддзе 199 з дабаўкамі фетальнай сывараткі, пірувату натрыю, Нерес, антыбіётыкаў.

У аналагічны склад асяроддзя 199 з кампанентамі праз 19 гадз пасля змяшчэння на капацытацыю дабаўлялі ў суадносінах 1:1 разведзеную сперму. Флакончык з пажыўным асяроддзем і спермай цэнтрафугавалі 15 мін пры 2 тыс. аб/мін. Сперму ставілі ў тэрмастат з $t = 37,5$ °С да апладнення. Канцэнтрацыю сперматазоідаў вызначалі з дапамогай камеры Гараева, разводзячы да $26 \cdot 10^6$ клетак/мл з дапамогай асяроддзя 199 з дабаўкамі фетальнай сывараткі, пірувату натрыю, Нерес, антыбіётыкаў. Апладненне аацытаў рабілі спермай з верхняга актыўнага слоя праз 20 гадз пасля пачатку яе капацытацыі.

Своеасаблівы прыкметай капацытацыі з'явіліся змяненні ў характары руху сперматазоідаў. Пасля ўсіх аперацый са спермай жыўчыкі на працягу гадзіны пераходзілі ў гіперактыўны рух і захоўвалі яго каля 3 гадз. Затым ён змяняўся на рух па спіралі. На падставе гэтага намі было зроблена заключэнне, што сперма валодае апладняльнай здольнасцю для атрымання аптымальных вынікаў апладнення *in vitro*.

У 4 мл пажыўнага асяроддзя 199 з аацытамі ў час іх паспявання дабаўлялі $25 \cdot 10^6$ кл/мл спермы і ставілі ў тэрмастат пры $t = 37,5$ °С. Праз 5 гадз пасля пачатку апладнення сперматазоіды адмывалі ў асяроддзі 199, а апладнёныя аацыты змяшчалі ў флакон з асяроддзем, прыгатаваным для культывавання эмбрыёнаў. Пажыўны раствор складаўся з асяроддзя 199, фетальнай сывараткі, пірувату натрыю і лактату кальцыю. Культываванне эмбрыёнаў адбывалася ў тэрмастаце пры $t = 37,5$ °С.

Праз 24 гадз пасля змяшчэння на культываванне пры праглядзе пад

мікраскопам былі выяўлены 3 васьміклеткавыя, адзін — 16-клеткавы і адзін — чатырохклеткавы эмбрыёны. Усе эмбрыёны, згодна з ацэнкай спецыялістаў БелНДІЖ, мелі выдатную і добрую якасць, былі гатовыя да перасадкі свінням-рэцыпіентам.

У сувязі з тым што свінні-рэцыпіенты не былі падрыхтаваны для перасадкі, ранняя марула і васьміклеткавыя эмбрыёны былі сфатаграфаваны, а чатырохклеткавы змешчаны на далейшае культываванне. Пры праглядзе і ацэнцы праз 12 гадз было адзначана, што з чатырохклеткавага эмбрыёна адбылося развіццё да ранняй марулы выдатнай якасці. Пры далейшым культываванні праз 45 гадз пасля яго пачатку выяўлена марула добрай якасці.

На падставе атрыманых эксперыментальных даных можна выказаць меркаванне, што атрыманыя эмбрыёны свінні з'явіліся вынікам правільнага падбору пажыўных асяроддзяў з дабаўкамі, стварэння аптымальных умоў капацытацыі сперматазоідаў, які садзейнічаў паспяховаму апладненню аацытаў і атрымання эмбрыёнаў добрай і выдатнай якасці.

Summary

High viability of swine embryos developed from the stage of 4 blastomeres to morula was a result of correct selection of nutrient media with necessary additives and optimal conditions of spermatozoa capacitation and oocytes fertilization.

БелНДІЖ

Паступіў у рэдакцыю
06.09.94