

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
И ПРОДОВОЛЬСТВИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ
«ГРОДНЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ»

Биотехнологический центр по репродукции
сельскохозяйственных животных

**ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ООЦИТОВ И
ЭМБРИОНОВ КРУПНОГО РОГАТОГО
СКОТА**

Учебно-методическое пособие

Гродно 2011

УДК: 636.2:612

ББК 45.2

О 93

Авторы: Л.В. Голубец, И.С. Кысса, А.С. Дешко, А.А. Козел,
Ю.А. Якубец, М.П. Старовойтова, Е.К. Стецкевич, О.А. Нарейко.

Рецензенты: профессор, доктор ветеринарных наук В.В. Малашко;
профессор, доктор медицинских наук М.Г. Величко.

Оценка качества ооцитов и эмбрионов крупного
О 93 рогатого скота: учеб.-метод. пособие / Л.В. Голубец и др.
– Гродно : ГГАУ, 2011 – 68 с.

Учебно-методическое пособие содержит основные вопросы оценки качества ооцитов и эмбрионов крупного рогатого скота в системе *in vivo* и *in vitro*.

Пособие предназначено для научных работников, аспирантов, специалистов центров, пунктов трансплантации эмбрионов крупного рогатого скота, а также может служить в качестве учебного пособия для студентов и учащихся учреждений, обеспечивающих получение высшего и среднего образования по специальностям 1-74 03 01 «Зоотехния» и 1-74 03 02 «Ветеринария».

УДК: 636.2:612

ББК 45.2

Рекомендовано к изданию методической комиссией по зооветеринарным дисциплинам Учреждения образования «Гродненский государственный аграрный университет» (протокол № 10 от 23 мая 2011 г.).

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение.....	4
1. Основы качественного роста и развития эмбрионов.....	5
1.1 Фолликулогенез.....	5
1.2 Оогенез.....	8
1.3 Сперматогенез.....	13
1.4 Оплодотворение.....	15
1.5 Предимплантационное развитие.....	20
1.6 Тотипотентность.....	23
1.7 Временные параметры развития эмбрионов.....	23
2. Общие подходы к оценке качества клеток.....	24
3. Ооциты и яйцеклетки.....	25
3.1 Морфологическая оценка качества ооцитов <i>in vitro</i>	25
3.2 Морфологическая оценка качества ооцитов и яйцеклеток полученных <i>in vivo</i>	27
4. Эмбрионы.....	28
4.1 Общая оценка.....	28
4.1.1 Нормально развитые (полноценные) эмбрионы.....	28
4.1.2 Частично-дегенерированные эмбрионы.....	28
4.1.3 Дегенерированные эмбрионы.....	28
5. Фотографии по оценке качества ооцитов и эмбрионов крупного рогатого скота.....	31
5.1 Ооциты <i>in vitro</i>	31
5.2 Ооциты и яйцеклетки <i>in vivo</i>	33
5.3 Эмбрионы на ранних стадиях развития.....	38
5.4 Морулы.....	42
5.5 Бластоцисты.....	50

ВВЕДЕНИЕ

Трансплантация эмбрионов – это один из комплексных биотехнологических методов ускоренного размножения животных с высокой генетической ценностью. Одним из важнейших технологических процессов данного метода является оценка качества эмбрионов и их жизнеспособности. Связано это с тем, что полиовуляция вызывается экзогенными гонадотропинами, инъекция которых способна вызвать в организме животного кратковременные отклонения в секреции эндогенных гормонов, что в свою очередь может привести к нарушению процессов фолликуло- и оогенеза, а следовательно влиять на оплодотворяемость яйцеклеток и развитие ранних зародышей. Кроме этого на жизнеспособность эмбрионов могут оказывать действенное влияние различного рода манипуляции: извлечение, кратковременное хранение *in vitro*, криоконсервация, микрохирургия и др.

Оценка качества проводится в промежутке между получением эмбрионов и их последующим использованием, и включает морфологическую диагностику и заключение об их пригодности к трансплантации или криоконсервации.

Морфологическая оценка безвредна и технически стоит недорого. Она проводится под микроскопическим контролем во время манипуляций, которые и без того необходимы. Кроме морфологической оценки качества, иногда определяется жизнеспособность ооцитов и зародышей, для чего применяют кратковременное их культивирование *in vitro*.

В данном пособии отражены все основные правила по оценке качества ооцитов и эмбрионов в системах *in vivo* и *in vitro*. И, тем не менее, данное издание не может заменить личный опыт, который накапливается при непосредственной работе с эмбриональным материалом.

Настоящее учебно-методическое пособие предназначено для научных работников, аспирантов, специалистов центров, пунктов трансплантации эмбрионов крупного рогатого скота, а также может служить в качестве учебного пособия для студен-

тов и учащихся учреждений, обеспечивающих получение высшего и среднего образования по специальностям 1-74 03 01 «Зоотехния» и 1-74 03 02 «Ветеринария».

1. ОСНОВЫ КАЧЕСТВЕННОГО РОСТА И РАЗВИТИЯ ЭМБРИОНОВ

1.1 Фолликулогенез

Фолликул яичника (лат. *folliculus ovaricus*) - структурный компонент яичника, состоящий из яйцеклетки, окружённой слоем эпителиальных клеток и двумя слоями соединительной ткани.

В соответствии со стадией развития различают четыре типа присутствующих в яичнике фолликулов (рис. 1.1): примордиальные, первичные, вторичные и антральные. Антральные фолликулы в свою очередь подразделяются на растущие и доминантные, или предовуляторные.

Примордиальные - самые незрелые и самые маленькие (диаметр около 50 мкм) из фолликулов, присутствующих в корковом слое яичника. Они закладываются в яичниках еще до рождения. Ооциты, находящиеся внутри такого фолликула окружены одним слоем чешуйчатых клеток. Образуются они в процессе митотической пролиферации первичных зародышевых клеток – оогоний. Количество таких фолликулов в яичнике составляет 1-2 миллиона. Далее оогонии проходят Профазу I мейотического деления и становятся первичными ооцитами. Часть из этих ооцитов окружается монослоем кубических эпителиальных клеток, и образуется зародышевый или первичный фолликул. Остальные дегенерируют.

На этом этапе развитие фолликулов приостанавливается вплоть до рождения. К этому времени в яичнике остается примерно 300 тыс. фолликулов. При наступлении половой зрелости гипофиз начинает вырабатывать ФСГ и к созреванию стимулируется от 5 до 15 первичных фолликулов, которые переходят на следующую стадию своего развития, стадию вторичного, или преантрального фолликула, размер которого достигает 150-200 мкм.

Начинает расти ооцит. Его внешняя поверхность покрывается гликопротеином и гликозаминогликанами, формирующими относительно толстую, полупрозрачную оболочку, называемую зоной пеллюцида. Теперь ооцит покрыт 2-4 слоями фолликулярных клеток. По мере дальнейшего развития вокруг ооцита формируется полость и заполняется фолликулярной жидкостью. Такой фолликул называется растущим антральным, или полостным фолликулом. Иногда такой фолликул называется третичным. В этот период такие фолликулы можно различить на поверхности яичника невооруженным глазом. Их размер колеблется от менее чем 1 мм до 1,5-2 см.

В антральном фолликуле формируются три различных слоя эпителиальных клеток: наружный слой (*theca externa*), внутренний слой (*theca interna*) и слой клеток гранулезы. Тека экстерна состоит из свободной соединительной ткани, которая плотно окружает и поддерживает фолликул. Тека интерна отвечает за секрецию андрогенов, которые в дальнейшем являются предшественниками биосинтеза эстрогенов в гранулезных клетках фолликула. Слой гранулезных клеток отделен от теки интерны тонкой базальной мембраной. Клетки гранулезы вырабатывают целый ряд веществ и имеют рецепторы к фолликулостимулирующему гормону (ФСГ). Наиболее важными компонентами, секретируемыми этими клетками являются эстрогены, ингибины и фолликулярная жидкость. Кроме этого предполагается, что гранулеза регулирует созревание ооцита. Таким образом, третичный фолликул становится органом эндокринной системы.

Дальнейший рост антрального фолликула приводит к образованию доминантного или предовуляторного фолликула. Большую часть его часть занимает полость. Количество фолликулярной жидкости в 100 раз больше чем в антральном растущем фолликуле. Примерно за 24 часа до овуляции клетки теки интерны начинают вырабатывать большое количество эстрогенов. Повышение содержания эстрогенов стимулирует выброс ЛГ, который инициирует овуляцию. В стенке фолликула образуется выпячивание (стигма), которое разрывается и яйцеклетка выходит из фолликула. Если по каким-то причинам овуляция не произошла фолликул превращается в кисту.

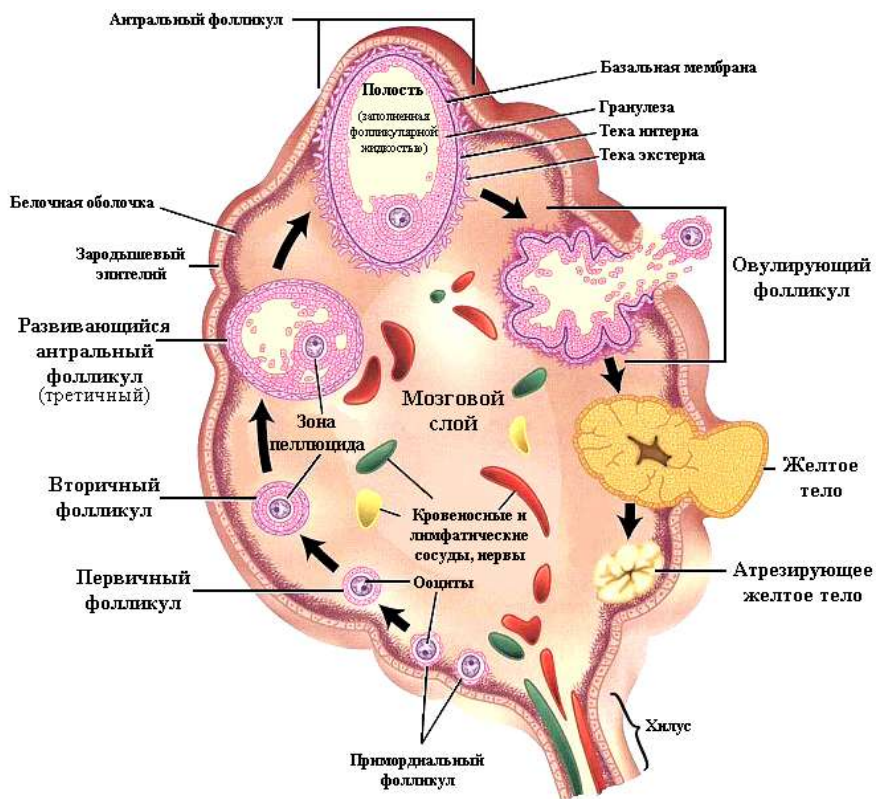


Рисунок 1.1 - Схема фолликулогенеза

После овуляции на месте фолликула образуется желтое тело, вырабатывающее прогестерон, который при наступлении оплодотворения и имплантации зиготы на стадии бластоцисты поддерживает беременность. При отсутствии имплантации в эндометрии вырабатывается простагландин, который вызывает лизис желтого тела и снижение уровня прогестерона в крови. При этом уровень эстрогенов увеличивается и таким образом начинается период нового фолликулярного роста. В течение полового цикла насчитывается три волны роста фолликулов (рис

1.2). Одна в метэструсе, одна в диэструсе, и одна в проэструсе. Однако овуляция доминантного фолликула наступает только в проэструсе. Дело в том, что на фоне повышения уровня прогестерона (метэструс) и в фазе наибольшей его концентрации (диэструс) развитие доминантного фолликула блокируется и он атрезирует, в отличие от проэструса, когда уровень эстрогенов резко увеличивается, а прогестерона падает, и создаются все условия для овуляции. Но, необходимо иметь ввиду, что при инъекции простагландина доминантные фолликулы могут овулировать. В течение каждой волны фолликулярного роста фолликулы проходят четыре фазы своего развития: пополнения, отбора, доминанции и атрезии. Фаза пополнения - это фаза, когда группа маленьких ооцитов начинает свой рост и продуцирует эстрадиол. Однако, в последствии часть из них атрезирует, а та часть, которая продолжит свой рост, является отселекционированной. Но опять-таки часть из этих фолликулов также подвергнется атрезии, а оставшаяся часть перейдет в фазу доминанции. В этой фазе у крупного рогатого скота будет отобран только один доминантный фолликул, который при благоприятных условиях овулирует, а остальные подвергнутся атрезии.

1.2 ООГЕНЕЗ

Яйцеклетки образуются в женской половой железе – яичнике. Они проходят долгий путь развития, который начинается в эмбриональном и продолжается в репродуктивном периоде онтогенеза (рис. 1.3).

Первичные половые клетки возникают на ранних этапах эмбриогенеза из энтодермальных клеток желточного мешка. От других клеток они отличаются крупными размерами и прозрачной цитоплазмой. Доказано, что первичные половые клетки мигрируют из места возникновения к зачаткам гонад. Попав в гонады, они начинают пролиферировать, делятся митотически и превращаются в оогонии. После этого наступает стадия размножения и роста. В результате этого процесса оогонии становятся ооцитами первого порядка.

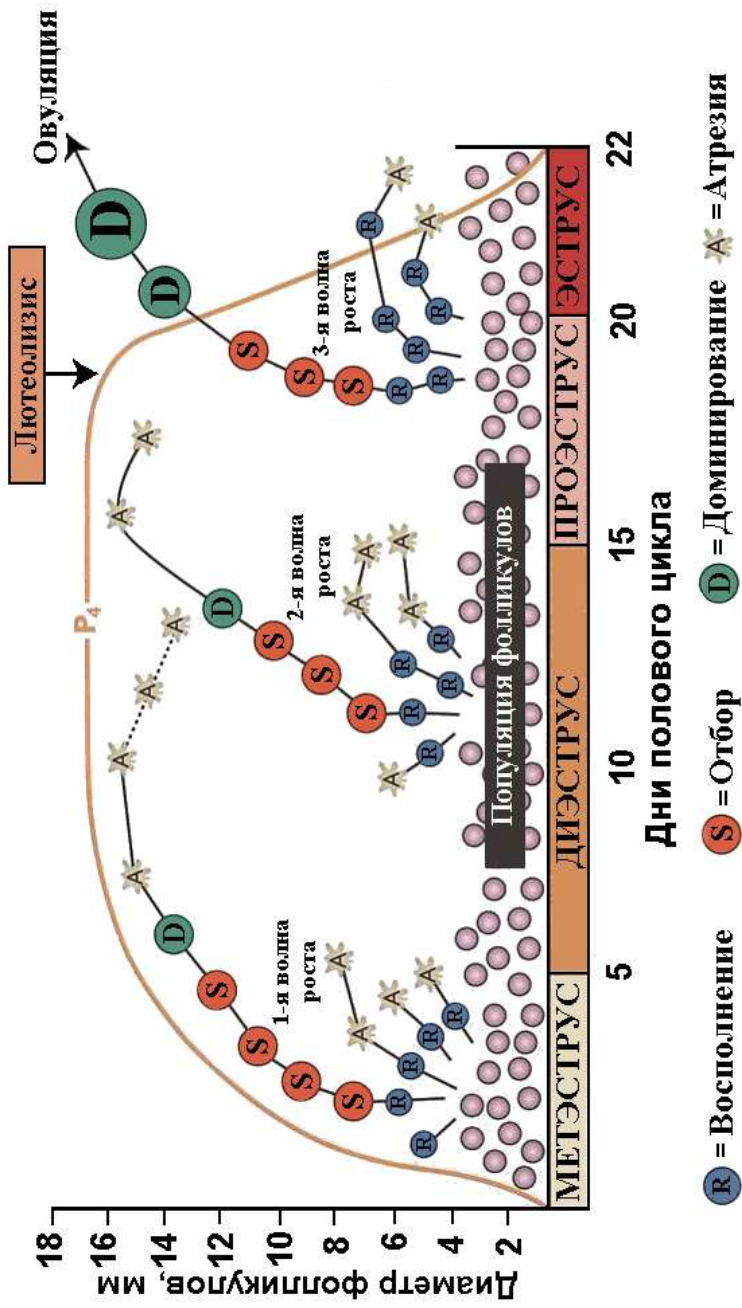


Рисунок 1.2 – Волны фолликулярного роста в процессе полового цикла

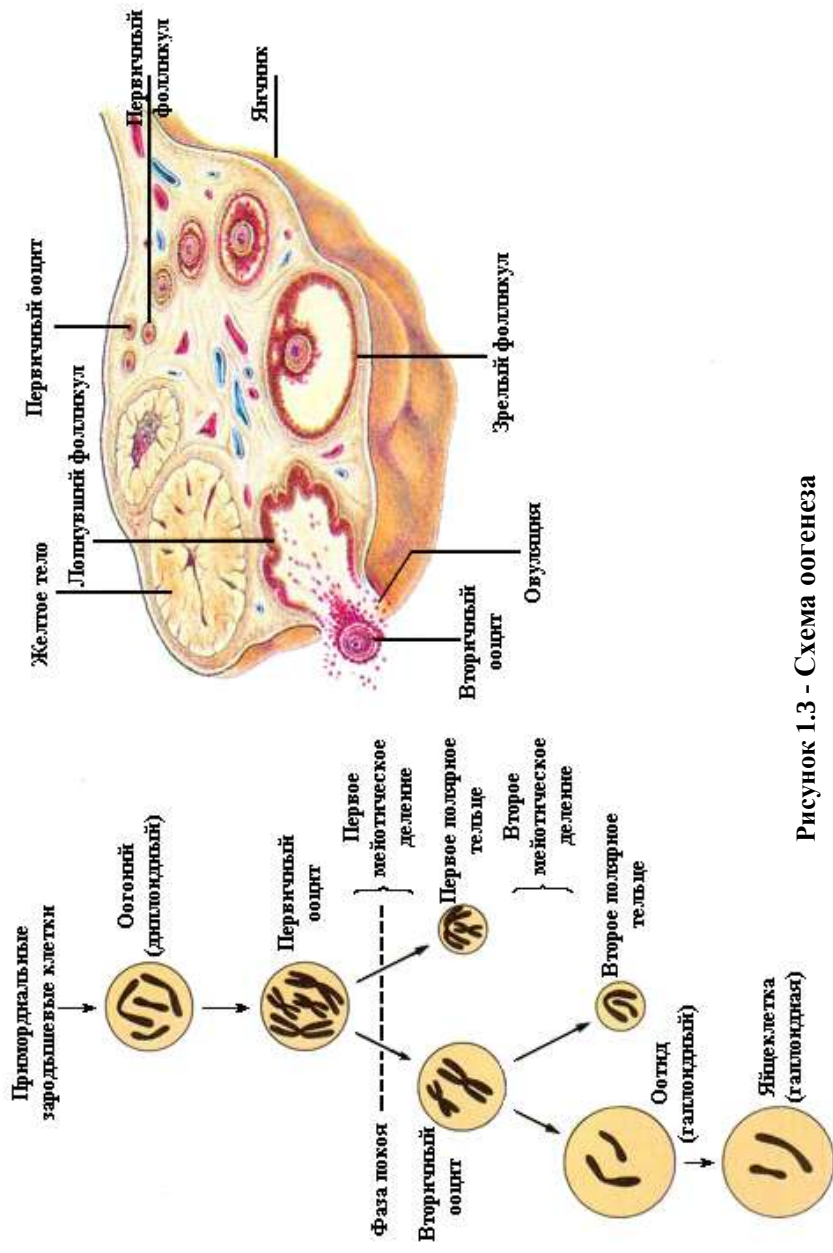


Рисунок 1.3 - Схема оогенеза

После инициации мейоза в ооцитах начинаются ранние стадии профазы 1 (от лептотены до диплотены), затем мейоз блокируется, и ооциты на стадии диплотены переходят в состояние относительного покоя – диктиотены, во время которой размеры ооцитов не увеличиваются. Ооциты остаются в диктиотене до овуляции доминирующего фолликула.

Как правило, у большинства млекопитающих созревание ооцитов происходит в конце фолликулярной фазы эстрального цикла, когда в организме доминируют эстрогены. Основное действие эстрогенов связано со стимуляцией пролиферативных процессов в клетках гранулёзы. Кроме того, индуцируется образование в клетках гранулёзы рецепторов к ФСГ и увеличивается количество щелевых контактов между клетками гранулёзы фолликула. Эстрогены увеличивают скорость их цитодифференцировки, а после пролиферации этих клеток индуцируют образование в них рецепторов к ЛГ.

Незадолго до овуляции происходит кратковременный, но резкий подъем уровня ЛГ, а также некоторое увеличение уровня ФСГ. Возможно, этот пик выделения в кровь ЛГ и является тем стимулом, который снимает блокаду мейоза. Таким образом, созревание ооцита представляет собой комплексную, точно определенную смену структурно-морфологических, физиометаболических и биохимических процессов, как в ядре и цитоплазме, так и в самом фолликуле, охватывающем ооцит. Только физиологическое созревание ядра, цитоплазмы и фолликула в состоянии обеспечить ооциту способность к нормальному оплодотворению и эмбриональному развитию.

Первым морфологическим признаком созревания ядра является разрушение зародышевого пузырька. Одновременно с этим конденсируется хроматин и образуется хорошо видимые в микроскоп хромосомы (стадия диакинеза). После дальнейшего сжатия хромосом образуются нити веретена деления, и хромосомы попарно подтягиваются в середину веретена (стадия метафазы). Мейотическое веретено передвигается к периферии ооцита, и парные гомологические хромосомы расходятся (стадия телофазы). Происходит образование и деление первого полярного

тельца (стадия телофазы), которым и заканчивается 1-ое мейотическое деление.

Второе мейотическое деление созревания ооцитов продолжается до стадии метафазы. Хромосомы в ооцитах располагаются в метафазных пластинках и остаются так до оплодотворения ооцитов 2 порядка. Параллельно с созреванием ядра в ооцитах происходит созревание цитоплазмы.

Структурное созревание цитоплазмы находится в прямой зависимости от созревания ядра и образования веретена деления и рассматривается как признак метаболической активности ооцитов, изменения положения, структуры и числа клеточных органелл и включений, в том числе равномерного распределения митохондрий, увеличения и периферийного расположения кортикальных гранул.

Известно, что в процессе морфологического изменения цитоплазмы происходит ряд качественных изменений протеиновой модели, которая находится в тесной связи с физиологическим созреванием ооцита. Синтез новых белков в цитоплазме ооцитов имеет определенное влияние на их оплодотворяемость, дальнейшее развитие и зависит от соотношения цито- и нуклеоплазмы ко времени разрушения зародышевого пузырька, после чего в цитоплазме активируется матричная РНК. Рядом исследований установлено, что пока в ооцитах не разрушился зародышевый пузырек, протоплазма не способна трансформировать головку спермия в пронуклеус. Эта способность зависит от смешивания кариоплазмы зародышевого пузырька с цитоплазмой ооцита. По некоторым данным предполагается, что эта часть цитоплазматического созревания зависит от созревания ядра. По мнению других авторов, причиной недостаточного созревания цитоплазмы является недостаточное обеспечение ооцита стероидами через фолликулы. По мнению Leibfried M.L. и Bavister B.D., немаловажную роль в регуляции созревания цитоплазмы играет и протеин.

На стадии метафазы II развитие яйцеклеток блокируется, и завершение мейоза в них происходит только после оплодотворения или искусственной активации.

1.3 СПЕРМАТОГЕНЕЗ

Каждый спермий содержит гаплоидное ядро, двигательную систему, обеспечивающую перемещение ядра, и набор ферментов, необходимых для проникновения спермия в яйцо. Большая часть цитоплазмы спермия элиминируется при его созревании, и сохраняются только некоторые органеллы, видоизмененные для выполнения спермием своей функции (рисунок 1.4).

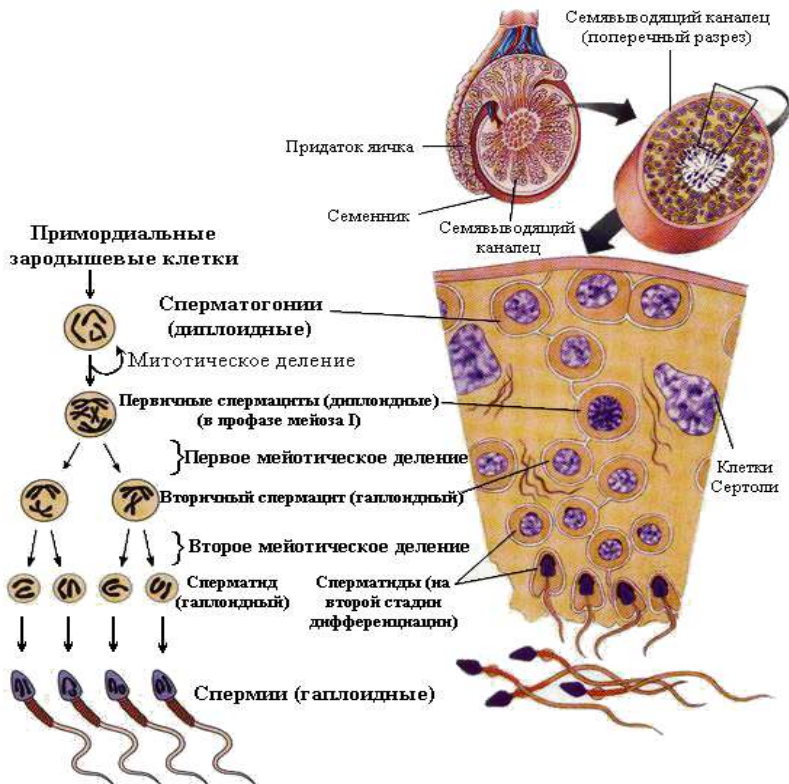


Рисунок 1.4 - Схема сперматогенеза

В процессе формирования спермия центриоль дает начало длинному жгутику в той области, которая станет задним концом спермия. Митохондрии собираются около жгутика у основания гаплоидного ядра и входят в состав средней части спермия. Остальная цитоплазма сбрасывается, гаплоидное ядро приобретает обтекаемую (овальную) форму, а ДНК сильно уплотняется. В передней части головки спермия находится акросомный пузырек, произошедший от аппарата Гольджи и содержащий гидролитические ферменты. Запас ферментов в акросомном пузырьке служит для проникновения спермия через наружные оболочки яйцеклетки (рисунок 1.5).

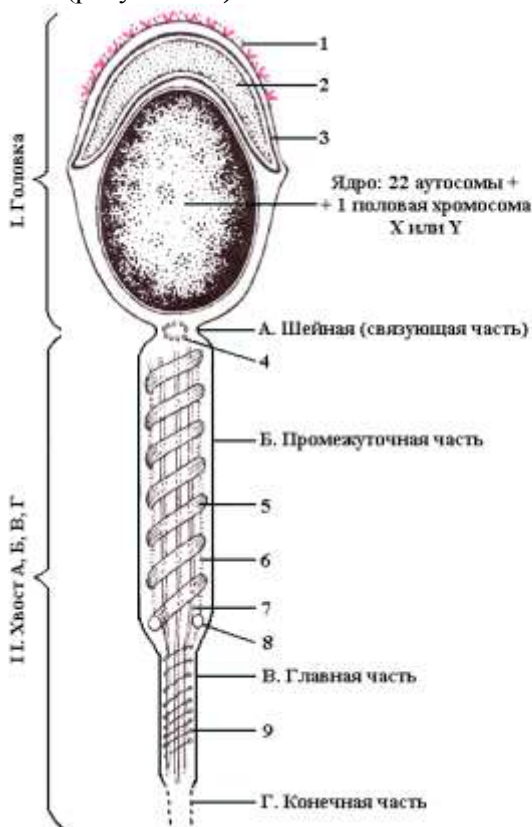


Рисунок 1.5 - Строение сперматозоида

I - головка; II - хвост; 1 - рецептор гликозилтрансфераза; 2 - акросомальная гранула; 3 - «чехлик»; 4 - проксимальная центриоль; 5 - митохондрия; 6 - слой упругих фибрилл; 7 - аксонема; 8 - дистальная центриоль; 9 - циркулярные фибриллы.

1.4 ОПЛОДОТВОРЕНИЕ

Процесс оплодотворения яйцеклетки происходит в ампулярной части яйцевода, куда доходит небольшое количество спермиев, хотя при эякуляции в половой тракт самки попадает до нескольких миллиардов спермиев. Период времени, в течение которого овулировавшие яйцеклетки способны оплодотвориться, различен у разных видов млекопитающих, но обычно не превышает 24 час. Примерно за это же время спермии утрачивают оплодотворяющую способность, находясь в половом тракте самки (рис. 1.6, 1.7).

У млекопитающих оплодотворение внутреннее, поэтому половые пути самки принимают активное участие в этом процессе. После эякуляции, спермии, для приобретения способности к оплодотворению, должны пройти процесс капацитации. При этом у них происходят изменения структуры липидов клеточной мембраны, что выражается в изменении соотношения холестерина и фосфолипидов. Снижение содержания холестерина дестабилизирует мембрану акросомного пузырька, что является необходимым условием для слияния мембран.

Известно, что важнейшим признаком прошедшей капацитации является приобретение спермием способности узнавать прозрачную оболочку ооцита. В то время, как на поверхности спермия, не прошедшего капацитацию, присутствуют углеводы («*coating factors*»), которые препятствуют его прикреплению к яйцеклетке. Эти углеводы представляют собой полимер из повторяющихся остатков галактозы и N-ацетилглюкозамина. Они блокируют рецепторы спермия, в виде молекулы фермента N-ацетилглюкозамингалактозил-трансферазы (гликозилтрансферазы), опознающие зону пеллюцида. Молекулы гликозилтрансферазы встроены в плазматическую мембрану спермия непосредственно над акросомой, причем их активные центры обращены наружу. При капацитации гликозилтрансфераза узнает N-ацетилглюкозаминовые остатки белков прозрачной оболочки.

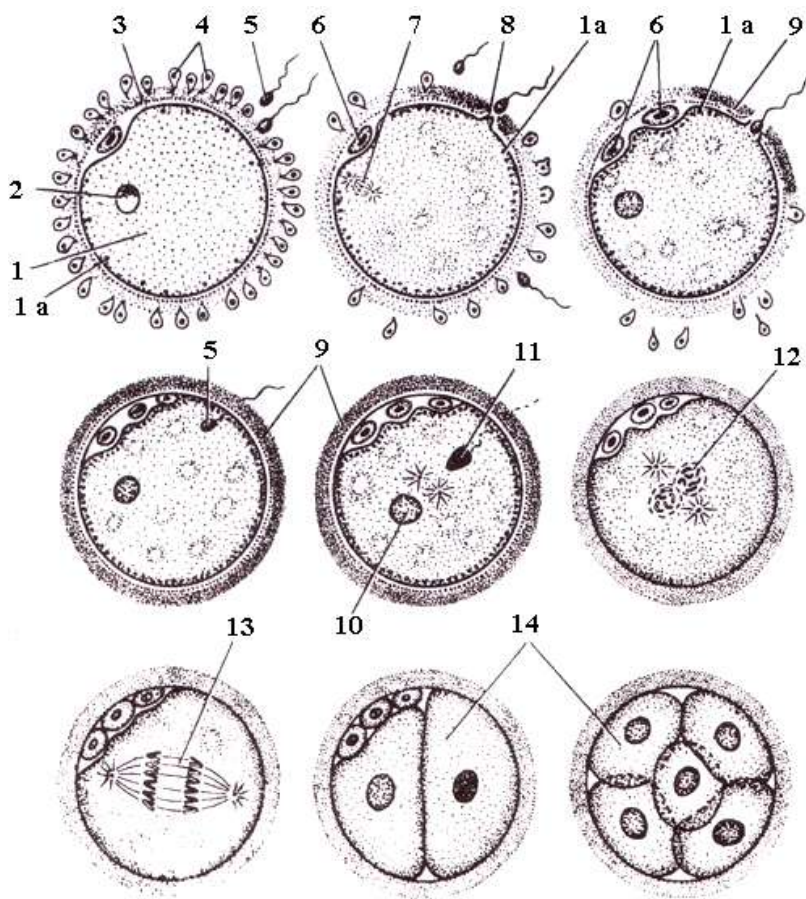


Рисунок 1.6 - Фазы оплодотворения и начало дробления

1 — ооплазма; 1a — кортикальные гранулы; 2 — ядро; 3 — блестящая зона; 4 — фолликулярный эпителий; 5 — спермин; 6 — редукционные тельца; 7 — митотическое деление ооцита; 8 — бугорок оплодотворения; 9 — оболочка оплодотворения; 10 — женский пронуклеус; 11 — мужской пронуклеус; 12 — синкарион; 13 — первое митотическое деление зиготы; 14 — бластомеры.

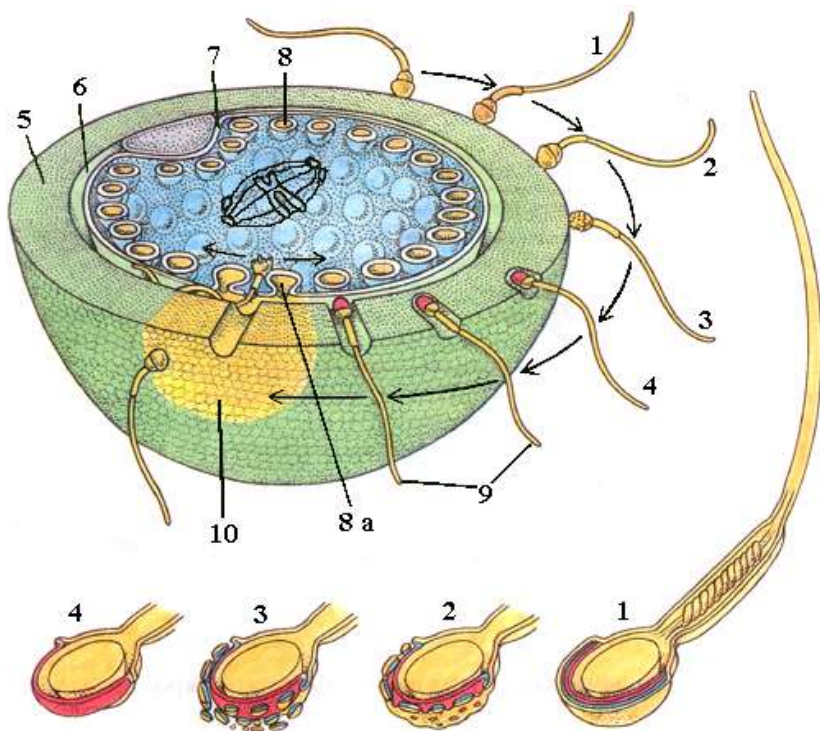


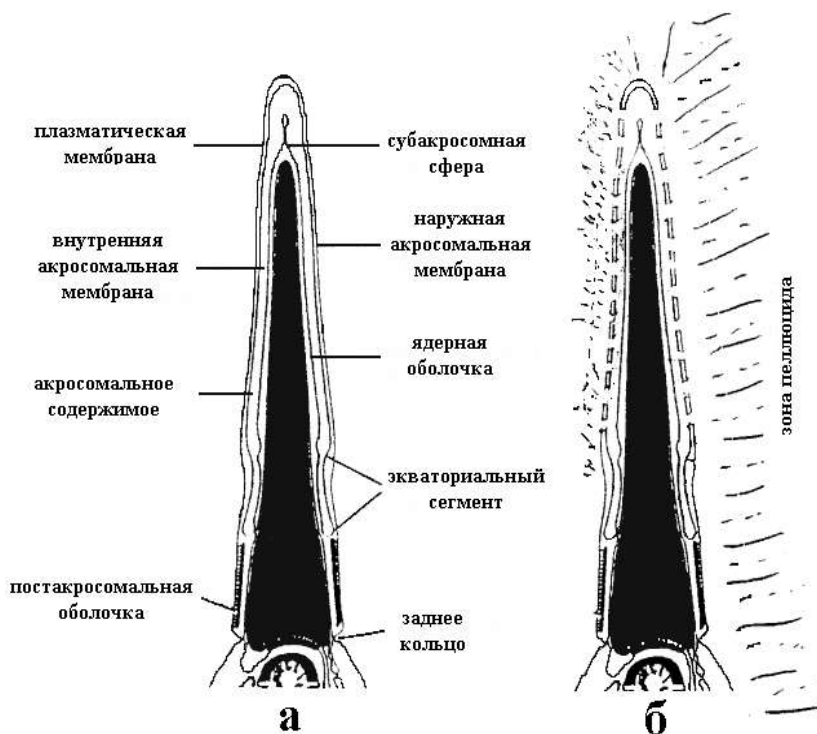
Рисунок 1.7 - Оплодотворение

1, 2, 3, 4 — стадии акросомной реакции; 5 — zona pellucida (блестящая зона); 6 — перивителиновое пространство; 7 — плазматическая мембрана; 8 — кортикальная гранула; 8а — кортикальная реакция; 9 — вхождение спермия в яйцеклетку; 10 — зонная реакция.

При капацитации блокировавшие фермент углеводы убираются и молекулы гликозилтрансферазы, на поверхности спермия, обнажаются. В норме этот фермент катализирует присоединение активированных остатков галактозы к углеводной цепи, оканчивающейся N-ацетилглюкозамином. Однако в половых путях самки активированные остатки галактозы отсутствуют. Поэтому гликозилтрансфераза спермия просто присоединяется к

N-ацетилглюкозаминовым остаткам белков прозрачной оболочки яйцеклетки. Таким образом, по типу ключ-замок прикрепляется спермий к ооциту.

Акрсомная реакция приводит к выделению ферментов, лизирующих связи между фолликулярными клетками, окружающими ооцит (рисунок 1.8). Ферменты, выделенные из акросомного пузырька, называют лизинами. Они включают гиалуронидазу, расщепляющую гиалуроновую кислоту матрикса, и фермент, рассеивающий клетки лучистого венца. Кроме того, спермии содержат акрозин, разрушающий прозрачную оболочку в месте прикрепления.



а – интактный спермий

б – спермий в процессе слияния плазмы яйцеклетки и наружной акросомальной мембраны

Рисунок 1.8 – Схематичное изображение акросомной реакции

Морфологическим выражением акросомной реакции является разрыв акросомного пузырька, который происходит в результате кальций-зависимого слияния наружной акросомной мембраны и прилежащей к ней плазматической мембраны спермия в передней половине головки. Во время акросомной реакции плазматическая мембрана, покрывающая постакрсомальную область головки (ее экваториальный сегмент), приобретает свойства, делающие возможным слияние этой части плазматической мембраны спермия с плазматической мембраной яйцеклетки.

Спермии быстро проходят через блестящую оболочку. Это прохождение осуществляется благодаря совместным действиям акрозина, связанного с внутренней акросомной мембраной, и активных движений хвоста спермия. Пройдя через блестящую оболочку спермий, попадает в перивителлиновое пространство. Если блок полиспермии функционирует на уровне блестящей оболочки, то в перивителлиновое пространство попадает один спермий. Если полиспермия блокируется на уровне плазматической мембраны яйцеклетки, то в перивителлиновом пространстве можно найти много спермиев, хотя только один из них сольется с яйцеклеткой.

Спермий сливается с плазматической мембраной яйцеклетки экваториальным постакрсомальным районом головки. Процесс слияния происходит при взаимодействии этого специализированного района мембраны спермия и микроворсинок плазматической мембраны яйцеклетки и занимает несколько минут.

После проникновения в яйцеклетку головка спермия быстро теряет оболочки, и хроматин начинает деконденсироваться. Вследствие контакта деконденсирующегося хроматина спермия с цитоплазмой яйца происходят локальные изменения субкортикального слоя, в который попадает спермий. Молекулы глобулярного актина полимеризуются, образуя скопление микрофиламентов. Плазматическая мембрана яйцеклетки выпячивается, образуя «бугорок» и теряя микроворсинки, появляется так называемый конус оплодотворения.

1.5 ПРЕДИМПЛАНТАЦИОННОЕ РАЗВИТИЕ

Деление бластомеров эмбриона происходит синхронно, так что при каждом дроблении количество бластомеров удваивается.

До середины 2-клеточной стадии зародыши полностью зависят от ооплазматических запасов белков и м-РНК. С середины 2-клеточной стадии активируются гены зародыша. В это же время начинают разрушаться м-РНК ооцита, но белки, транслированные с этих м-РНК сохраняются до стадии бластоцисты, а некоторые и позже. В конце двухбластомерной стадии в некоторых ядрах появляются типичные ядрышки, то есть активируются рибосомальные гены зародыша. Эти гены, на данной стадии, экспрессируются и в основном они необходимы для поддержания жизнедеятельности клеток. Ядра, находясь под контролем цитоплазматических факторов яйца, выполняют преимущественно функции клеточных органоидов, обеспечивающих упорядоченность дробления.

До стадии развития в 16 клеток бластомеры располагаются свободно друг от друга и легко различимы. Во время последующих двух делений, в ходе которых возникает морула, бластомеры (от 16 до 64) начинают уплотняться. Этот процесс называется компактизацией. Компактизация, представляет самое важное отличие дробления зародышей от всех других типов дробления.

Известно, что плазматическая мембрана каждого бластомера покрыта микроворсинками, которые возникают, благодаря образованию актиновых микрофиламентов. При помощи микроворсинок соседние бластомеры прикрепляются друг к другу. Медиаторами межклеточной адгезии служат гликопротеины, функционирующие на поверхностях микроворсинок. Одним из этих гликопротеинов является увоморулин. Антитела к увоморулину вызывают декомпактизацию бластомеров. При компактизации происходит уплощение контактирующих поверхностей соседних бластомеров, микроворсинки укорачиваются путем деполимеризации актина. Таким образом, бластомеры приобретают полярность, которая выражается в наличии микроворсинок только на наружной части их мембран, не контактирующей с

другими бластомерами, а также в асимметричном расположении внутриклеточных компонентов.

Плоскость следующего деления ориентирована так, чтобы использовать эту асимметрию для создания двух различных потомков поляризованного бластомера - полярной клетки, которая располагается снаружи морулы, и аполярной, расположенной внутри нее. Так, клетки компактизированного зародыша делятся и образуют 16- и 32-клеточную морулу. После компактизации тесная упаковка бластомеров стабилизируется более совершенными межклеточными контактами: внутри морулы, между клетками, возникают щелевые контакты, а на поверхности морулы образуются плотные контакты, что приводит к изоляции внутренних клеток морулы.

Во время 6-го - 7-го делений дробления морула преобразуется в бластоцисту (зародышевый пузырек). Стадия бластоцисты играет важную роль, так как при преобразовании морулы в бластоцисту происходит первый процесс дифференцировки. Большая часть потомков наружных клеток морулы становится клетками трофобласта. Эта группа клеток не образует эмбриональных структур, а превращается в хорион, участвующий в образовании плаценты. Ткани плаценты обеспечивают получение плодом кислорода и питательных веществ от матери; секретируют гормоны, необходимые для вынашивания плода; синтезируют регуляторы иммунного ответа, благодаря которым мать не отторгает зародыш. Однако клетки трофобласта не способны образовывать ни одной клетки самого зародыша. Они необходимы для имплантации зародыша в стенку матки.

Внутренние (аполярные) клетки 16-клеточной морулы, к которым иногда добавляются и наружные (при переходе к 32-клеточной стадии) образуют эмбриобласт - внутреннюю клеточную массу. Клетки эмбриобласта предназначены для развития зародыша и для индукции процессов, необходимых для полноценной имплантации и плацентации. Внутренняя клеточная масса, вместе с трофобластом, также участвует в формировании зародышевых оболочек.

Установлено, что бластомеры, которые на 2-клеточной стадии делятся первыми, с большей вероятностью оказываются среди внутренних клеток морулы, а значит и среди клеток эм-

бриобласта. Следовательно, они имеют большую вероятность попасть в состав тела зародыша.

Морула представляет собой шаровидное скопление бластомеров, лишенное полости, а бластоциста - пузырек, состоящий из стенки (трофобласт), полости с жидкостью (бластоцель) и скопления клеток эмбриобласта на одном из полюсов внутренней поверхности трофобласта.

Процесс образования полости, то есть образования бластоцисты, называется кавитацией. Накопление жидкости в зародыше требует затрат энергии и зависит от активного переноса ионов Na во внутренние межклеточные пространства. В плазматических мембранах клеток трофобласта имеется калий-натриевый насос, который переносит ионы Na внутрь зародыша, при этом осмотическое давление повышается и сюда начинает поступать жидкость. Накапливаясь между бластомерами, жидкость отодвигает бластомеры к одному из полюсов трофобласта, здесь из них формируется эмбриобласт. Плотные контакты, которыми соединяются клетки трофобласта помогают удерживать жидкость в полости.

Чем больше бластополость и лучше развита внутренняя клеточная масса и трофобласт – тем больше потенциал эмбриона к имплантации. Когда полость бластоцисты достигает значительного размера, истощившаяся за счет растяжения зона пеллюцида разрывается и начинается процесс **хэтчинга**, т.е. выхода бластоцисты из зоны пеллюцида. Только после окончания этого процесса бластоциста способна имплантироваться в эндометрий матки.

1.6 ТОТИПОТЕНТНОСТЬ

Зигота содержит полный набор генов и всю генетическую информацию данного вида, породы и особи.

Тотипотентность – это способность клетки к формированию любой ткани, вплоть до развития из неё нормальной особи.

Клетки (бластомеры) ранних эмбрионов (вплоть до 8-клеточной стадии) идентичны и вплоть до 8-клеточной стадии зародыш обладает поразительной способностью к регуляции развития, то есть из каждого отдельного бластомера может образоваться полноценное животное. Это означает, что бластомеры способны заменять друг друга, что дает возможность возникновения эмбриона из одного бластомера. Деградированные бластомеры заменяются хорошими, на всех стадиях развития, до наступления процесса компактизации. Также, из поделенных пополам морул и бластоцист, половинки которых содержат клетки эмбрио- и трофобласта, можно получить полноценный эмбрион.

Возникновение однояйцевых близнецов – это естественное свойство тотипотентности. Использование этого свойства дает возможность получать идентичных близнецов.

1.7 ВРЕМЕННЫЕ ПАРАМЕТРЫ РАЗВИТИЯ ЭМБРИОНОВ

Овуляция у нормально циклирующих коров происходит через 30-32 ч после начала течки. Оплодотворение ооцита полноценным спермием наступает уже через 3-4 ч после овуляции. Слияние пронуклеусов происходит через 15 ч. после оплодотворения. Оплодотворенные *in vitro* яйцеклетки коров достигают 2, 4 и 8-клеточной фазы в период между 15-24 ч, 35-40 ч и через 45-50 ч после оплодотворения. Ранние и поздние морулы, а также ранние бластоцисты появляются через 120 часов. Через 8 суток в среде обнаруживаются поздние и экспандированные бластоцисты, через 264 часа (11 суток) – вышедшие из зоны пеллюцида.

В таблице 1 указана динамика развития эмбрионов *in vitro* и *in vivo*.

Таблица 1 – Динамика развития эмбрионов *in vitro* и *in vivo*

Стадия развития	Время развития, ч	
	<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>
2-клеточные	15-24	24-72
4-клеточные	35-40	48-72
8-клеточные	45-50	72-120
16-клеточные	45-50	96-120
Мо I	120-144	120-144
Мо II	120-172	120-168
Бл I	120-172	168-192
Бл II	192-216	168-216
Бл III	192-216	192-240
Бл IV, V	264	216-264

2. ОБЩИЕ ПОДХОДЫ К ОЦЕНКЕ КАЧЕСТВА КЛЕТОК

Оценка состояния зародышей служит для отбора неоплодотворенных яйцеклеток и определения стадии развития эмбрионов, а также выявления повреждений отдельных бластомеров или всего эмбриона. Морфологическая оценка является основным методом определения качества клеток. При этом учитываются основные морфологические признаки полноценности зародышей, которые могут визуальнo наблюдаться у эмбриона, а именно: целостность и равномерность развития бластомеров, прозрачность перивителинового пространства, целостность зоны пеллюцида, соответствии стадии развития возрасту эмбриона. Частицы на поверхности зоны пеллюцида указывают на возможность бактериального заражения. Часто при инфицировании половых органов доноров яйцеклетки остаются неоплодотворенными. Различия в величине между бластомерами в пределах

2:1 оцениваются как нормальные, так как к исследованию попадают эмбрионы при различной последовательности циклов деления. Более сильные различия величины (4:1 и больше) возникают, если отдельные бластомеры прекращают деление. Сжатие бластомеров - это в большинстве случаев последствие гипертонических нагрузок. Деформация возникает при измененном внутреннем давлении клеток, или в результате дефектов в клеточных мембранах.

По результатам оценки делается заключение о качестве эмбриона и принимается решение о его дальнейшем использовании.

3. ООЦИТЫ И ЯЙЦЕКЛЕТКИ

3.1 МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ООЦИТОВ IN VITRO

Использование технологии *in vitro* с достаточной эффективностью невозможно без определения способности половых клеток к полноценному созреванию и оплодотворению. Одним из классических способов определения жизнеспособности ооцитов считается оценка их морфологического состояния с использованием прижизненной микроскопии.

Популяция выделенных фолликулярных ооцитов является весьма неоднородной как по морфологии, так и по функциональному состоянию. У 30% всех яйцеклеток выявляются видимые признаки дегенерации: сжатие или фрагментация ооплазмы, увеличение перивителинового пространства, отслоение или полное отсутствие кумулюса; деформированная, неравномерная по толщине прозрачная оболочка и др. Остальные клетки можно считать пригодными для культивирования, однако при цитогенетическом анализе ооцитов после 24 часов культивирования обнаруживается около 80% зрелых, пригодных к оплодотворению яйцеклеток.

В организме самки ооциты созревают в фолликуле. Тесная связь ооцита и окружающих его кумулюсных клеток обеспечивает его нормальное развитие и созревание.

По состоянию кумулюса яйцеклетки можно подразделить на следующие группы:

1. Ооциты с компактным, многослойным, плотно прилегающим к ооциту, кумулюсом.
2. Ооциты с разрыхленным многослойным кумулюсом.
3. Ооциты с разрыхленным, частично отслоившимся кумулюсом или в виде разрозненных участков, покрывающих ооцит.

Ооплазму у ооцита можно охарактеризовать по следующим признакам:

1. Мелкозернистая, равномерно заполняющая пространство под прозрачной оболочкой.
2. Ооплазма с участками гранулярной конденсации, равномерно заполняющая пространство под прозрачной оболочкой.

Прозрачная оболочка, обеспечивающая связь внутренних структур ооцита с внешней средой, характеризуется следующими данными: опалесцирующая, равномерная по ширине, округлой формы.

Из морфологической оценки качества вышеперечисленных структур складывается общая оценка качества ооцит-кумулюсного комплекса и его способности к дальнейшему развитию и созреванию (таблица 2). Популяцию полученных ооцит-кумулюсных комплексов рекомендуется разделять на группы по следующим морфологическим признакам:

- 1 группа - компактный, многослойный, плотно прилегающий к ооциту кумулюс; ооплазма мелкозернистая, равномерно заполняющая пространство под прозрачной оболочкой;
- 2 группа - компактный, многослойный, плотно прилегающий к ооциту кумулюс; ооплазма имеет участки гранулярной конденсации;
- 3 группа - разрыхленный многослойный кумулюс; ооплазма имеет участки гранулярной конденсации;
- 4 группа - частично отслоившийся рыхлый кумулюс; ооплазма с гранулярной конденсацией;
- 5 группа - ооциты без кумулюса с мелкозернистой ооплазмой, равномерно заполняющей пространство под прозрачной оболочкой.

Таблица 2 - Классификация ооцит-кумулюсных комплексов

№ п/п	Морфологические признаки	Оценка
1	Многослойный компактный кумулюс (не менее 3-х слоев) плотно прилегающий к зоне пеллюцида, ооплазма мелкозернистая, равномерно заполняет пространство под прозрачной оболочкой, которая равномерная по толщине, опалесцирует, не имеет никаких нарушений, округлая по форме	5
2	Многослойный компактный или разрыхленный кумулюс, плотно прилегающий к зоне пеллюцида, ооплазма имеет участки гранулярной конденсации, прозрачная оболочка округлая, опалесцирует, не имеет дефектов, равномерная по толщине	4
3	Частично отслоившийся кумулюс, ооплазма имеет участки гранулярной конденсации, прозрачная оболочка равномерная по толщине, округлая по форме	3
4	Ооцит без кумулюса, ооплазма мелкозернистая, равномерно заполняет зону пеллюцида, прозрачная оболочка округлая, равномерная по толщине	2

3.2 МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ООЦИТОВ И ЯЙЦЕКЛЕТОК ПОЛУЧЕННЫХ *IN VIVO*

Оценка ооцитов заканчивается, если они были идентифицированы как “неоплодотворенные яйцеклетки”. Все неоплодотворенные яйцеклетки, которые вымываются из матки между 6-9 днем являются дегенерированными. Частым явление неоплодотворенных ооцитов является их сморщивание, смещение гранулярных составных частей цитоплазмы, а также их полное растворение. Фрагментативное разрушение ооплазмы ведет к образованию псевдобластомеров. Хорошо сохранившиеся ооциты могут встречаться даже на 7-14 день. Также нужно обращать внимание на то, что при некоторых формах дегенерации, и при

слабом увеличении микроскопа, ооциты можно перепутать с эмбрионами.

4. ЭМБРИОНЫ

4.1 ОБЩАЯ ОЦЕНКА

Все эмбрионы подвергнутые оценке относят к трем основным группам:

- нормально развитые (полноценные) эмбрионы;
- частично-дегенерированные эмбрионы;
- дегенерированные эмбрионы.

Реже встречаются нетипичные эмбрионы – это бластоцисты с отклонениями в области эмбрио- и трофобласта.

4.1.1 НОРМАЛЬНО РАЗВИТЫЕ (ПОЛНОЦЕННЫЕ) ЭМБРИОНЫ

Характеризуются полноценным делением всех бластомеров, которые образуют морулу и бластоцисту.

Под влиянием различных факторов могут образовываться дефекты ооцитов и эмбрионов. Эти дефекты ведут к отмиранию бластомеров. Если все бластомеры испорчены эмбрион дегенерирует.

4.1.2 ЧАСТИЧНО-ДЕГЕНЕРИРОВАННЫЕ ЭМБРИОНЫ

В отдельных случаях происходит дегенерация части бластомеров, которые располагаются наряду с нормальными бластомерами. Деградированные клетки можно идентифицировать на стадии развития - морула. Они проявляются как отдельный клеточный материал и всегда находятся в не связи компактно расположенных бластомеров.

4.1.3 ДЕГЕНЕРИРОВАННЫЕ ЭМБРИОНЫ

При полном разрушении бластомеров, при их неравномерном делении, задержке в развитии и др. эмбрион признается дегенерированным и непригодным к пересадке.

Признаки присущие эмбрионам находящимся на разных стадиях развития между 6 и 9 днем после овуляции, представлены в таблице 3.

Таблица 3. Признаки, определяющие стадию развития эмбриона

Стадия развития	Сокращенное название	Кол-во клеток	Диаметр, мкм	Признаки
1	2	3	4	5
Начальная стадия дробления		2-16	140-170	Бластомеры круглой или овальной формы, располагаются свободно.
МОУЛУЫ	Мо			Стадия компактизации: постепенное укрепление клеточных контактов.
Ранняя морула	Мо I	16-32	140-170	Начало компактизации: скопление клеток равномерное, бластомеры одинаковые по размеру, перивителлиновое пространство свободное от отдельных бластомеров, плазмы и других включений.
Поздняя морула	Мо II	32-64	140-170	Завершение компактизации: клеточный комплекс равномерный, крайние бластомеры одинаковой величины и наполнения, перивителлиновое пространство свободное от отдельных бластомеров, плазмы и других включений.
БЛАСТОЦИСТЫ	Бл			Образование эмбриобласта, трофобласта и бластополости.
Ранняя бластоциста	Бл I	64-130	140-170	Маленькая, преимущественно эксцентрическая бластополость в форме щели, различим эмбрио- и трофобласт.

Продолжение таблицы 3

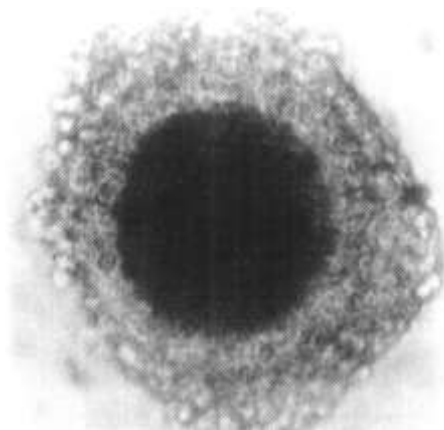
1	2	3	4	5
Поздняя бластоциста	Бл II	64-130	140-200	Эмбриобласт локализован, трофобласт равномерный, уменьшение перивителлинового пространства вследствие расширения бластополости.
Экспандированная бластоциста	Бл III	64-130	140-200	Эмбриобласт имеет четкие границы, из-за увеличения размеров бластополость расширяется и истончает зону пеллюцида.
Полностью экспандированная бластоциста	Бл IV	130-200	180-220	Эмбриобласт обозначен четко, расширение и истончение зоны пеллюцида, максимально увеличена бластополость.
Бластоциста выходящая из зоны пеллюцида	Бл IV	Более 200	180-220	Происходит наклеивание и разрыв зоны пеллюцида. Эмбрио- и трофобласт начинает выходить из зоны.
Бластоциста вышедшая из зоны пеллюцида	Бл V	200-800	200-800	Шарообразная форма. Эмбрио- и трофобласт отчетливо различимы. Зона пеллюцида отсутствует.

5. ФОТОГРАФИИ ПО ОЦЕНКЕ КАЧЕСТВА ООЦИТОВ И ЭМБРИОНОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

5.1 ООЦИТЫ IN VITRO (после извлечения из фолликула)

Ооцит отличного качества

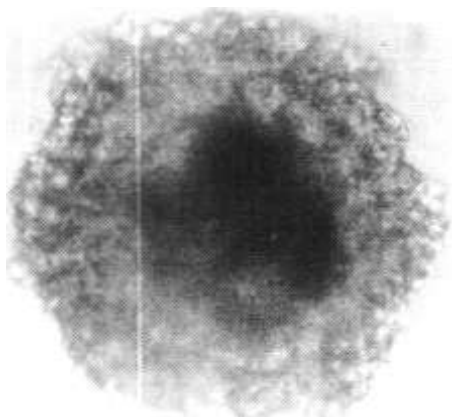
- Многослойный компактный кумулюс (не менее 3-х слоев) плотно прилегающий к зоне пеллюцида
- Ооплазма мелкозернистая, равномерно заполняет прозрачную оболочку
- Прозрачная оболочка апалесцирует
- Не имеет никаких нарушений
- Округлая по форме



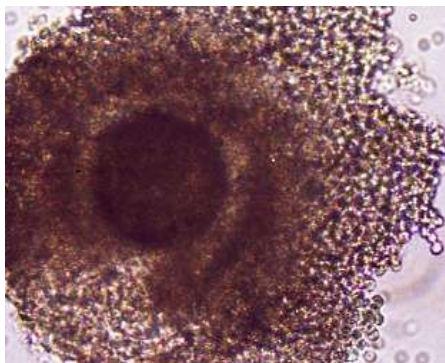
1

Ооцит хорошего качества

- Многослойный компактный или разрыхленный кумулюс, плотно прилегающий к зоне пеллюцида
- Ооплазма имеет участки гранулярной конденсации
- Прозрачная оболочка округлая, опалесцирующая, не имеет дефектов, равномерная по толщине



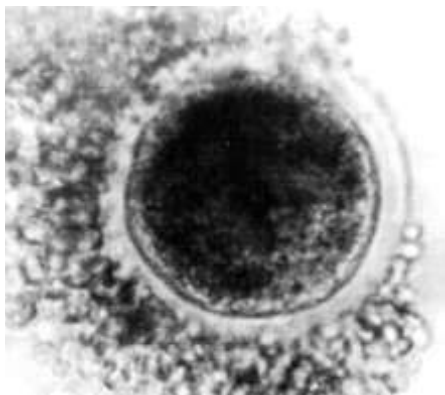
2



3

Ооцит хорошего качества

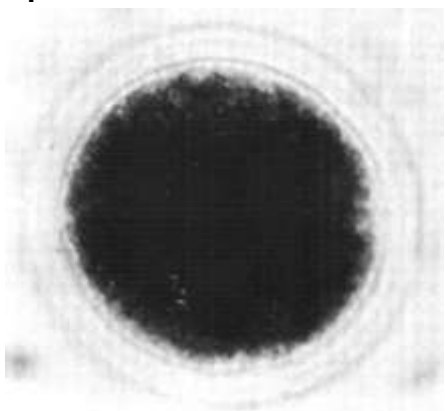
- Многослойный компактный или разрыхленный кумулюс, плотно прилегающий к зоне пеллюцида
- Ооплазма имеет участки гранулярной конденсации
- Прозрачная оболочка округлая, опалесцирующая, не имеет дефектов, равномерная по толщине



4

Ооцит удовлетворительного качества

- Частично отслоившийся кумулюс
- Ооплазма имеет участки гранулярной конденсации
- Прозрачная оболочка равномерная по толщине, округлая по форме



5

Ооцит непригодный для культивирования

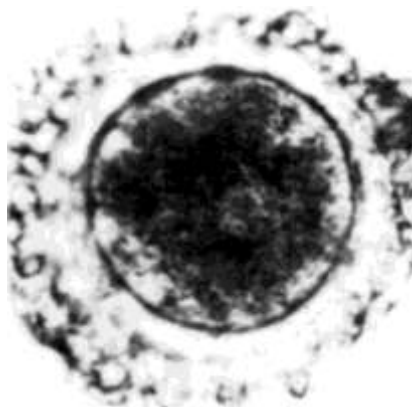
- Ооцит без кумулюса
- Ооплазма мелкозернистая, равномерно заполняет зону пеллюцида
- Прозрачная оболочка округлая, равномерная по толщине

5.2 ООЦИТЫ И ЯЙЦЕКЛЕТКИ IN VIVO

0...1 день

Ооцит

Ооцит с кумулюсными клетками (ооцит-кумулюсный комплекс), способный к оплодотворению



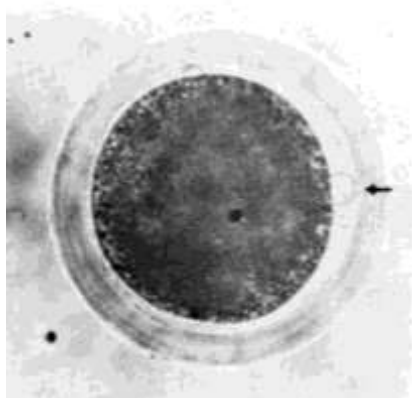
6

0...1 день

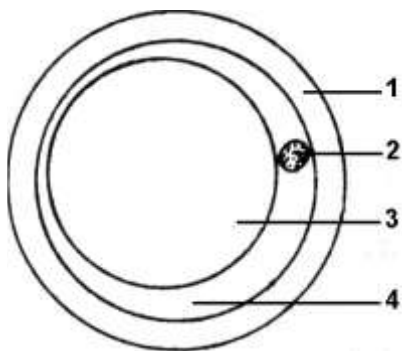
Яйцеклетка

Яйцеклетка без кумулюсных клеток с первым полярным тельцем, способная к оплодотворению

- Первое полярное тельце указано стрелкой



7 а



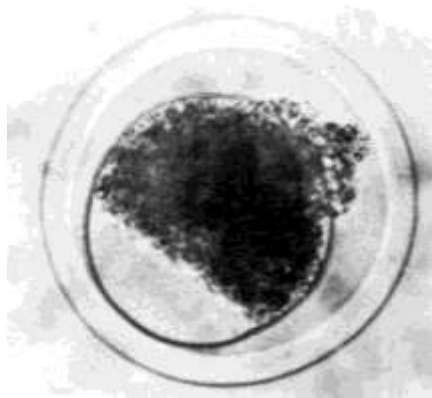
7 6

0...1 день Яйцеклетка

Схема яйцеклетки с первым полярным тельцем без кумулюсных клеток

Способная к оплодотворению

1. Зона пеллюцида
2. Полярное тельце 1
3. Ооплазма
4. Перивителлиновое пространство



8

6 день Яйцеклетка

- Незначительное сморщивание, фрагментация ооплазмы
- Смещение гранулярных составных частей цитоплазмы



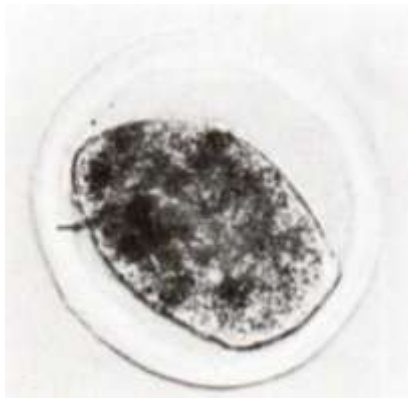
9

7 день Яйцеклетка

- Незначительное сморщивание ооплазмы
- Имеется полярное тельце (указано стрелкой)

**7 день
Яйцеклетка**

- Сморщивание, деформация, агглютинация гранулярных составных частей цитоплазмы (указано стрелкой)



10

**7 день
Яйцеклетка**

- Выпячивания цитоплазмы похожие на бластомеры

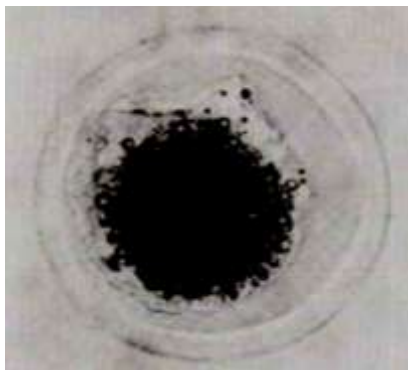
(можно спутать с морулой)



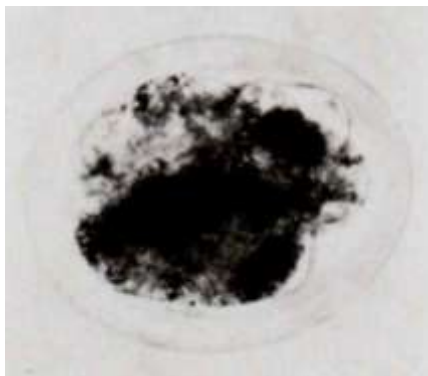
11

**7 день
Яйцеклетка**

- Амёбовидные отростки, смещение гранулярных составных частей цитоплазмы



12

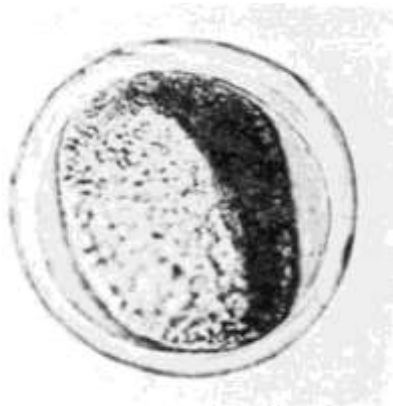


13

7 день Яйцеклетка

- Фрагментация ооплазмы

(часто можно спутать с сильно задержавшимся в развитии дегенерированным эмбрионом)



14 а

7 день Яйцеклетка

- Деформация, смещение гранулярных составных частей цитоплазмы

(можно спутать с бластоцистой)



14 б

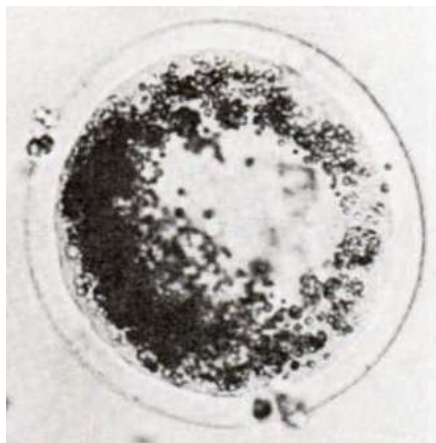
7 день Яйцеклетка

Вид сбоку (рис. 14 а)

8 день
Яйцеклетка

- Сильно дегенерирована
- Остатки цитоплазмы в перивителлиновом пространстве после лизиса клеток ооцита

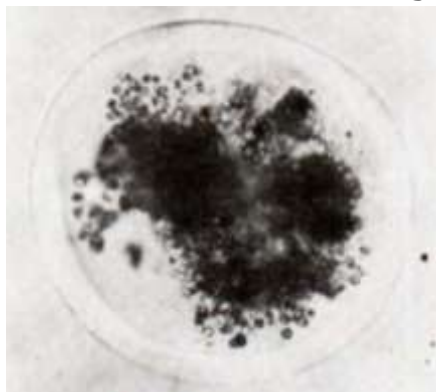
(при слабом увеличении можно спутать с бластоцистой)



15

7 день
Яйцеклетка

- Сильно дегенерирована
- Фрагментация, лизис цитоплазмы (можно, спутать с сильно задержавшимся в развитии, дегенерировавшим эмбрионом)



16

5.3 ЭМБРИОНЫ НА РАННИХ СТАДИЯХ РАЗВИТИЯ



17

1-2 день

Эмбрион *in vitro*

на 2-х клеточной стадии

- Многочисленные спермии на наружной поверхности зоны пеллюцида (видна разница в размерах эмбриона и спермиев)
- Добавочные спермии в оплодотворении *in vivo* не участвуют
- Нормальная дислокация гранулезных цитоплазматических составных частей



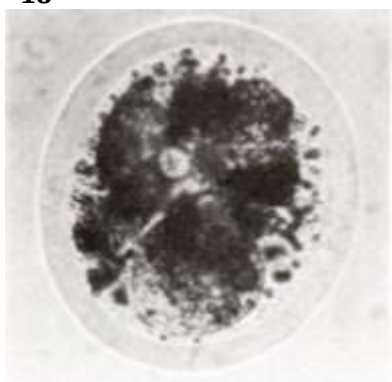
18

6 день

4-х клеточный эмбрион

- Бластомеры сильно деформированы
- Не пропорциональное деление бластомеров
- Значительное отставание в развитии

Непригодный для трансплантации



19

6 день

4-х клеточный эмбрион

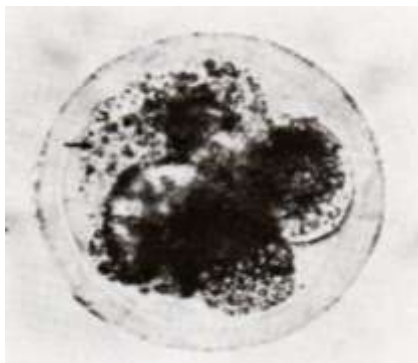
- Прогрессирующая дегенерация
- Лизис бластомеров
- Сильная задержка в развитии

Непригодный для трансплантации

**6 день
5-клеточный эмбрион**

- Наличие плазмы в перивителиновом пространстве (указано стрелкой)
- Лизис бластомеров
- Задержка в развитии

Непригодный для трансплантации



20

**6 день
6-клеточный эмбрион**

- Неравномерное дробление
- Сильная задержка в развитии

Непригодный для трансплантации



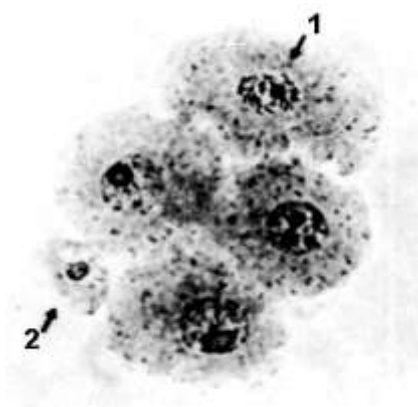
21

2-3 день

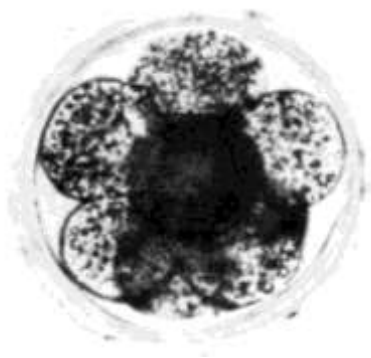
**Эмбрион с 6-ю бластомерами
при переходе на 8-клеточную
стадию**

- Видны клеточные ядра, из них 3 в интерфазе и 1 в прометафазе (1), полярное тельце 2 (2)

(ацето-орсеиновое окрашивание)



22

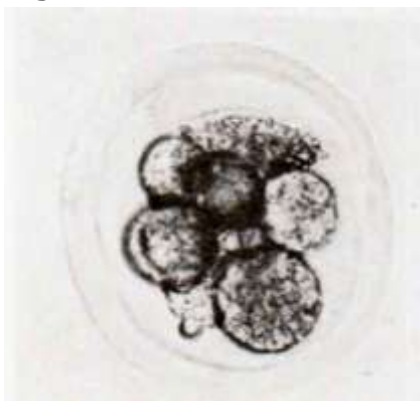


3-4 день

**Эмбрион на 8-клеточной
стадии развития**

Непригодный для трансплантации

23



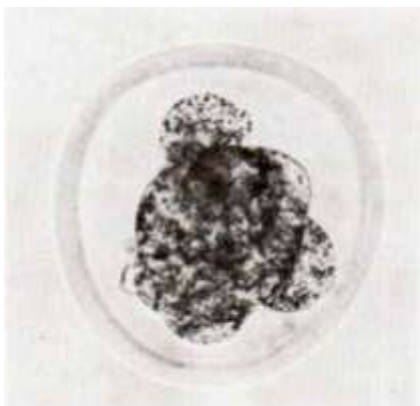
6 день

10-ти клеточный эмбрион

- Бластомеры различные по размерам
- Неравномерное дробление
- Деформация бластомеров
- Задержка в развитии

Непригодный для трансплантации

24



6 день

Эмбрион с 13 бластомерами

- Задержка в развитии
- Частичный лизис бластомеров
- Неравномерное дробление

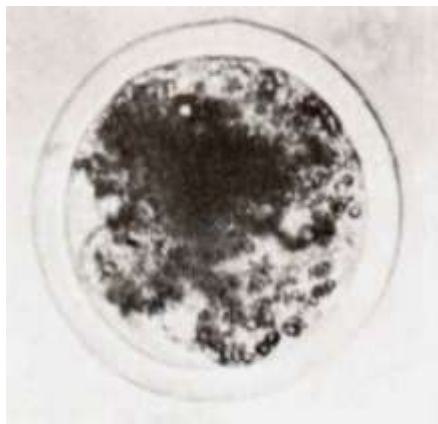
Непригодный для трансплантации

25

6 день
16-ти клеточный эмбрион

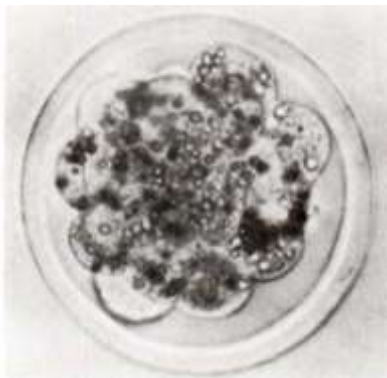
- Прогрессирующая дегенерация (фрагментация и лизис бластомеров)
- Задержка в развитии

Непригодный для трансплантации

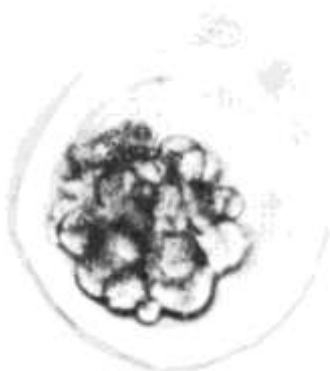


26

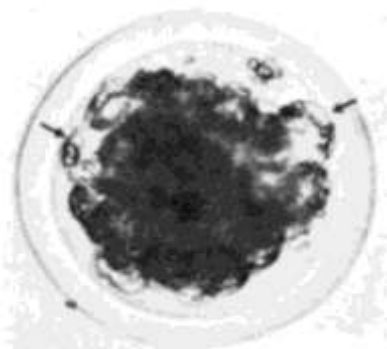
5.4 МОРУЛЫ



27



28



29

5-6 день

Ранняя морула (Мо I)

- Начало процесса уплотнения (компактизации)
- Скопление клеток равномерное
- Бластомеры одинаковы по величине и тургору
- Перивителлиновое пространство свободно от отдельных бластомеров плазмы и других включений

Пригодный для трансплантации
6 день

Ранняя морула (Мо I)

- Деформация и сморщивание бластомеров
- Нарушение тургора, в связи с чем зона пеллюцида не округлая, деформированная

Эмбрион **неудовлетворительного качества**, для пересадки непригодный

7 день

Ранняя морула (Мо I)

- Нарушение межклеточных связей (указано стрелкой)
- В перивителлиновом пространстве имеются отдельные бластомеры

Эмбрион **удовлетворительного качества**, пригодный для трансплантации

6 день
Ранняя морула (Мо I)

- Нарушение межклеточных связей
- Бластомеры разной величины
- Наличие плазмы в перивителлиновом пространстве

Эмбрион **удовлетворительного качества**, условно годный для трансплантации



30

6 день
Ранняя морула (Мо I)

- Компактизация еще не закончена, имеются хорошие межклеточные связи, перивителлиновое пространство свободно от отдельных бластомеров и плазмы, бластомеры одинаковы по величине и тургору, клеточные границы отчетливы, равномерное распределение цитоплазматических гранул.

Эмбрион **отличного качества**, пригодный для трансплантации



31

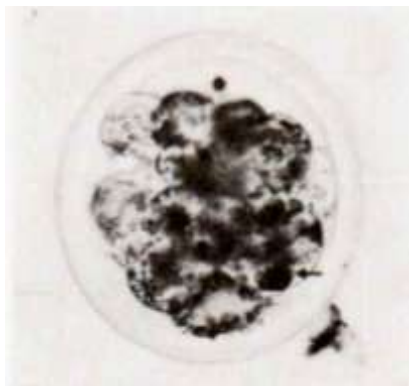
6 день
Ранняя морула (Мо I)

- Около 50% дефектных бластомеров (указано стрелкой)
- Межклеточные связи хорошие
- Клеточные границы отчетливы
- Цитоплазматические гранулы распределены равномерно.

Эмбрион **удовлетворительного качества**, пригодный для трансплантации



32



33

7 день
Ранняя морула (Mo I)

- Ослабление клеточных связей
- Бластомеры различаются по размерам
- Агглютинация цитоплазматических гранул (указано стрелкой)
- Небольшая задержка в развитии

Условно годный для трансплантации



34

6 день
Ранняя морула (Mo I)

- Межклеточные связи нарушены

Эмбрион **удовлетворительного качества**, условно годный для трансплантации



35

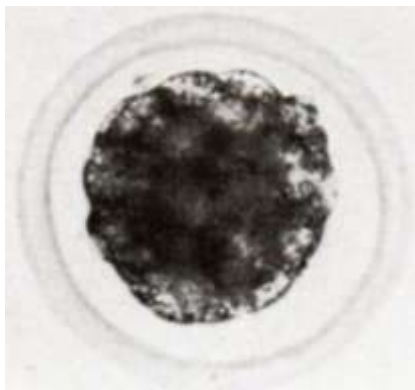
6 день
Ранняя морула (Mo I)

- Около 50% дефектных бластомеров (указано стрелкой)
- Задержка в развитии

Условно годный для трансплантации

6-7 день
Поздняя морула (Мо II)

- Процесс компактизации завершён
 - Скопление клеток равномерное
 - Крайние бластомеры одинаковы по величине и наполнению
 - Перивителлиновое пространство свободно от отдельных бластомеров, плазмы и других включений
- Эмбрион **отличного качества**, пригодный для трансплантации

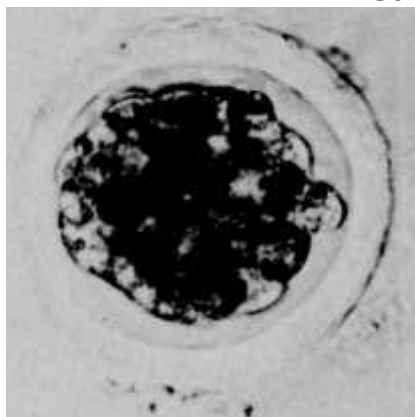


36

7 день
Поздняя морула (Мо II)

- Компактизация завершена
- Межклеточные связи хорошие
- Бластомеры одинаковые по величине и тургору
- Отчетливые клеточные границы

Эмбрион **отличного качества**, пригодный для трансплантации

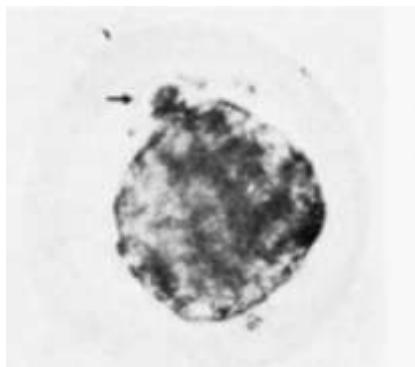


37

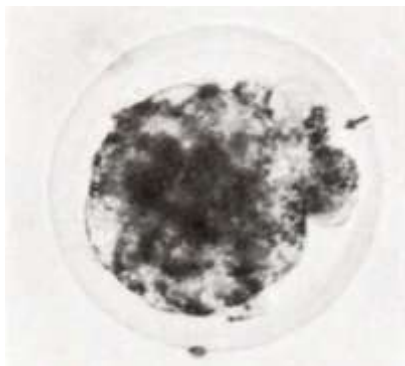
7 день
Поздняя морула (Мо II)

- До 5% дефектных бластомеров (указано стрелкой)
- Компактизация закончена
- Межклеточные связи хорошие
- Бластомеры одинаковые по величине и тургору
- Четкие клеточные границы

Эмбрион **хорошего качества**, пригодный для трансплантации



38



39

7 день
Поздняя морула (Мо II)

- Около 10% дефектных бластомеров (указано стрелкой)
- Компактизация закончена
- Бластомеры одинаковые по величине и тургору
- Четкие клеточные границы

Эмбрион **хорошего качества**, пригодный для трансплантации

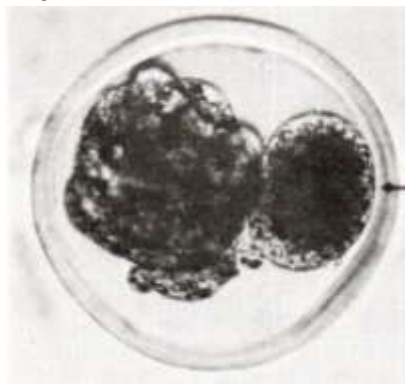


40

7 день
Поздняя морула (Мо II)

- Около 15% дефектных бластомеров (указано стрелкой)
- Компактизация закончена
- Бластомеры одинаковые по величине и тургору
- Четкие клеточные границы

Эмбрион **хорошего качества**, пригодный для трансплантации



41

7 день
Поздняя морула (Мо II)

- Около 30% дефектных бластомеров (указано стрелкой)
- Компактизация закончена
- Бластомеры одинаковые по величине и тургору
- Четкие клеточные границы

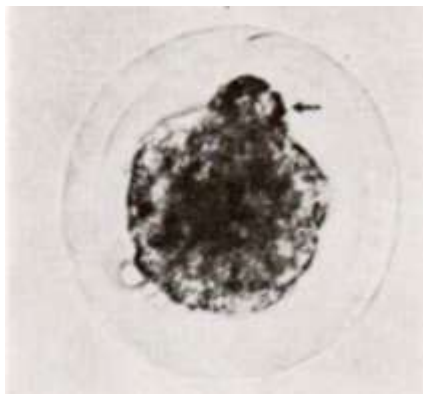
Эмбрион **удовлетворительного качества**, пригодный для трансплантации

7 день

Поздняя морула (Мо II)

- До 5% дефектных бластомеров (указано стрелкой)
- Компактизация закончена
- Межклеточные связи хорошие
- Бластомеры одинаковые по величине и тургору
- Четкие клеточные границы

Эмбрион **хорошего качества**, пригодный для трансплантации



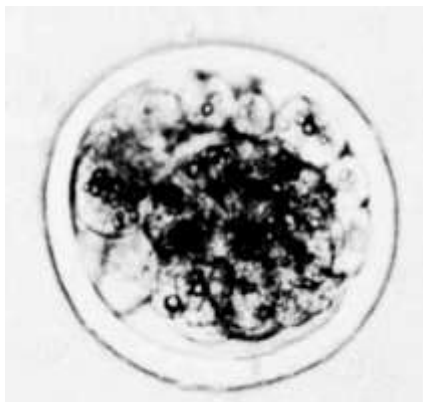
42

7 день

Поздняя морула (Мо II)

- Около 50% дефектных бластомеров
- Бластомеры разного размера
- Компактизация закончена
- Клеточные границы отчетливы

Эмбрион, **удовлетворительного качества**, пригодный для трансплантации

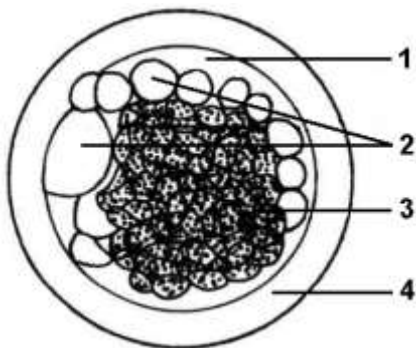


43 а

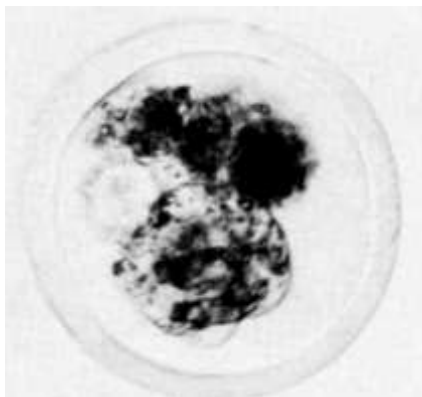
7 день

Поздняя морула (Мо II)

1. Перивителлиновое пространство
2. Экстра-эмбриональный клеточный материал
3. Бластомеры
4. Зона пеллюцида



43 б

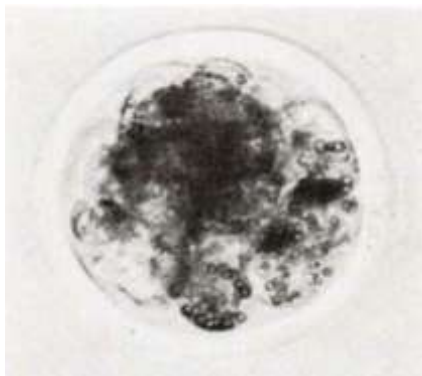


44

7 день Поздняя морула (Mo II)

- Около 75% дефектных бластомеров разного размера
- Компактизация закончена
- Межклеточные связи хорошие

Эмбрион **удовлетворительного качества**, условно годный для трансплантации



45

7 день Поздняя морула (Mo II)

- Около 75% дефектных бластомеров разного размера
- Компактизация закончена

Эмбрион **удовлетворительного качества**, условно годный для трансплантации



46

7 день Поздняя морула (Mo II)

Непосредственно после насыщения глицерином

- Восстановление бластополости (указано стрелкой)

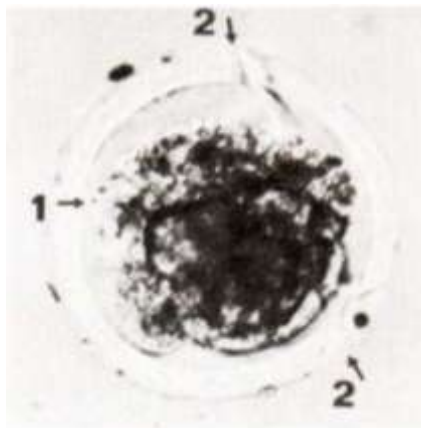
Эмбрион **отличного качества**, пригодный для криоконсервации

7 день
Поздняя морула (Мо II)

Через 2 часа после насыщения глицерином

- Около 50% поврежденных, частично литических бластомеров (1)
- Дезинтеграция клеточных связей в области поврежденных бластомеров
- Разрыв зоны пеллюцида (2)

Эмбрион **не пригоден** для
криоконсервации



47

5.5 БЛАСТОЦИСТЫ

7 день

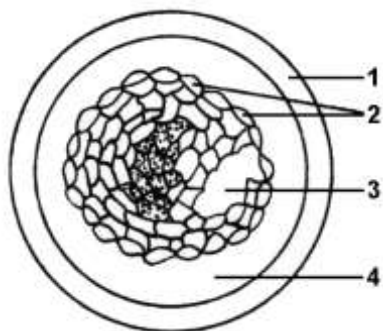
Ранняя бластоциста (Бл I)

- Образование трофобласта по периферии крайних бластомеров
- Возникновение бластополости (указано стрелкой)
- Перивителлиновое пространство свободно от отдельных бластомеров, плазмы и других включений

Эмбрион **отличного качества**, пригодный для трансплантации



48 а



48 б

7 день

Схема ранней бластоцисты (Бл I)

1. Зона пеллюцида
2. Клетки трофобласта
3. Бластополость
4. Перивителлиновое пространство

7 день

Ранняя бластоциста (Бл I)

- Хорошие межклеточные связи
- Образование трофобласта и бластополости (указано стрелкой)
- Бластомеры одинаковые по величине и тургору
- Равномерное распределение цитоплазматических гранул
- Клеточные границы отчетливые
- Перивителлиновое пространство свободно от включений

Эмбрион **отличного качества**, пригодный для трансплантации



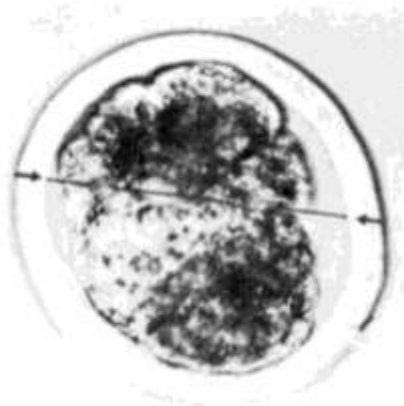
49

7 день

Ранняя бластоциста (Бл I)

- Около 50% дефектных бластомеров разного размера, наблюдается перетяжка (указано стрелкой)

Эмбрион удовлетворительного качества, пригодный для трансплантации



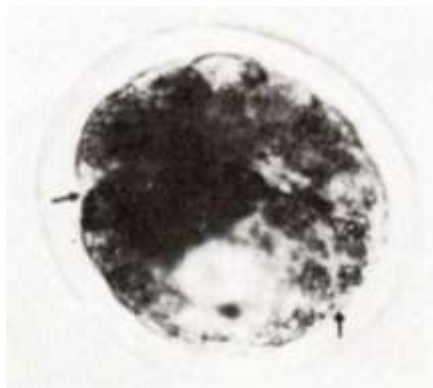
50

7 день

Ранняя бластоциста (Бл I)

- Около 50% дефектных бластомеров разного размера, наблюдается перетяжка (указано стрелкой)
- Трофобласт хороший

Эмбрион удовлетворительного качества, пригодный для трансплантации



51

7 день

Ранняя бластоциста (Бл I)

- Около 50% дефектных бластомеров
- Плазма в перивителлиновом пространстве
- Эмбриобласт локализован, расплывчатый
- Трофобласт нормальный

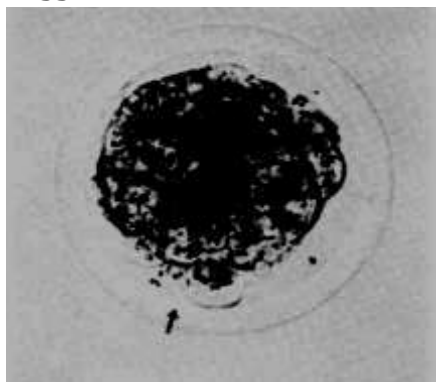
Эмбрион удовлетворительного качества, пригодный для трансплантации



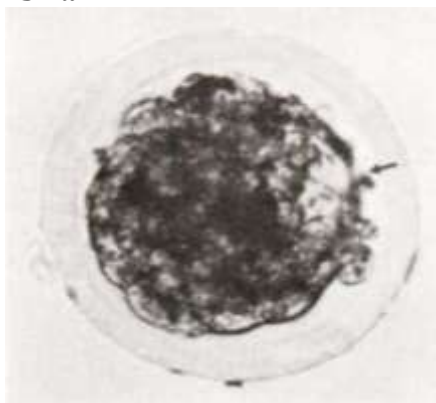
52



53



54 а



54 б

8 день

Ранняя бластоциста (Бл I)

- Около 5% дефектных бластомеров (указано стрелкой)
 - Межклеточные связи хорошие
 - Наличие отдельных бластомеров и плазмы в перивителиновом пространстве
 - Бластомеры одинаковые по величине и тургору
 - Клеточные границы отчетливы
- Эмбрион **хорошего качества** пригодный для трансплантации

7 день

Ранняя бластоциста (Бл I)

Непосредственно после насыщения глицерином

- Цитоплазма спадает
- Около 10% поврежденных бластомеров (указано стрелкой)

Эмбрион **хорошего качества**, пригодный для криоконсервации

7 день

Ранняя бластоциста (Бл I)

Через 2 часа после насыщения глицерином

- Увеличение бластополости (указано стрелкой)

Эмбрион **отличного качества**, пригодный для криоконсервации

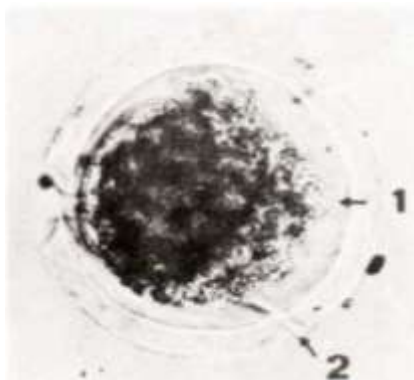
7 день

Ранняя бластоциста (Бл I)

Через 1 час после насыщения глицерином

- Около 50% поврежденных бластомеров
- Лизис мембраны бластомеров (1)
- Разрыв зоны пеллюцида (2)

Эмбрион **не пригоден** для дальнейшей криоконсервации



55

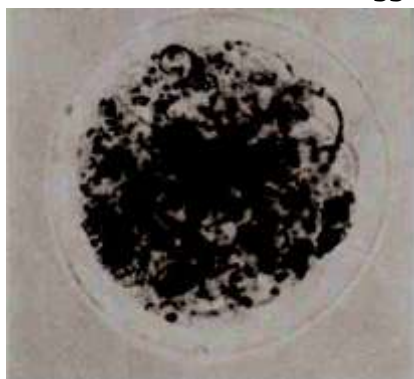
7 день

Ранняя бластоциста (Бл I)

Через 2 часа после насыщения глицерином

- Полная дезинтеграция клеточных связей
- Грануляции в цитоплазме
- Лизис бластомеров

Эмбрион **не пригоден** для дальнейшей криоконсервации



56

7 день

Ранняя бластоциста (Бл I)

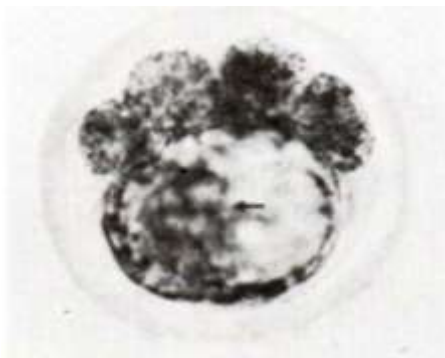
Через 1 час после насыщения глицерином

- Бластополость начинает увеличиваться (указано стрелкой)

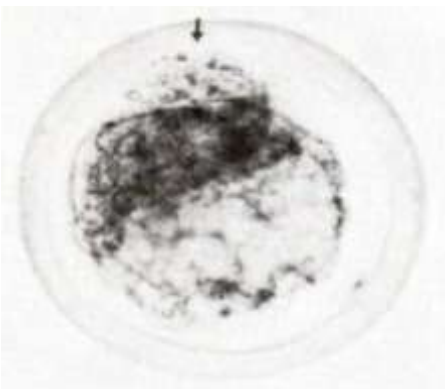
Эмбрион **отличного качества**, пригодный для криоконсервации



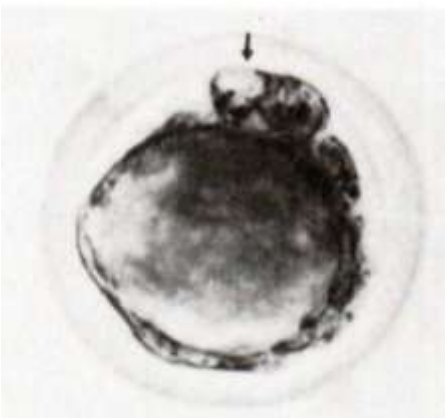
57



58



59



60

7 день

Поздняя бластоциста (Бл II)

- Около 50% дефектных бластомеров
- Эмбриобласт отчетливо выражен (указано стрелкой)
- Бластополость увеличивается
- Клеточные границы отчетливы
Эмбрион **удовлетворительного качества**, пригодный для трансплантации

7 день

Поздняя бластоциста (Бл II)

- Около 15% дефектных бластомеров (указано стрелкой)
- Эмбриобласт локализованный, отчетливо отграниченный
- Трофобласт неправильной формы
- Клеточные границы отчетливы
Эмбрион **удовлетворительного качества**, пригодный для трансплантации

7 день

Поздняя бластоциста (Бл II)

- Около 10% дефектных бластомеров (указано стрелкой)
- Эмбриобласт локализован, расплывчатый, нечеткий
- Трофобласт хорошо выражен
- Бластополость увеличивается
- Клеточные границы отчетливы

Эмбрион **удовлетворительного качества**, пригодный для трансплантации

7 день

Поздняя бластоциста (Бл II)

- Образование трофобласта
- Бластополость увеличена
- Перивителлиновое пространство еще заметно и свободно от отдельных бластомеров, плазмы и других включений

Эмбрион **отличного качества**,
пригодный для трансплантации



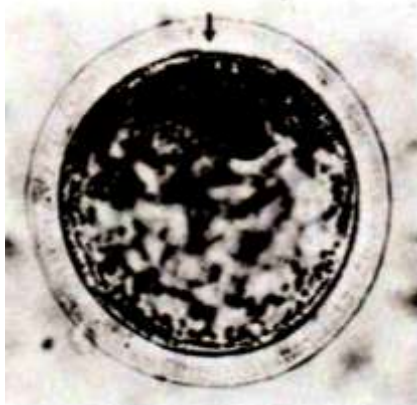
61

7-8 день

**Экспандированная бластоциста
(Бл III а)**

- Эмбриобласт локализован (указано стрелкой)
- Трофобласт равномерный
- Исчезновение перивителлинового пространства (вследствие расширения бластополости)

Эмбрион **отличного качества**,
пригодный для трансплантации

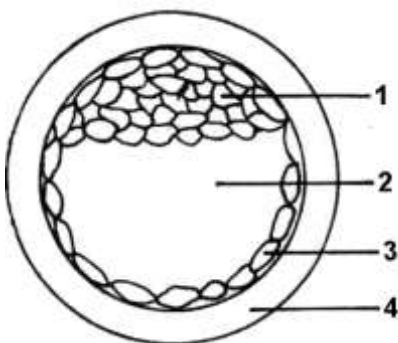


62 а

7-8 день

**Схема
экспандированной бластоцисты
(Бл III)**

1. Клетки эмбриобласта
2. Бластополость
3. Клетки трофобласта
4. Зона пеллюцида



62 б

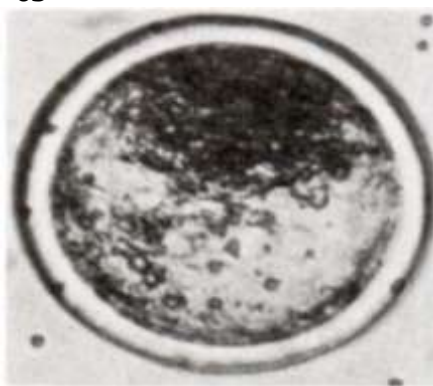


63

7 день
Экспандированная
бластоциста (Бл III)

- Около 25% дефектных бластомеров (указано стрелкой)
- Трофобласт правильной формы
- Клеточные границы отчетливы.

Эмбрион **удовлетворительного качества**, пригодный для трансплантации

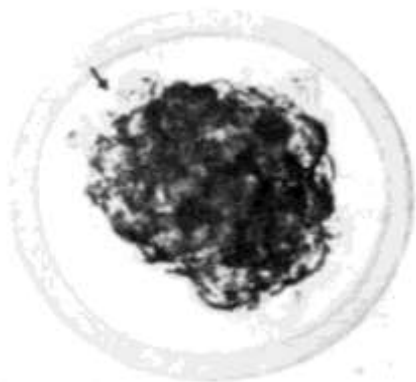


64

8 день
Экспандированная
бластоциста (Бл III)

- Эмбриобласт локализован и отчетливо ограничен

Эмбрион **отличного качества**, пригодный для трансплантации



65

7 день
Экспандированная
бластоциста (Бл III)

Непосредственно после насыщения глицерином

- Спадается клеточный материал
- Около 10% поврежденных бластомеров (указано стрелкой)

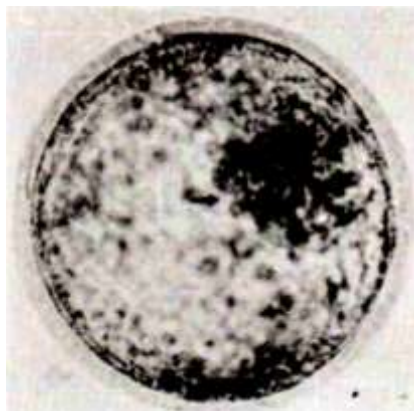
Эмбрион **хорошего качества**, пригодный для криоконсервации

7-8 день

**Полностью экспандированная
бластоциста (Бл IV)**

- Эмбриобласт имеет четкие границы (указано стрелкой)
- Расширение и истончение зоны пеллюцида
- Максимально увеличена бластополость
- Трофобласт правильной формы, равномерный

Эмбрион **хорошего качества**,
пригодный для криоконсервации

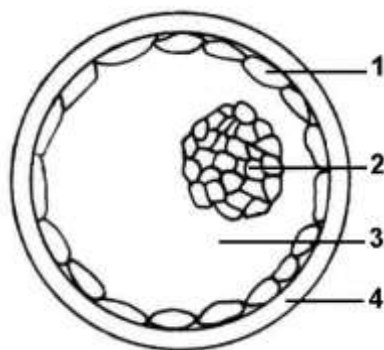


66 а

7-8 день

**Схема полностью экспандированной
бластоцисты (Бл IV)**

1. Клетки трофобласта
2. Клетки эмбриобласта
3. Бластополость
4. Зона пеллюцида



66 б

8 день

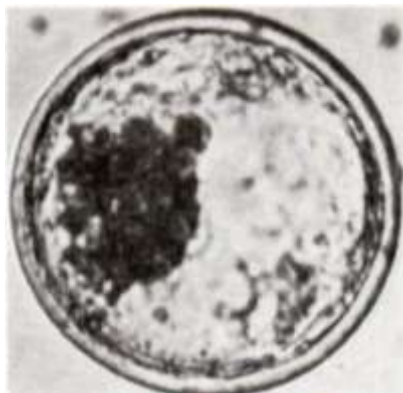
**Экспандированная бластоциста
(Бл III)**

- Эмбриобласт локализован и отчетливо отграничен

Эмбрион **отличного качества**,
пригодный для трансплантации



67

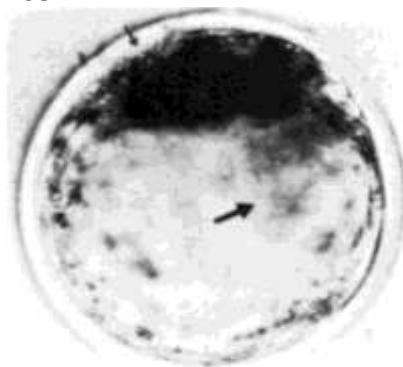


68

8 день
Полностью экспандированная
бластоциста (Бл IV)

- Эмбриобласт локализован и отчетливо отграничен

Эмбрион **отличного качества**, пригодный для трансплантации



69

8 день
Экспандированная
бластоциста (Бл III)

- Около 25% дефектных бластомеров (указано стрелкой)
- Эмбриобласт локализован, расплывчатый (указано стрелкой)
- Трофобласт правильный

Эмбрион **удовлетворительного качества**, пригодный для трансплантации



70

8 день
Экспандированная
бластоциста (Бл III)

- Около 50% дефектных бластомеров
 - Зона пеллюцида расширена
 - Эмбриобласт неправильной формы
 - Трофобласт неправильно сформированный
- Эмбрион **удовлетворительного качества**, пригодный для трансплантации

8 день

**Полностью экспандированная
бластоциста (Бл IV)**

- Около 10% дефектных бластомеров (указано стрелкой)
- Эмбриобласт отчетливо ограничен
- Трофобласт правильной формы
- Клеточные границы отчетливы

Эмбрион **хорошего качества**,
пригодный для трансплантации



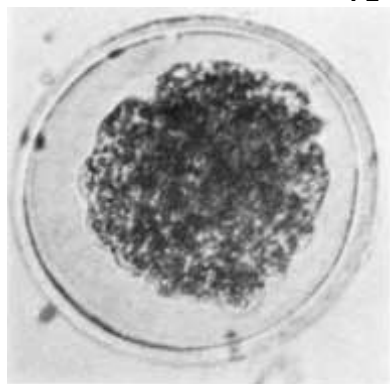
71

8 день

**Полностью экспандированная
бластоциста (Бл IV)
(в спавшемся состоянии)**

- Зона пеллюцида расширена
- Бластомеры одинаковы по величине
- Клеточные границы отчетливы

Эмбрион **удовлетворительного качества**, условно пригодный для
трансплантации



72

8 день

**Экспандированная бластоциста
(Бл III)**

- Начинает спадать клеточный материал
- Эмбриобласт локализован
- Ослабление клеточных связей в области трофобласта
- Трещины в зоне пеллюцида
- Клеточные границы не отчетливы

Эмбрион **неудовлетворительного
качества**, не пригодный для
трансплантации



73



74

8 день
Экспандированная бластоциста
(Бл III)

- Произошло сжатие клеточного материала, общее состояние не удовлетворительное
- Трещина в зоне пеллюцида
- Ослабление клеточных связей
- Клеточные границы не отчетливы

Эмбрион **неудовлетворительного качества**, не пригодный для трансплантации



75

8 день
Полностью экспандированная
бластоциста (Бл IV)

- Полностью спавшийся клеточный материал
- Трещина в зоне пеллюцида
- Лизис бластомеров
- Плазма в перивителлиновом пространстве

Эмбрион **неудовлетворительного качества**, не пригодный для трансплантации



76

8 день
Бластоциста выходящая из
зоны пеллюцида (Бл V)

- Эмбриобласт отчетливо выделяется
- Трофобласт правильной формы
- Клеточные связи хорошие
- Клеточные границы отчетливы

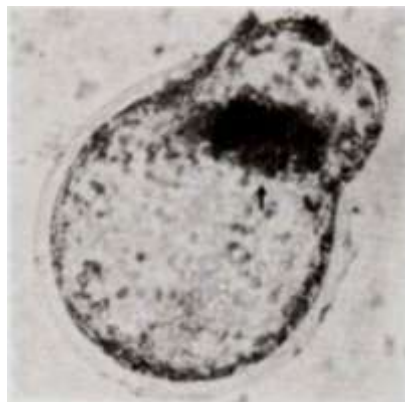
Эмбрион **отличного качества**, но в таком состоянии для трансплантации годен условно

8-9 день

**Бластоциста выходящая из зоны
пеллюцида (Бл V)**

- Эмбриобласт четко ограничен (указано стрелкой)
- Трофобласт правильной формы, равномерный

Эмбрион **отличного качества**, но на такой стадии для трансплантации годен условно

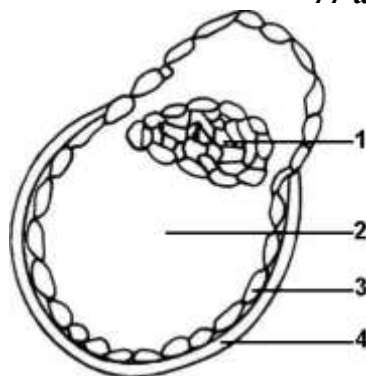


77 а

8-9 день

**Схема бластоцисты выходящей из
зоны пеллюцида (Бл V)**

1. Клетки эмбриобласта
2. Бластополость
3. Клетки трофобласта
4. Зона пеллюцида



77 б

9-10 день

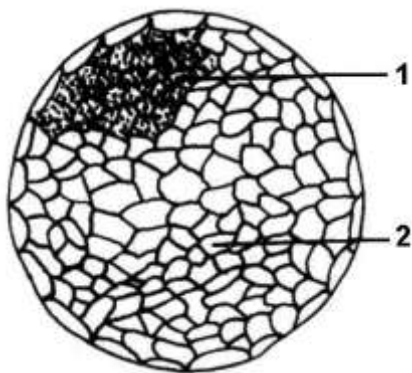
**Бластоциста вышедшая из зоны
пеллюцида
(Бл VI)**

- Эмбриобласт локализован (указано стрелкой)
- Трофобласт равномерный
- Границы бластоцисты отчетливо выражены

Эмбрион **отличного качества**, но на такой стадии для трансплантации годен условно



78 а



78 б

9-10 день
Схема экспандированной
бластоцисты, вышедшей из
зоны пеллюцида (Бл VI)

1. Клетки эмбриобласта
2. Клетки трофобласта

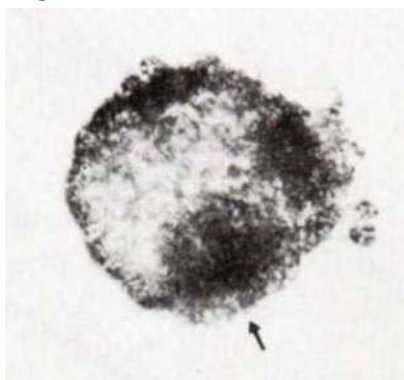


79

9 день
Бластоциста вышедшая из зоны
пеллюцида (Бл VI)

- Эмбриобласт отчетливо отграничен
- Легкое сморщивание клеток трофобласта

Эмбрион **отличного качества**, но в таком состоянии для трансплантации **годен условно**



80

8 день
Бластоциста вышедшая из зоны
пеллюцида (Бл VI)

- Клеточный материал спадает
- Эмбриобласт локализован (указано стрелкой)
- Ослабление клеточных связей

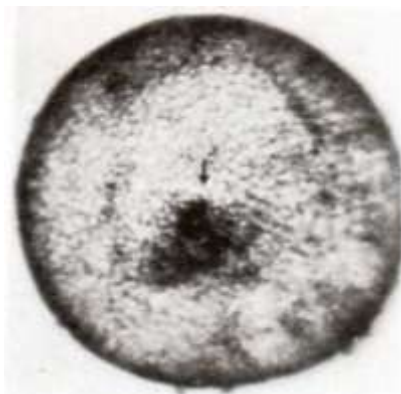
Эмбрион **неудовлетворительного качества**, не пригодный для трансплантации

10-11 день

**Бластоциста вышедшая из зоны
пеллюцида (Бл VI)**

- Эмбриобласт четко ограничен (указано стрелкой)
- Трофобласт правильной формы, равномерный
- Диаметр около 1000 мкм (1 мм)

**Эмбрион условно годен для
трансплантации**



81

11-13 день

**Растущая бластоциста
(Бл VII)**

- Начинается вытягивание
- Содержит около 5000 бластомеров
- Эмбриобласт имеет четкие границы (указано стрелкой)
- Трофобласт правильной формы, равномерный
- Длина около 3000 мкм (3 мм)

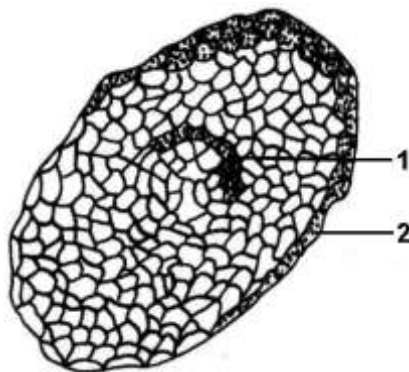


82 а

11-13 день

**Схема растущей бластоцисты,
(Бл VII)**

1. Клетки эмбриобласта
2. Клетки трофобласта



82 б



83

14 день
Растущая бластоциста
(Бл VIII)

- Фрагментация трофобласта
- Общая длина 30 мм
- Диаметр 1,5 мм.

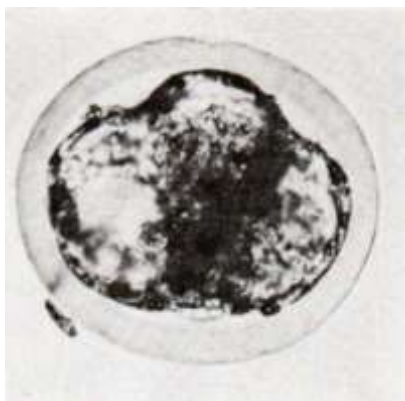


84

7 день
Атипичная бластоциста

- Эмбриобласт локализован, расплывчатый
- Атипичный трофобласт
- Образовалась двойная бластопольность

Эмбрион **хорошего качества**,
пригодный для трансплантации



85

7 день
Атипичная бластоциста

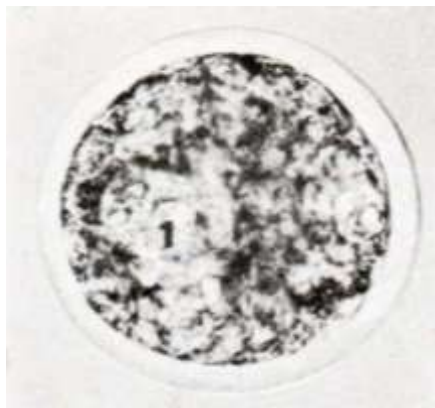
- Неправильно сформированный эмбриобласт
- Атипичный трофобласт
- Образовалась двойная бластопольность

Эмбрион **хорошего качества**,
пригодный для трансплантации

7 день
Атипичная бластоциста

- Эмбриобласт неправильной формы
- Неправильно образованная бластопольность (1)
- Многослойный трофобласт

Эмбрион **хорошего качества**,
пригодный для трансплантации



86

7-10 день
**Полностью экспандированная
бластоциста (1) рядом с
бластоцистой вышедшей из зоны
пеллюцида (2)**

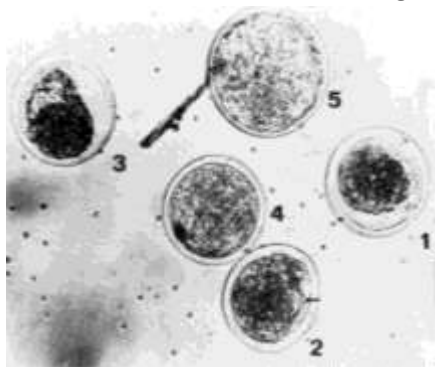
- Эмбриобласт локализован и имеет четкие границы (указаны стрелкой 1 и 2)



87

8 день
**Эмбрионы на разных стадиях
развития**

1. Поздняя морула
2. Ранняя бластоциста
3. Поздняя бластоциста
4. Полностью экспандированная бластоциста
5. Полностью экспандированная бластоциста



88

Учебное издание

Голубец Леонид Викторович
Кысса Иван Степанович
Дешко Александр Станиславович
Козел Александр Анатольевич
Якубец Юрий Алексеевич
Старовойтова Марина Петровна
Стецкевич Елена Казимировна
Нарейко Олег Анатольевич

ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ООЦИТОВ И ЭМБРИОНОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Учебно-методическое пособие

Компьютерная верстка: А.С. Дешко

Подписано в печать 27.06.2011 г.
Формат 60х84/16. Бумага офсетная. Гарнитура Таймс.
Печать Riso. Усл.печ.л. 3,95. Уч.-изд.л. 3,80.
Тираж 100 экз. Заказ № 2567.

Учреждение образования
«Гродненский государственный аграрный университет»
Л.И. № 02330/0548516 от 16.06.2009.
230008, г. Гродно, ул. Терешковой, 28.

Отпечатано на технике издательско-полиграфического отдела
Учреждения образования «Гродненский государственный
аграрный университет»
230008, г. Гродно, ул. Терешковой, 28.