



Біотехнологічні методи у ветеринарній репродуктології

Навчальний посібник





**Ковпак В. В., Вальчук О. А., Деркач С. С., Жук Ю. В.,
Масалович Ю. С.**

Біотехнологічні методи у ветеринарній репродуктології

Навчальний посібник

Київ – 2020

УДК 611.013:636

П_____

Рекомендовано до видання рішенням вченої ради Національного університету біоресурсів і природокористування України (Протокол № 4 від 25 листопада 2020 року)

Рецензенти:

Склярів П.М., доктор ветеринарних наук, професор (Дніпровський державний аграрно-економічний університет);

Стравський Я.С., доктор ветеринарних наук, старший науковий співробітник (Тернопільський національний медичний університет ім. І.Я. Горбачевського);

Дишлюк Н.В., доктор ветеринарних наук, доцент (Національний університет біоресурсів і природокористування України).

П_____ **Біотехнологічні методи у ветеринарній репродуктології:**
навчальний посібник / В. В. Ковпак, О. А. Вальчук, С. С. Деркач, Ю. В. Жук,
Ю. С. Масалович – Київ : НУБіП України, 2020. – 102 с.

ISBN _____

Зміст навчального посібника відповідає навчальній програмі дисципліни «Акушерство, гінекологія і біотехнологія відтворення тварин з основами андрології».

*У навчальному посібнику викладено методологічні та методичні принципи вивчення біологічних властивостей гамет *in vitro*, а також технології зберігання і підтримки їх життєздатності поза організмом.*

Послідовність викладення матеріалу розрахована на поетапне засвоєння студентом знань та умінь щодо біологічних властивостей гамет та ембріонів у культурі, класичної методології роботи з ними, а також специфічних маніпуляцій. В кінці кожного розділу наведені питання для самоконтролю засвоєних знань.

Навчальний посібник призначений для студентів ОС «Магістр», здобувачів третього освітньо-наукового рівня вищої освіти «доктор філософії», докторантів, викладачів закладів вищої освіти та практикуючих лікарів ветеринарної медицини.

УДК 611.013:636

©В. В. Ковпак, О. А. Вальчук,

С. С. Деркач, Ю. В. Жук,

Ю. С. Масалович, 2020

©НУБіП України

ISBN _____

ВІДОМОСТІ ПРО АВТОРІВ



Ковпак Віталій Васильович

Доктор ветеринарних наук, доцент кафедри акушерства, гінекології та біотехнології відтворення тварин Національного університету біоресурсів і природокористування України. Викладає дисципліни: «Акушерство, гінекологія і біотехнологія відтворення тварин з основами андрології», «Методологія наукових досліджень»

Напрямок наукових досліджень: біологічні властивості стовбурових клітин тварин, біотехнологія. Автор понад 100 науково-методичних праць.

Електронна адреса: vitkovpak@nubip.edu.ua



Вальчук Олександр Анатолійович

Кандидат ветеринарних наук, доцент, завідувач кафедри акушерства, гінекології та біотехнології відтворення тварин Національного університету біоресурсів і природокористування України. Викладає дисципліни «Практичне акушерство, гінекологія та біотехнологія відтворення тварин», «Акушерство, гінекологія і біотехнологія відтворення тварин з основами андрології», «Превентивні ветеринарні технології незаразних хвороб жуйних».

Напрямок наукових досліджень: Фізіологія і патологія молочної залози у тварин, організація акушерської та гінекологічної диспансеризації у скотарстві із використанням інформаційних технологій. Автор 120 науково-методичних праць.

Електронна адреса: valchuk_oa@nubip.edu.ua



Деркач Сергій Степанович

Кандидат ветеринарних наук, доцент кафедри акушерства, гінекології та біотехнології відтворення тварин Національного університету біоресурсів і природокористування України. Викладає дисципліни «Практичне акушерство, гінекологія та біотехнологія відтворення тварин», «Акушерство, гінекологія і біотехнологія відтворення тварин з основами андрології», «Превентивні ветеринарні технології незаразних хвороб свиней».

Напрямок наукових досліджень: Біотехнологія відтворення дрібних домашніх тварин (штучне осіменіння собак). Автор та співавтор 104 наукових праць.

Електронна адреса: derkach_ss@nubip.edu.ua



Жук Юрій Васильович

Кандидат ветеринарних наук, доцент кафедри акушерства, гінекології та біотехнології відтворення тварин Національного університету біоресурсів і природокористування. Викладає дисципліни «Практичне акушерство, гінекологія та біотехнологія відтворення тварин», «Акушерство, гінекологія і біотехнологія відтворення тварин з основами андрології», «Основи ветеринарії».

Напрямок наукових досліджень: фізіології та патології родів і післяродового періоду; застосування екологічно безпечних засобів за акушерської та гінекологічної патології у корів. Автор 220 науково-методичних праць, у тому числі 3 навчальних посібників, 11 патентів на корисну модель, 1 ТУ на ветеринарний препарат «Мастилін», 5 науково-методичних рекомендацій, 49 навчально-методичних вказівок.

Електронна адреса: zhuk_yv@nubip.edu.ua



Масалович Юрій Степанович

Асистент кафедри акушерства, гінекології та біотехнології відтворення тварин Національного університету біоресурсів і природокористування України. Напрямок наукових досліджень: Акушерська і гінекологічна диспансеризація у скотарстві, вивчення критеріїв відтворної здатності корів. Автор 3 науково-методичних праць.

Електронна адреса: masalovich@nubip.edu.ua

ЗМІСТ

ПЕРЕДМОВА	7
РОЗДІЛ 1. ОРГАНІЗАЦІЯ РОБОТИ В ЕМБРІОЛОГІЧНІЙ ЛАБОРАТОРІЇ	8
<i>Питання для самоконтролю</i>	14
РОЗДІЛ 2. ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ВИМИВАННЯ ТА ПЕРЕСАДКИ ЕМБРІОНІВ	15
<i>Питання для самоконтролю</i>	16
РОЗДІЛ 3. ЯЙЦЕКЛІТИНА ВІД ФОРМУВАННЯ ФОЛІКУЛА ДО ОЦІНКИ <i>IN VITRO</i>	17
3.1. Фолікулогенез	18
3.2. Оогенез	21
3.3. Гормональна стимуляція фолікулогенезу	23
3.3.1. <i>Схема стимуляції суперовуляції корів «ФСГ-супер»</i>	23
3.3.2. <i>Схема стимуляції суперовуляції корів «Плюсет»</i>	24
3.4. Морфологічна оцінка якості ооцитів <i>in vitro</i>	24
Дослід 1. Отримання ооцит-кумулясних комплексів та їх дозвівання.	27
<i>Питання для самоконтролю</i>	30
РОЗДІЛ 4. СПЕРМАТОГЕНЕЗ ТА ОЦІНКА ЯКОСТІ СПЕРМИ	31
4.1. Сперматогенез	33
4.2. Сперма	35
4.2.1. <i>Методи отримання сперми</i>	37
4.2.2. <i>Рух сперми геніталіями самки</i>	42
4.2.3. <i>Аглютинація сперматозоїдів</i>	43
4.2.4. <i>Дія факторів зовнішнього середовища на сперматозоїди</i>	44
4.2.5. <i>Оцінка якості сперми</i>	45
4.3. Попередній відбір сперматозоїдів за статтю	54
4.4. Аналіз фрагментації ДНК сперматозоїдів методом «HALOMAX»	57
Дослід 1. Оцінка якості сперми методом «HALOMAX»	58
4.5. Значення тесту на гіпоосмотичний набряк сперматозоїдів	60
Дослід 2. Дослідження сперматозоїдів бика тестом на гіпоосмотичний набряк	60
4.6. Визначення співвідношення відсотку нормальних та патологічних форм сперматозоїдів	62
Дослід 3. Визначення співвідношення відсотку нормальних та патологічних форм сперматозоїдів	62
Дослід 4. Підготовка сперматозоїдів до осіменіння яйцеклітин <i>in vitro</i>	63
<i>Питання для самоконтролю</i>	64

РОЗДІЛ 5. ЗАПЛІДНЕННЯ	65
5.1. Запліднення <i>in vitro</i>	68
Дослід 1: Запліднення яйцеклітин <i>in vitro</i>	70
Дослід 2. Культивування ембріонів свиней <i>in vitro</i>	71
<i>Питання для самоконтролю</i>	72
РОЗДІЛ 6. ПЕРЕДІМПЛАНТАЦІЙНИЙ РОЗВИТОК	73
<i>Питання для самоконтролю</i>	81
РОЗДІЛ 7. СУЧАСНІ МЕТОДИ КЛІНІЧНОЇ ЕМБРІОЛОГІЇ У ВЕТЕРИНАРНІЙ МЕДИЦИНІ	82
7.1. Кріоконсервування ооцитів, сперми та ембріонів	82
Дослід 1. Заморожування яйцеклітин та ембріонів методом вітрифікації	85
Дослід 2. Розморожування яйцеклітин та ембріонів	88
Дослід 3. Заморожування сперми кобеля	89
Дослід 4. Заморожування сперми бугая	89
Дослід 5. Розморожування сперми	90
7.2. Передімплантаційна діагностика	90
Дослід 6. Передімплантаційна діагностика методом FISH	94
7.3. Ембріональні стовбурові клітини	95
Дослід 7. Отримання ембріональних стовбурових клітин	96
<i>Питання для самоконтролю</i>	98
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	99

ПЕРЕДМОВА

Наявність двох статей (самки і самця) у вищих тварин свідчить про їх статеве розмноження. Передача генетичної інформації між поколіннями здійснюється за допомогою статевих клітин – гамет. Розрізняють два типи гамет: у самок – це великі нерухомі яйцеклітини; у самців – це дрібні, здатні рухатися сперматозоїди. Левенгук і його учень Л.Гамм в 1677р. відкрили сперматозоїд, а К. Байер відкрив яйцеклітину лише через 150 років. Гамети розвиваються у статевих органах і раніше, ніж досягають спеціалізації, проходять ряд складних перетворень, які роблять її відмінними від всіх інших клітин організму.

Статеве розмноження тварин супроводжується заплідненням - злиттям двох гамет: чоловічої і жіночої. У результаті утворюється запліднена яйцеклітина - зигота, яка дає початок розвитку нового покоління організмів. Тільки в 1875 році було доведено, що в основі процесу запліднення лежить злиття ядер однієї жіночої і однієї чоловічої статевих клітин, і тим самим об'єднання їх хромосом. Внаслідок об'єднання гаплоїдних наборів хромосом відновлюється диплоїдне їх число. Після чого запускається дроблення - послідовний мітотичний поділ зиготи на бластомери з перетворенням її на багатоклітинний зародок.

Ембріологія (від грец. *ἔμβριον* — «зародок» та *-λογία* — «наука») — розділ біології розвитку (онтогенезу), що вивчає ембріональний період онтогенезу, тобто ембріони різних видів, їх анатомію й фізіологію, закономірності росту, розвитку і дозрівання, патології та аномалії. Гіппократа й Аристотеля вважають основоположниками ембріології, які не тільки зібрали дані про розвиток організмів, а й сформулювали дві теорії ембріології – преформізму та епігенезу. Також важливу роль у розвитку ембріології як науки стали дослідження вчених М. Мальпігі, В. Гарвея, Р. де Граафа та А. Левенгука, що дали підстави розглядати яйце як джерело розвитку живого організму.

Практична ембріологія, у свою чергу, реалізує отримані знання при проведенні методів допоміжних репродуктивних технологій під час спостереження за розвитком ембріонів і (або) виконання маніпуляцій з ними.

З'ясування досягнень сучасної ембріології неможливе без знання основ розвитку статевих клітин, процесів запліднення та розвитку ембріонів. Тому нами спочатку розглядаються основні підходи до фолікуло-, гамето- та ембріогенезу для підготовки студентів для сприйняття наступних розділів.

Над написанням посібника працював колектив авторів: В.В. Ковпак (автор розділів «Передмова», 5, 7), О.А. Вальчук (автор розділу 3); С.С. Деркач (автор розділів 4); Ю.В. Жук (автор розділів 2, 6); Масалович Ю.С. (автор розділу 1).

РОЗДІЛ 1: ОРГАНІЗАЦІЯ РОБОТИ В ЕМБРІОЛОГІЧНІЙ ЛАБОРАТОРІЇ

Успішність проведення допоміжних репродуктивних технологій у ветеринарній медицині на пряму залежить від оснащення ембріологічної лабораторії. Саме тут виконують основні маніпуляції з біологічним матеріалом: підготовка сперми до запліднення, оцінку яйцеклітин, запліднення *in vitro*, ICSI, культивування ембріонів, біопсія полярного тільца чи бластомерів, контроль розвитку ембріонів тощо.

Ембріологічна лабораторія – комплекс приміщень зі спеціальним обладнанням, режимом та досконало налаштованими технологічними процесами. Для введення новітніх методик у роботу необхідно ретельно підібране, надійне та якісне обладнання.

Зважаючи на те, що роботу з ембріонами, яйцеклітинами та спермою слід виконувати в асептичних умовах у ембріологічній лабораторії використовують ламінарні бокси/шафи.



Рис.1. Ламінарна шафа

Ламінарні бокси/шафи – спеціальне лабораторне обладнання, призначене для забезпечення стерильного середовища з метою захисту оператора та біологічного матеріалу (рис. 1). На даний час вони є невід’ємною частиною сучасної ембріологічної лабораторії. Вони можуть бути як додатковим обладнанням, так і окремим робочим місцем. Усередині ламінарного боксу створюється і підтримується необхідний мікроклімат (концентрація пилу, мікроорганізмів, аерозолів та парів, деякі моделі здатні підтримувати задану температуру, що відрізняється від зовнішнього середовища).

Бокси поділяються залежно від напрямку потоку повітря, що надходить та залежить від досліджуваного об’єкту. При дослідженні мікроскопічних об’єктів – доцільно використовувати з горизонтальним напрямком потоку повітря; якщо об’єкт великий, то доцільно використовувати із вертикальним потоком. Ламінарні шафи оснащені прозорими стінками, завдяки чому, досліджуваний об’єкт, розміщений всередині захищений від зовнішніх впливів, але у той самий час доступний для спостереження оператором. Каркас виконаний з анодованого алюмінію (алюмінієвий профіль). Найважливіший елемент ламінарного боксу – система фільтрів адже через неї проходить повітря, що надходить всередину. Також бокси мажуть додатково укомплектовуватися необхідним обладнанням

(лампи, мікроскопи, деталі з підігрівом) для досягнення максимально ефективних умов роботи.

Сучасні ламінарні бокси належать до одного з трьох класів захисту або біологічної безпеки (ББ):

- 1-го класу ББ – створення захисту навколишнього середовища і оператора від небезпечних для здоров'я речовин, але не створює стерильних умов роботи. Варто відмітити, що ламінарні бокси першого класу де повітряні потоки направлені на зовні не відповідають міжнародним стандартам, адже не захищають навколишнє середовище.

- 2-го класу ББ – створення стерильного середовища в робочій камері, в ламінарі здійснюється захист зразків, оператора і навколишнього середовища від патогенних і токсичних речовин. Використовується при виробництві ліків, для роботи з радіоактивними і токсичними хімічними речовинами.

- 3-го класу ББ – здійснюється захист оператора, зразків і навколишнього середовища при роботі з особливо небезпечними матеріалами. Використовуються для безпечної роботи з вірусами та бактеріями найвищого рівня небезпеки, ізотопами та канцерогенами. Ламінари даного класу захисту мають повністю ізольовану робочу зону, а також фізичний бар'єр між робочим місцем та оператором.

Зазвичай ламінарний бокс додатково обладнується прямим світловим мікроскопом він може бути як стаціонарний (вбудований в столик ламінару) так і переносним. Обов'язковою умовою є столик, що нагрівається. В ембріології використовується при пошуку яйцеклітин, роботи з спермою, при роботі та оцінці ембріонів та ооцитів.

Наступним важливим приладом, що на пряму впливає на якість роботи ембріологічної лабораторії є CO₂-інкубатор (рис. 2). Його використання дозволяє забезпечити збалансовані умови культивування ембріонів та яйцеклітин, дозволяє зберігати матеріал ізольовано один від одного, регулювати необхідні параметри рівня кисню, вуглекислого газу, вологості, температури тощо; знизити випадки загибелі матеріалу, що культивується.

CO₂-інкубатор складається з декількох функціональних модулів: робоча камера, що оточена водяною сорочкою високої теплоємності або системою прямого нагріву; мікропроцесор – здійснює управління найважливішими параметрами мікроклімату: температурою, концентрацією CO₂, вологістю; система теплоізоляції;



Рис. 2. CO₂-інкубатори

рідкокристалічний екран для візуалізації процесів; системи вентиляції та фільтрації для очистки газу, що подається в камеру; термометр; сигналізуюча система.

Зважаючи на те, що CO₂-інкубатор підтримує вказана газове середовище всередині камери і захищає матеріал від шкідливих факторів необхідно звертати на ряд характеристик при виборі даного приладу: об'єм і розміри робочої камери; об'єм водяної сорочки чи оснащення системою прямого нагріву; широта діапазону температури, що підтримується, концентрації газової суміші і вологість в робочій камері; точність показників температури, вологості і концентрації газової суміші в різних ділянках камери, їх можливість відхилення від норми; швидкість зміни середовища всередині камери після змін у налаштуваннях.

CO₂-інкубатори поділяються:

- дворазові (O₂, CO₂)

- трьох газові (O₂, CO₂, N₂) – інкубатори необхідні для оптимізації росту ембріонів в середовищі, яка близько імітує *in vivo*, адже в середині організму концентрація кисню варіюється від 1 % до 14 %, у той час як у атмосфері – від 20 до 21 %. Науково доведено, що біологічний матеріал, що культивується при низькому вмісту кисню (гіпоксія), швидше ростуть, збільшується тривалість життя та знижується стрес. Зниження рівня кисню забезпечується шляхом контролю у газовій суміші рівня азоту.

Важливим приладом, у роботі ембріологічної лабораторії є інвертований мікроскоп з мікроманіпулятором (рис. 3). Він використовується при оцінці якості розвитку ембріонів, для запліднення методом ICSI (ін'єкція сперматозоїда всередину яйцеклітини). Важливим параметром у інвертованому мікроскопі є підігрівання предметного столика, що дозволяє уникнути температурного шоку у клітин, та швидкого охолодження середовища з біоматеріалом.

Мікроманіпулятор, у свою чергу, дозволяє здійснювати тонкі і точні рухи мікроінструментів і виконувати в полі зору мікроскопа складні операції з яйцеклітиною і сперматозоїдами. Він складається з системи штативів, забезпечених гвинтами, що затискають мікроінструменти (голки, піпетки і ін.) та забезпечує їх рух в трьох взаємно перпендикулярних напрямках. Мікроманіпулятор може мати пневматичний, гідравлічний, механічний чи електричний тип управління. При виборі мікроманіпулятора рекомендовано враховувати:

- точність пересування і позиціонування інструменту;
- доступний діапазон рухів в трьох осях;



Рис. 3. Мікроманіпулятор з ручним управлінням / механізований

- наявність додаткових режимів (ін'єкції, лігування);
- зручність фіксації і заміни мікроінструментів;
- відповідність габаритів маніпулятора розміром столика мікроскопа.

Додатково до мікроскопа можливе підключення цифрової камери для виводу зображення на монітор чи інфрачервоного лазера для допоміжного хетчингу, потоншення прозорої оболонки, іммобілізації сперматозоїдів, біопсії полярних тіл, еластомерів чи трофоектодерми для передімплантаційної генетичної діагностики.

У ембріології для роботи з яйцеклітинами, сперматозоїдами та ембріонами використовують мікроінструменти – мікропіпетки (рис. 4). Мікропіпетки мають свою характерну структуру для розуміння якої треба розглянути основні поняття, що використовуються для характеристики їх будови.

Мікропіпетки мають основу близько 1 мм і кінчик діаметром від 4 мкм. Відповідно кожна мікропіпетка має ділянку, на якому її діаметр звужується і називається вона – taper. Taper створюється на самому початку виготовлення піпетки. Плавне звуження taper називається паралельним, а більш різке – конічним. Паралельний taper дозволяє чітко контролювати рух рідини всередині піпетки і зручний для «турбо ICSI» – послідовної ін'єкції декількох сперматозоїдів. Конічний taper забезпечує жорсткість і стійкість піпетки і зручний для іммобілізації сперматозоїдів.

Плече (distance tip to bend) – відстань від кінчика піпетки до її згину. Коротке плече забезпечує міцність і стійкість, довге – можливість послідовної ін'єкції декількох сперматозоїдів. Плече становить 0,5 чи 1 мм.

Скіс кінчика голки (bevel) – створюється шляхом спеціального заточування піпетки. на зрізі скошений кінчик має овальну форму до моменту утворення spike (шипа).

Кут заточування кінчика голки (bevel angle) визначає нахил скосу і його довжину чим менший кут, тим довший скіс кінчика піпетки і тим піпетка здається гостріше.

Всі мікропіпетки виготовляються з капілярів з боросилікатного скла, що мають зовнішній діаметр 1,0 мм. Підвищений вміст кремнію в склі запобігає потенційній адгезії біологічних об'єктів. Кожен лот скляних заготовок проходить тестування на ендотоксини і ембріотоксичність. Стандартна довжина мікропіпеток – 5,4–5,8 см. Мікропіпетки для біопсії, стовбурових клітин мають довжину 5,5–5,6 см. Підстава піпетки відполірована для запобігання пошкодження прокладок холдерів інструментів мікроманіпулятора. В залежності від потреб оператора



Рис. 4 Мікропіпетка (схематичне зображення): 1 – плече; 2 – кут піпетки

можливі модифікації піпеток: збільшення загальної довжини; плече довжиною 1,0 мм; відсутність спайка; подовжений спайк і інші.

Номенклатура мікропіпеток (рис. 5):

Micropipette for ICSI – мікропіпетка для ICSI – використовуються для іммобілізації, забору та ін'єкції сперматозоїда в ооцит.

Micropipette for holding – мікропіпетка для холдінга – використовуються для фіксації та утримання в певному положенні ооцита або ембріона, вони мають плоский, відполірований кінчик

Micropipette for blastomere biopsy – мікропіпетка для біопсії бластомерів - використовуються для вилучення бластомера для подальшого проведення передімплантаційної генетичної діагностики. Можливий вибір піпетки з плоским полірованим або скошеним полірованим кінчиком. Використовують три стандартних розміри: малий, середній і великий.

MBBS – мікропіпетка для біопсії трофоектодерми – використовуються для біопсії трофоектодерми для проведення предімплантанційної генетичної діагностики. Мають рівний кінчик і плече стандартної довжини 0,5 мм.



Рис. 5. Види мікропіпеток: а – мікропіпетка для холдінга; б – мікропіпетка для ICSI; в – мікропіпетка для біопсії.

Partial zona dissection – мікропіпетка для механічного хетчингу – застосовуються для механічного створення отвору в прозорій оболонці, мають витягнутий довгий тонкий конусоподібний кінчик і великий вибір кутів нахилу

Micropipette for polar body biopsy – мікропіпетки для біопсії полярного тільця – застосовуються для аспірації полярного тіла ооцита при проведенні передімплантаційної генетичної діагностики. Можливий вибір піпетки з плоским полірованим кінчиком, зі скошеним полірованим кінчиком або зі скошеним кінчиком зі спайком.

Micropipette assisted hatching – мікропіпетки для хімічного хетчингу – мікропіпетки для допоміжного хетчинг використовуються для створення отвору в прозорій оболонці за допомогою кислого розчину Тіроде. Мікропіпетки мають тупий, злегка відполірований кінчик.

Для маніпуляцій з яйцеклітинами і ембріонами при проведенні різноманітних етапів штучного запліднення використовують спеціалізований мікроінструмент – тримач для капілярів (піпеток) (рис. 6). Капіляри для тримачів – це стерильні піпетки, які мають різноманітний внутрішній діаметр від 50 мкм (для виконання біопсії бластомерів) до 1000 мкм (для маніпуляцій з ооцит-кумулюсними комплексами). Капіляри можуть бути скляними та пластиковими. Більш сучасними є пластикові адже вони гнучкі, не ламаються та не пошкоджують культуральні чашки. Зазвичай капіляри для Stripper® випускають в одноразові упаковці для забезпечення зручності використання на збереження стерильності.



Рис. 6. Види тримачів для капілярів

При роботі з аспірованою фолікулярною рідиною для зручного відділення ооцит-кумулюсних комплексів ембріологи використовують дозатор для піпеток (рис. 7). Найчастіше ембріологічні лабораторії оснащують дозатором який має ергономічну форму та простий в управлінні. Його використовують у комплекті з одноразовими мікропіпетками з кільцевою міткою об'ємом до 1 мл (найчастіше використовують піпетки для розведення крові).



Рис. 7. Дозатор для піпеток

Додатково ембріологічна лабораторія має бути оснащена:

- бінокулярним мікроскопом, який використовують для оцінки якості сперми тварин;
- центрифугою – для підготовки сперми до запліднення;
- водяна баня – для розморожування зразків сперми;
- автоматичні піпетки – для роботи з культуральними середовищами та реактивами;
- термостат – для підтримання температури 37 С° реактивів та матеріалів, що контактують з біологічним матеріалом;
- холодильник з морозильною камерою – для зберігання реактивів;

- посуд Дюара (має розміщуватися в окремому приміщенні) – для довготривалого зберігання біоматеріалу (яйцеклітин, ембріонів, сперми чи культур клітин).



Питання для самоконтролю:

1. Що ви розумієте під поняттям «ембріологічна лабораторія»?
2. Для чого використовуються ламінарні бокси/шафи?
3. Які є види CO₂-інкубаторів?
4. З якою метою в ембріологічній лабораторії використовують мікроманіпулятор?
5. Які види мікропіпеток ви знаєте та будову вони мають?
6. З якою метою ембріологічна лабораторія оснащена тримачем для капілярів (піпеток)?

РОЗДІЛ 2: ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ВИМИВАННЯ ТА ПЕРЕСАДКИ ЕМБРІОНІВ

При розведенні великої рогатої худоби все важче дотримуватися необхідних темпів селекційного процесу при природному способі відтворення. Все це пов'язано з тривалістю тільності, повільною зміною поколінь та переважною одноплідністю у даного виду тварин.

Для прискорення розмноження високоцінних тварин та збереження генофонду все частіше впроваджується пересадка ембріонів на ранніх етапах розвитку. Проте дані технології потребують не тільки підготовки тварин-донорів та реципієнтів, а й спеціального обладнання та реактивів для вимивання та трансплантації, які ми розглянемо нижче.

Розширювач шийки матки використовують для збільшення просвіту цервікального каналу у корів для полегшення проходження катетера для вимивання ембріонів. Його виготовляють з нержавіючої сталі, щоб запобігти корозії та травмуванню слизової оболонки, додатково він буває різної форми, що залежно від анатомічних особливостей.



Рис. 8. Силіконовий катетер для вимивання ембріонів

багаторазове використання. Для полегшення введення катетера в порожнину рогу матки часто використовують мандрен, який вводять у порожнину катетера надаючи йому жорсткості. Для введення середовища використовують шприц об'ємом 50 мл без латексу.

При відборі середовища з рогу матки його пропускають через стерильну фільтрувальну систему для відбору ембріонів (рис. 10), яка містить

Катетери для вимивання ембріонів 2 каналні (рис. 8, 9), один канал необхідний для введення середовища у ріг матки задля вимивання наявних там ембріонів та яйцеклітин, другий – для нагнітання повітря у балон, що розміщений на кінцевій частині катетера задля фіксації останнього у порожнині рогу матки та попередження витікання введеного середовища у порожнину матки. Катетери виготовляють з гуми чи силікону, що дозволяє забезпечити їх стерилізацію та



Рис. 9. Катетер для вимивання ембріонів NEA/Lampeter CH18



Рис. 10. Система фільтрів для вимивання ембріонів

вмонтований фільтр, чашку для пошуку і координаційну сітку, де візуально проводять пошук ембріонів у рідині.

При необхідності транспортування ембріонів чи ооцитів у лабораторію використовують портативний інкубатор, який дозволяє зберігати необхідну температуру тривалий час, запобігаючи таким чином температурному шоку біоматеріалу.

Пересадку ембріонів тваринам-реципієнтам проводять на 7–8 день після статевої охоти. Розроблено велику кількість пристроїв та катетерів для пересадки ембріонів. Найбільш широко використовуються катетери, що складаються з металевого тіла – поршня і трубки (застосовують для витискання ембріонів з пайєти) та захисного чохла. Варто зазначити що катетер є багаторазовим, тому що перед початком роботи їх стерилізують.



Питання для самоконтролю:

1. З якою метою використовують пересадка ембріонів на ранніх етапах розвитку?
2. Чому використовують 2 каналні катетери для вимивання ембріонів?
3. З якою метою при введенні катетера використовують мендрен?
4. Яку функцію виконують портативні інкубатори?
5. З яких частин складаються катетери для пересадки ембріонів

РОЗДІЛ 3: ЯЙЦЕКЛІТИНА ВІД ФОРМУВАННЯ ФОЛІКУЛА ДО ОЦІНКИ *IN VITRO*

Яйцеклітина – це гаплоїдна, велика, нерухома статеві клітина самок, пристосована для статевого злиття з ціллю активації і подальшого ембріонального розвитку. Вони мають сферичну форму, розміри від кількох мікрометрів до кількох сантиметрів. На відміну від сперматозоїдів, яйцеклітини мають великий об'єм цитоплазми, містять жовток, у них немає центріолей, через що яйцеклітини не здатні до самостійного поділу. Ядерно-цитоплазматичне співвідношення складає 1:550 (соматичні клітини 1:6). Характерною відмінністю зрілих яйцеклітин – вміст в ядрах гаплоїдного числа хромосом, нездатність до поділу внаслідок відсутності центріолі (вона зникає в процесі розвитку і

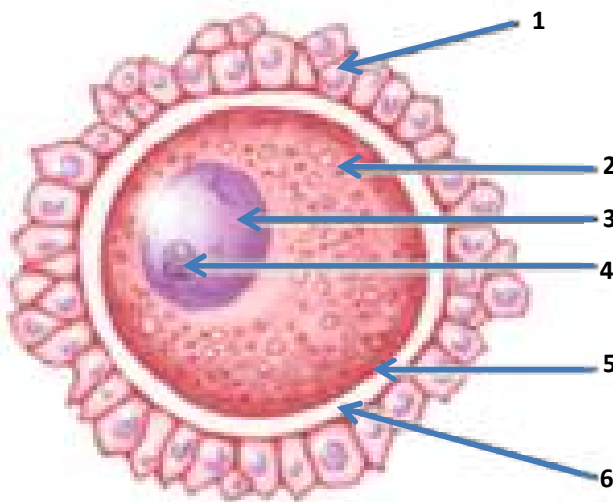


Рис. 11. Спрощена схема ооцита, що овулював

- 1 – променистий вінець;**
- 2 – цитоплазма;**
- 3 – ядро;**
- 4 – ядерце;**
- 5 – жовткова оболонка;**
- 6 – прозора оболонка**

дозрівання ооцита), низький рівень процесів асиміляції та дисиміляції. Яйцеклітина ссавців, що овулювала – це заздалегідь запрограмована клітина, що має розміри від 110 до 160 мкм. Вона містить ядро, цитоплазму та три шари оболонок (рис.11). Як і будь-яка клітина, яйцеклітина ссавців вкрита плазмемою, яку видно лише в електронний мікроскоп і яка називається первинною оболонкою. Зовні від неї розміщена добре помітна у світловому мікроскопі Блискуча чи прозора оболонка, яка є вторинною оболонкою, оскільки вона виділяється клітинами фолікула, які оточують яйцеклітину. Вона сильно заломлює світло, і тому на препаратах дійсно є блискучою. Прозора оболонка не прилягає до плазматичної мембрани ооцита і між оволемою і прозора оболонка формується перивітеліновий простір. Прозора оболонка оточує ооцити і преімплантаційні ембріони. Товщина цієї оболонки

варіюється у різних видів тварин: у мишей вона тонка і легко проколюється голкою, у кролів і норок вона більш щільна. У цій оболонці є велика кількість каналців, через які проходять відростки фолікулярних клітин, що прилягають до неї. Ці клітини відрізняються призматичною формою і розміщуються

відносно яйцеклітини в радіальному напрямку, утворюючи навколо неї променистий вінець (corona radiata) – внутрішній шар клітин фолікула. Їхні довгі відростки через каналці прозорої оболонки проникають усередину яйцеклітини і виконують функцію живлення.

У ссавців, за винятком яйцекладних, зародок отримує матеріал для живлення із материнської крові, завдяки чому він не потребує жовтка, тому жовток знаходиться у невеликій кількості, і є не стільки важливим для живлення, як є свідченням того, що у предків ссавців його вміст був великим. Характерною ознакою зрілої яйцеклітини є відсутність у ній центросоми. Вона має мітохондрії, ендоплазматична сітка в ній редукована і майже повністю відсутня, а рибосоми повністю розосереджені в цитоплазмі. З інших органоїдів слід виділити лізосоми.

Ядро яйцеклітини містить гаплоїдний набір хромосом, аутосоми і одна статеві Х-хромосома. Цитоплазма яйцеклітини багата включеннями запасного поживного матеріалу – жовтка. Останній являє собою ліпофосфопротеїдні комплекси високої енергетичної цінності, нагромаджені в мішечках комплексу Гольджі.

У периферичних зонах цитоплазми (під плазмолемою) ооцити зосереджена значна кількість так званих «кортикальних гранул». Останні являють собою комплекси протеогліканів і глікопротеїдів і містяться у складі мішечків комплексу Гольджі. Кортикальні гранули забезпечують утворення непроникної для сперматозоїдів оболонки запліднення, яка забезпечує захист ооцита від поліспермії (проникнення в цитоплазму більш як одного сперматозоїда).

3.1. Фолікулогенез

Біологічна особливість оогенезу зводиться до того, що розвиток яйцеклітин проходить в середині фолікула. Саме фолікулярні клітини забезпечують повноцінне дозрівання ооцитів. При фолікулогенезі розрізняють три етапи розвитку (рис. 12): первинний (преантральний розвиток), вторинний (антральний розвиток) і третинний (Граафовий розвиток).

Преантральний розвиток: всередині фолікула міститься ооцит на стадії дипломи, а зовні – шар зернистих клітин з рецепторами до ФСГ, оточені текою. В преантральному розвитку розрізняють ранню, середню і пізню стадії.

1. На ранній стадії (премордальний фолікул) блокований ооцит ще не повністю покритий зернистими клітинами сплющеної форми. Ооцит вперше встановлює зв'язок з фолікулярними клітинами в кінці зародкового розвитку, коли він знаходиться на стадії профазі. До цього часу ооцит вступає в стадію дипломи мейозу. Важлива особливість, на яку необхідно звернути увагу, це те, що для утворення навколо ооцита перших фолікулярних клітин, ооцит блокує свій власний розвиток лише для того, щоб «сконцентрувати» репродуктивну систему на фолікулі (перше блокування в оогенезі).

2. На середній стадії розвитку ооцит повністю покривається зернистими клітинами, які набувають кубічної форми. Після того, як навколо ооцита завершається формування першого шару фолікулярних клітин починається формування прозорої клітинної оболонки – zone pellucid. Ранні стадії розвитку первинних фолікулів (аж до утворення декількох шарів фолікулярних клітин) проходить без участі статевих гормонів. До діаметра 0,4 мм фолікул росте повільно, потім його ріст прискорюється і досягає максимуму при діаметрі 0,7 мм.

3. На пізній стадії розвитку ооцит покривається двома шарами зернистих клітин, всередині яких утворюються рецептори до ФСГ, а ззовні – тека. У самок ссавців зміна моделі рецепторів гонадотропіну пов'язана з дозріванням фолікула. Зернисті клітини дрібних фолікулів (0,7–0,8 мм в діаметрі) можуть зв'язувати ФСГ.

Преантральний фолікул (фолікул без антрума) має багато шарів зернистих клітин, його розміри в діаметрі коливаються від 0,8 до 2 мм. Для цієї стадії характерне збільшення ооцита і розмноження зернистих клітин. В яєчнику фолікулів другого порядку зазвичай в 2 рази більше ніж третього. ФСГ зв'язується з специфічними рецепторами зернистих клітин і в присутності естрадіолу утворюється антрум, зернисті клітини набувають рецепторів до ЛГ. Дрібні фолікули у самок набувають рецептори ЛГ в текальному шарі клітин в слід за рецепторами ЛГ в зернистих клітинах. Досліди на щурах дозволяють стверджувати, що початкове виникнення рецепторів ЛГ в зернистих клітинах стимулюється дією естрадіолу і ФСГ. Однак після того як розвивається антральний фолікул, кількість рецепторів ЛГ в зернистих клітинах помітно збільшується, що, стимулюється гонадотропінами. Кількість рецепторів ЛГ суттєво збільшується як в текальних, так і зернистих клітинах слідом за значним

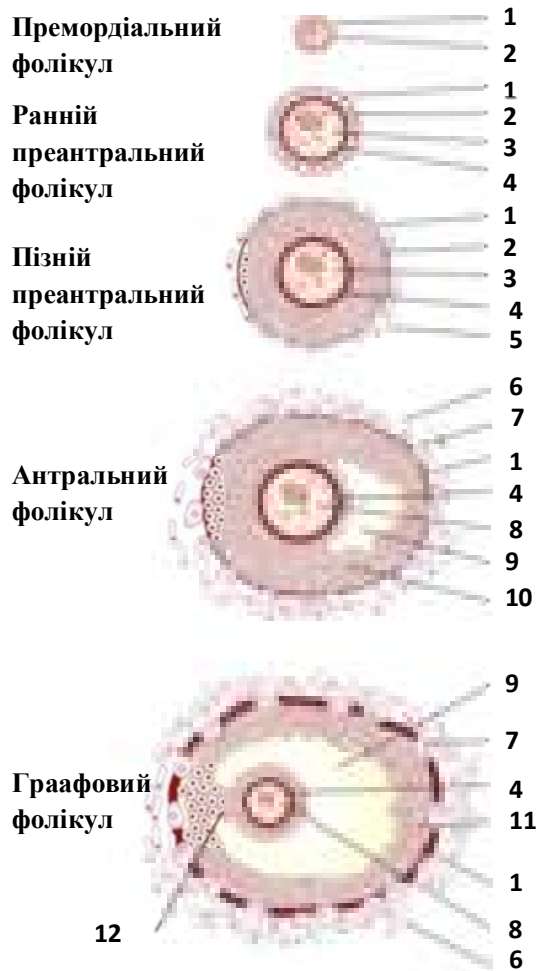


Рис. 12. Фолікулогенез

1 – базальна мембрана; 2 – зернисті (гранульозні) клітини; 3 – ооцит; 4 – прозора оболонка; 5 – тека; 6 – зовнішня тека; 7 – внутрішня тека; 8 – повністю сформований ооцит; 9 – антрум; 10 – шари зернистих клітин; 11 – мембрана зернистих клітин; 12 – яйценосний горбик.

зменшенням чи зниженою регуляцією після піку преовулярної хвилі гонадотропіну. Шар текальних клітин слугує джерелом фолікулярних андрогенів, а для секреції естрогену необхідна взаємодія текальних і зернистих клітин. Дрібні антральні фолікули з рецепторами ЛГ в текальних клітинах володіють обмеженою здатністю секретувати естрадіол. З цього слідує, що коли фолікули не ростуть, вони набувають рецепторів ЛГ в зернистих клітинах, а також здатність перетворювати велику кількість андрогена в естроген.

Після того, як фолікул, що росте досягає певного розміру (первинний фолікул), він стає доміантним. Подальша доля фолікула залежить від стадії статевого циклу і гормонального стану організму, він може овулювати з вивільненням ооцита чи піддатися атрезії. Розвинутий великий фолікул, який має повний набір рецепторів (в тому числі і рецептори до ЛГ), секретують в кров гормон естрадіол. Останній секретується фолікулом в кров і порожнину фолікула, сприяючи його подальшому розвитку.

Антральний розвиток (вторинний фолікул) – це фолікул з антрумом, всередині якого міститься ооцит на стадії пахінеми. Ооцити відновлюють мейоз в метафазі I, знаходячись в антральних фолікулах. При антральному розвитку фолікула розрізняють дві стадії: формування і дозрівання антрума. Антральний фолікул – це фолікул в порожнині якого міститься антрум.

Наступним кроком в розвитку фолікула слугує формування між шарами зернистих клітин порожнини (antrum), що заповнена рідиною. Спочатку він утворюється за рахунок секреції зернистих клітин (стадія формування антрума), але потім значну частину складає ексудат, який виділяється із капілярів по іншу сторону зернистої мембрани (стадія дозрівання антрума). Для проходження цих стадій необхідний гонадотропний гормон гіпофіза ФСГ і естрогени, що виробляються у самому фолікулі. ФСГ діє на відповідні рецептори клітин зернистого шару фолікула і в присутності естрадіола, стимулює утворення в фолікулі антрума і виникненню рецепторів до ЛГ, спочатку в клітинах теки, а потім в клітинах зернистого шару.

Утворення антруму починається коли діаметр фолікулів досягає від 2 до 2,5 мм. Після того, як фолікул досягає 2 мм, швидкість росту починає знижуватися і у перовуляторного фолікула завершається повністю.

Граафів фолікул – це фолікул, внутрішня порожнина якого містить великий антрум і ооцит на стадії метафазі II мейозу. Фолікул, що стимулюється гормонами швидко збільшується в розмірах, перетворюючись у третинний фолікул. Цей фолікул переміщається до поверхні яєчника, вміст в ньому фолікулярної рідини збільшується, в результаті чого він виступає над по верхньою яєчника і знаходиться в очікуванні сигналу до овуляції.

Верхівка виступаючого зовні фолікула носить назву стігми і через добу після того, як вміст ЛГ в крові досягає максимального рівня, в цій області виникає ряд характерних змін, найбільш важливими з яких є вторинне блокування в ооциті мейозу на стадії метафазі II. Хоча об'єм фолікулярної рідини суттєво збільшується, внутрішньофолікулярний тиск перед розривом не збільшується.

При Граафовому розвитку розрізняють дві стадії:

1. Преовуляторна стадія. Діаметр фолікулів коливаються від 2,5–3,0 мм до 1,0–1,8 см. Утворений антрум середнього розміру. Більша частина естрадіолу в периферично циркулюючій крові в фазі жовтого тіла і фолікулярній фазі статевого циклу секретується яєчниками з великим Граафовим фолікулом. Встановлено, що фолікулу необхідно приблизно 24 дні, щоб вирости від стадії фолікула другого порядку до преовуляторної фази.

2. Овуляторна стадія. Фолікул з великим антрумом, стоншеною стінкою, який готовий до овуляції в діаметрі від 3,0 мм до 1,0–2,8 см. Такий фолікул має повний комплект зернистих клітин, рецептори ЛГ в текальних і зернистих клітинах і володіє здатністю перетворювати андрогени в естрогени, а також овулювати, якщо піддається дії хвилі гонадотропіну.

3.2. Оогенез

Гамеогенез – це період власного розвитку статевих клітин, процес перетворення диплоїдних первинних статевих клітин в гаплоїдні диференційовані жіночі (яйцеклітини) і чоловічі (сперматозоїди) статеві клітини. В залежності від статевої приналежності гаметогенез ділять на сперматогенез і оогенез. Оогенез складається з трьох етапів (рис. 13): розмноження, ріст і дозрівання; а сперматогенез з чотирьох: розмноження, ріст, дозрівання і формування.

1. Період розмноження (гонії). Після осідання в зародку гонади і по мірі розвитку шляхом активного розмноження первинні статеві клітини перетворюються в оогонії кількість яких, завдяки мітозу, сильно збільшується. При цьому, перетворення первинних статевих клітин в гонії супроводжується рядом змін: вони збільшуються в розмірах, набувають округлої форми, втрачають амебоподібну рухливість і починають активно розмножуватись (проліферація). Оболонка геніталій легко проникна для поживних речовин, які слугують джерелом енергії для інтенсивного ділення клітин. У більшості самок ссавців проліферативна активність оогоніїв завершується до народження, а у самців – до моменту статевого дозрівання.

2. Період росту (гоноцит). Від періоду розмноження гонії переходять до стадії росту, перетворюючись на ооцити першого порядку (названі так тому, що вони знаходяться в процесі першого ділення мейозу). В період росту статеві клітини вже не діляться. Поживні речовини, що всмоктуються, асимілюються цитоплазмою і обумовлюють інтенсивний ріст клітин.

Ріст ооцитів не рівномірний. Умовно розрізняють два періоди росту: превітелогенез (ріст цитоплазми) і вітелогенез (трофоплазматичний ріст).

Превітелогенез – це період малого росту, який починається з моменту переходу оогонії в мейоз і протікає на фоні його профазі.

Ооцит росте за рахунок власного синтезу РНК, білка та інших компонентів. При цьому маса ядра і цитоплазми збільшується пропорційно. Вітелогенез – період великого росту, характеризується різкою інтенсифікацією росту цитоплазми, що у свою чергу веде до зміни ядерно-цитоплазматичного відношення (від 1:6 до 1:550). Збільшення маси цитоплазми виникає за рахунок надходження речовин ззовні. Під час росту, в ооциті першого порядку накопичується велика кількість необхідних органел (рибосоми, мітохондрії), запаси поживних речовин (білок) і джерел енергії. Розміри ооцитів суттєво збільшуються у ссавців, його діаметр збільшується у середньому від 20 до 85–160 мкм, що відповідає збільшенню об'єму більш ніж в 40 разів

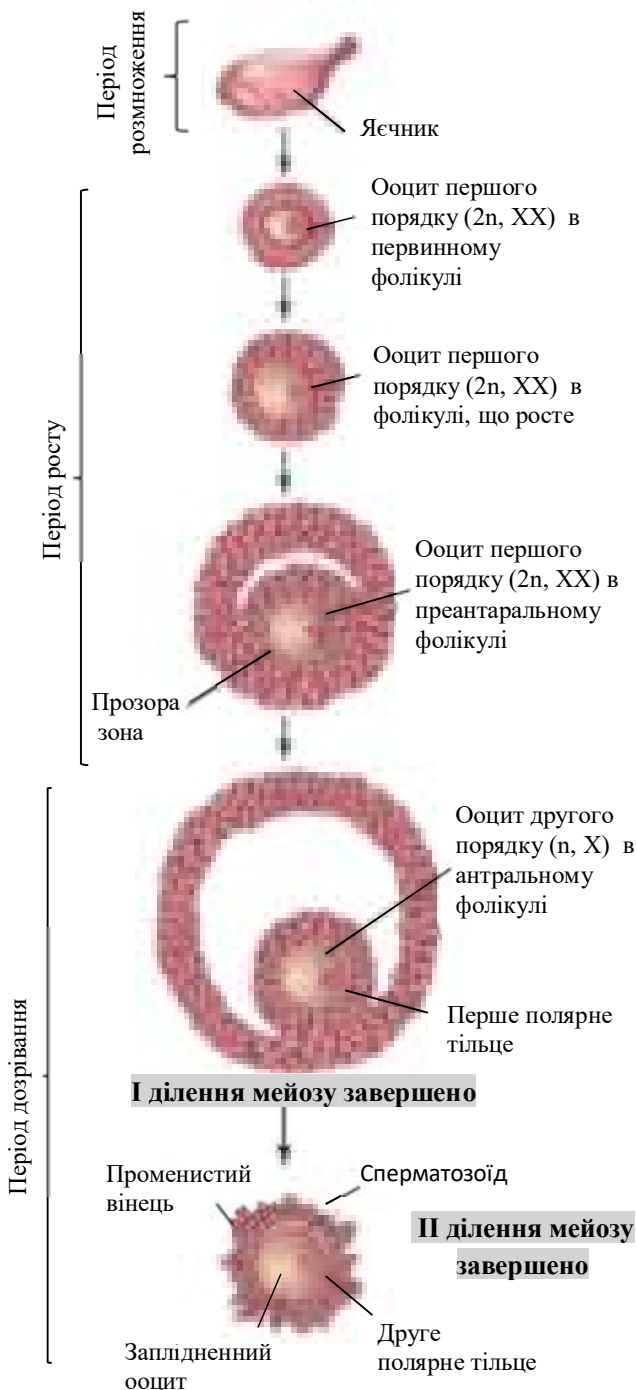


Рис. 13. Оогенез

послідовними діленнями клітин. При сперматогенезі у багатьох тварин мейоз починається на більш пізніх стадіях, ніж при оогенезі. Дозрівання ооцитів у ссавців збігається з моментом статевого дозрівання. Ооцити відновлюють мейоз, знаходячись в антральних фолікулах незадовго до овуляції в кінці фолікулярної фази естрального циклу (оваріальний цикл).

3.3. Гормональна стимуляція фолікулогенезу

Суперовуляція – це стимуляція одночасного дозрівання одразу декількох фолікулів. Дана методика дозволяє отримати велику кількість ембріонів для їх подальшої трансплантації. Стимуляцію суперовуляції проводять тваринам з цінними генетичними ознаками, що дозволяє полегшити відбір самок. Дана процедура актуальна для великої рогатої худоби, адже у даного виду тварин зазвичай утворюється лише одна яйцеклітина протягом природного естрального циклу, тому, кількість ембріонів, які можуть бути отримані від генетично цінних особин, обмежена. Для вирішення цієї проблеми розроблені методи суперовуляції, що включають стимуляцію множинного росту фолікулів та овуляцію шляхом введення гонадотропіну.

На початкових етапах вивчення суперовуляції застосовували хоріонічний гонадотропін (ХГ). Варто зазначити, що у корів даний гормон має період напіввиведення 40 годин з подальшим циркулюванням в крові до 10 днів. Цей фактор спричинює тривалу стимуляцію яєчників, що у подальшому призводить до аномальних ендокринних профілів та погіршення якості ембріонів. Пізніше хоріонічний гонадотропін вирішили змінити на фолікулостимулюючий гормон (ФСГ), оскільки було виявлено, що корови у певних відношеннях краще реагують на ФСГ. Зважаючи на те, що період напіввиведення ФСГ значно коротший (приблизно на 5 годині), порівнюючи з ХГ, то протоколи суперовуляції, з використанням ФСГ складаються з дворазових внутрішньом'язових введеннь препарату протягом 3–4 доби. Це доволі трудомісткий процес який може викликати стрес у тварин, що також спричиняє зниження суперовуляторної реакції та гальмує викид лютеїнізуючого гормону необхідного для овуляції. Тому на даний час розробляються схеми стимуляції з використанням ФСГ у поєднанні з лютеїнізуючим гормоном, схеми застосування яких наведені нижче.

3.3.1. Схема стимуляції суперовуляції корів препаратом «ФСГ-супер»

ФСГ-супер містить фолікулостимулюючий гормон високого ступеня очищення, отриманий з передньої долі гіпофіза свиней. Співвідношення ФСГ до лютеїнізуючого гормону (ЛГ) – 1000–1500 МО ФСГ / 1 МО ЛГ. Випускають у флаконах по 5 мл. Гормональна активність препарату у флаконі – 200 або 1000 МО. Перед застосуванням ФСГ-супер проводять попереднє гінекологічне обстеження тварин. Вміст флакона перед застосуванням розчиняють стерильним фізіологічним розчином або дистильованою водою до необхідної концентрації в залежності від виду тварини. Препарат вводять внутрішньом'язово у відповідній дозі. Для стимуляції функції яєчників: коровам на 12–16 добу після отелення вводять одноразово в дозі 300–400 МО. Осіменіння проводять через один статевий цикл, після завершення інволюції матки. Свиноматкам через 1–2 доби після опоросу вводять ФСГ-супер в дозі 200 МО одноразово або дворазово з інтервалом одну добу.

Самкам норок і песців, що не прийшли в охоту або не запліднилися після осіменіння, для повторного приходу в охоту препарат вводять одноразово в дозі 4–10 МО.

Для стимуляції поліовуляції у корів-донорів ембріонів, починаючи з 9–10 дня статевого циклу, їм вводять ФСГ-супер в дозі 120 МО два рази на добу через кожні 12 годин. На третю добу після початку введення одночасно з ФСГ-супер вводять один з препаратів простагландину F2a (естрофан, клатрапростін і ін.) вранці та ввечері по одній дозі. Виявлення ознак охоти у корів починають через 36–48 годин від моменту введення простагландину. У міру приходу тварин в охоту їх штучно осіменяють два-три рази з інтервалом 12 годин. Ембріони у корів-донорів вимивають в терміни, необхідні для отримання ембріонів бажаних стадій, вважаючи нульовим днем – день першого осіменіння тварин.

3.3.2. Схема стимуляції суперовуляції корів препаратом «Плюсет»

«Плюсет» – гормональний лікарський засіб для тварин, що має в одному флаконі 500 МО фолікулостимулюючого гормону (ФСГ) і 500 МО лютеїнізуючого гормону (ЛГ), одержувані з гіпофіза свиней з розчинником. Розчинник в 1 мл містить 1 мг хлорокрезол і стерильний апірогенний фізіологічний розчин до 1 мл відповідно.

Перед застосуванням вміст флакону з препаратом розчиняють в 10 мл розчинника, для чого стерильним шприцом набирають розчинник і вводять його у флакон з препаратом. В 1 мл отриманого розчину міститься 50 МО фолікулостимулюючого гормону і 50 МО лютеїнізуючого гормону відповідно. Препарат вводять на 9–12 день статевого циклу, але бажано на 11 день статевого циклу, що дає кращий результат.

Плюсет вводять тваринам внутрішньом'язово з дотриманням правил асептики і антисептики 2 рази на добу з інтервалом 12 годин у дозі, що понижується, відповідно до наведеної нижче схеми (таблиця 1):

Через 60–72 години від початку введення Плюсета коровам вводять простагландин F2 альфа або його аналог. Стійкий еструс реєструють через 40–48 годин після введення простагландинів. Через 12 годин від початку охоти необхідно провести осіменіння. Через 7–8 діб проводять вимивання ембріонів. Між двома поліовуляціями допускається один нормальний статевий цикл. При індукції поліовуляції інтервал між пункціями повинен бути не більше 3 місяців у одного донора ембріонів.

Слід уникати пропусків при введенні чергової дози препарату, так як це може призвести до зниження ефективності проведених заходів. У разі пропуску однієї дози препарату необхідно ввести його якомога швидше. Далі інтервал до наступного введення препарату не змінюється.

3.4. Морфологічна оцінка якості ооцитів *in vitro*

Використання технології *in vitro* з достатньою ефективністю неможливо без визначення здатності статевих клітин до повноцінного дозрівання і запліднення.

Одним з класичних способів визначення життєздатності ооцитів вважається оцінка їх морфологічного стану з використанням прижиттєвої мікроскопії.

Таблиця 1. Схема введення препарату «Плюсет» для стимуляції суперовуляції

Для корів м'ясних порід загальна рекомендована середньодобова доза не більше – 800 МО			
День 1	08:00 годин	3,0 мл	150 МО ФСГ + 150 МО ЛГ
	20:00 годин	3,0 мл	150 МО ФСГ + 150 МО ЛГ
День 2	08:00 годин	2,5 мл	125 МО ФСГ + 125 МО ЛГ
	20:00 годин	2,5 мл	125 МО ФСГ + 125 МО ЛГ
День 3	08:00 годин	1,5 мл	75 МО ФСГ + 75 МО ЛГ
	20:00 годин	1,5 мл	75 МО ФСГ + 75 МО ЛГ
День 4	08:00 годин	1,0 мл	50 МО ФСГ + 50 МО ЛГ
	20:00 годин	1,0 мл	50 МО ФСГ + 50 МО ЛГ
Для корів молочних порід загальна рекомендована середньодобова доза не більше – 1000 ЕД			
День 1	08:00 годин	3,0 мл	150 МО ФСГ + 150 МО ЛГ
	20:00 годин	3,0 мл	150 МО ФСГ + 150 МО ЛГ
День 2	08:00 годин	2,5 мл	125 МО ФСГ + 125 МО ЛГ
	20:00 годин	2,5 мл	125 МО ФСГ + 125 МО ЛГ
День 3	08:00 годин	2,0 мл	100 МО ФСГ + 100 МО ЛГ
	20:00 годин	2,0 мл	100 МО ФСГ + 100 МО ЛГ
День 4	08:00 годин	1,5 мл	75 МО ФСГ + 75 МО ЛГ
	20:00 годин	1,5 мл	75 МО ФСГ + 75 МО ЛГ
День 5	08:00 годин	1,0 мл	50 МО ФСГ + 50 МО ЛГ
	20:00 годин	1,0 мл	50 МО ФСГ + 50 МО ЛГ

Популяція виділених фолікулярних ооцитів є дуже неоднорідною, як за морфологією, так і за функціональним станом. У 30 % всіх яйцеклітин виявляються видимі ознаки дегенерації: стиснення або фрагментація ооплазми, збільшення перивітелінового простору, відшарування або повна відсутність променистого вінця; деформована, нерівномірна по товщині прозора оболонка та ін. Решту клітини можна вважати придатними для культивування. Однак при цитогенетичному аналізі ооцитів, після 24 годин культивування, виявляється близько 80 % зрілих, придатних до запліднення яйцеклітин.

В організмі самки ооцити дозрівають у фолікулі. Тісний зв'язок ооцита і оточуючих його зернистих (гранульозних, кумулюсних) клітин забезпечують його нормальний розвиток і дозрівання.

Оцінку ооцитів здійснюють за різними параметрами:

За характеристикою ооплазми (рис.14):

1. Дрібнозерниста, рівномірно заповнює простір під прозорою оболонкою.
2. Прозора оболонка, яка забезпечує зв'язок внутрішніх структур ооцита із зовнішнім середовищем, характеризується за наступними ознаками: опалесціює, рівномірна по ширині, округлої форми.

3. Ооплазму з ділянками гранулярною конденсації, що рівномірно заповнює простір під прозорою оболонкою.

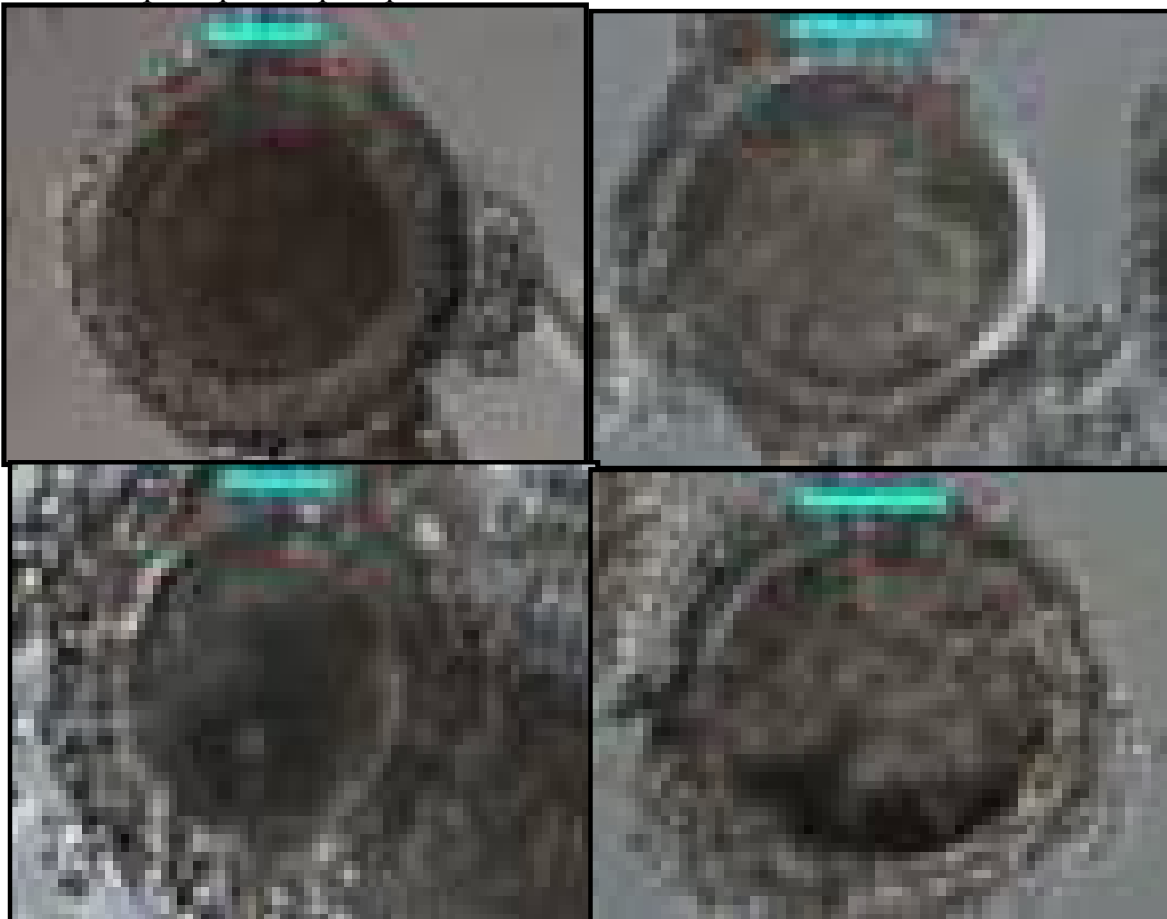


Рис. 14. Класифікація ооцитів за морфологією ооплазми:

1 – нормальний ооцит; 2 – блідий ооцит; 3 – ооцит з великими жировими кульками; 4 – темний ооцит

За станом променистого вінця (кумулюса):

1. Ооцити з компактним, багат шаровим, щільно прилягаючим до ооцитів кумулюсом.

2. Ооцити з розпущеним багат шаровим кумулюсом.

3. Ооцити з розпущеним кумулюсом, що частково відшарувався або у вигляді розрізнених ділянок, що покривають ооцит.

З морфологічної оцінки якості вищезазначених структур складається загальна оцінка якості ооцит-кумулюсного комплексу та його здатності до подальшого розвитку і дозріванню (рис. 15, 16).

Популяцію отриманих ооцит-кумулюсних комплексів рекомендується розділяти на групи за наступними морфологічними ознаками:

I група – компактний, багат шаровий, щільно прилягаючий до ооцитів кумулюс; ооплазма дрібнозерниста та рівномірно заповнює простір під прозорою оболонкою

II група – компактний, багат шаровий, щільно прилягаючий до ооцитів кумулюс; ооплазма має ділянки гранулярної конденсації;

III група – розпушений багат шаровий кумулюс; ооплазма має ділянки гранулярної конденсації;

IV група – частково відшарований пухкий кумулюс; ооплазма з гранулярною конденсацією;

V група – ооцити без кумулюса з дрібнозернистою ооплазмою, рівномірно заповнює простір під прозорою оболонкою.



Рис. 15. Анормальні ооцити (вибраковуюються)

Класифікація ооцит-кумулюсних комплексів:

5 БАЛІВ – Багат шаровий компактний кумулюс (не менше 3-ох шарів) щільно прилягаючий до zone pellucid; ооплазма дрібнозерниста, рівномірно заповнює простір під прозорою оболонкою, яка у свою чергу має рівномірну товщину, опалесціює, не має ніяких порушень, округла (рис. 16).

4 БАЛІИ – Багат шаровий компактний чи розрихлений кумулюс, щільно прилягає до прозорої оболонки; ооплазма містить ділянки гранулярної конденсації, прозора оболонка округла, опалесціює, не має дефектів, рівномірна по товщині (рис. 17)

3 БАЛІИ – Кумулюс частково відшарований; ооплазма має ділянки гранулярної конденсації; прозора оболонка рівномірна по товщині, округла (рис. 18).

2 БАЛІИ – Ооцит без кумулюса; ооплазма дрібнозерниста, рівномірно заповнена; прозора оболонка округла, рівномірна по товщині (рис. 19).



Дослід 1. ОТРИМАННЯ ООЦИТ-КУМУЛЮСНИХ КОМПЛЕКСІВ ТА ЇХ ДОЗРІВАННЯ

Мета роботи: розглянути основні принципи маніпуляцій з ооцит-кумулюсними комплексами корів під час їх дозрівання *in vitro*.

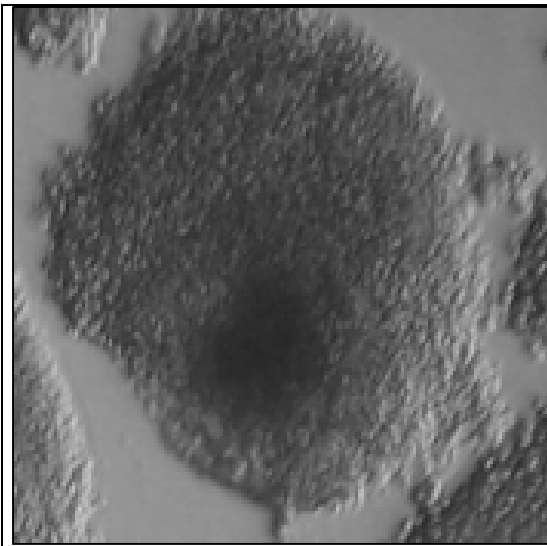


Рис. 16. Ооцит-кумулюсний комплекс 5 балів

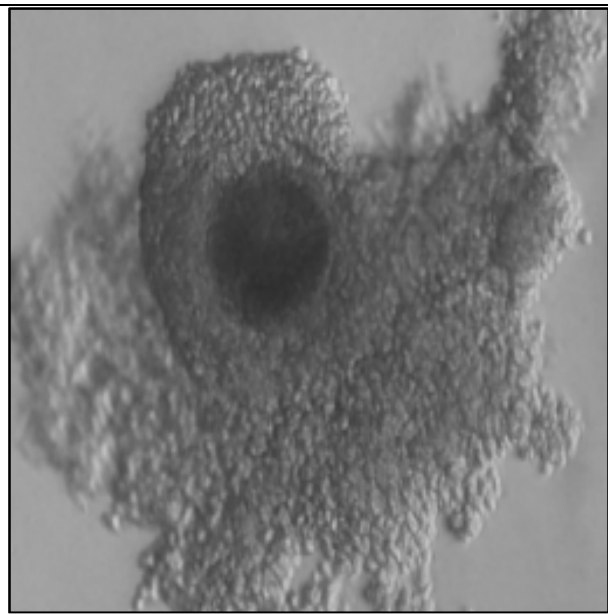


Рис. 17. Ооцит-кумулюсний комплекс 4 бали

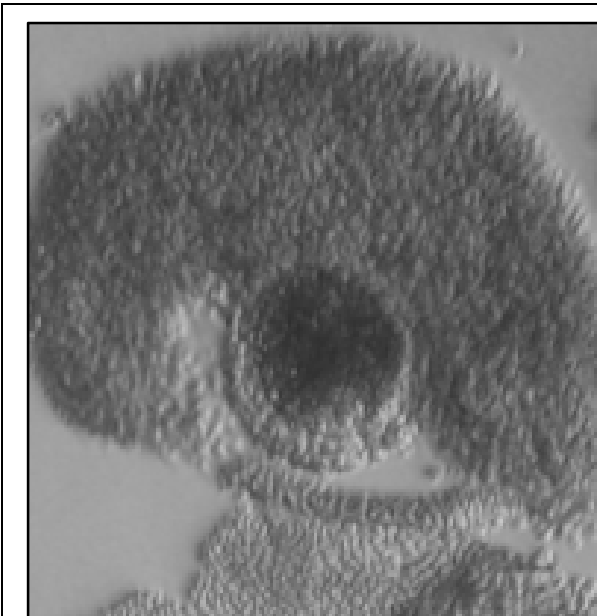


Рис. 18. Ооцит-кумулюсний комплекс -3 бали

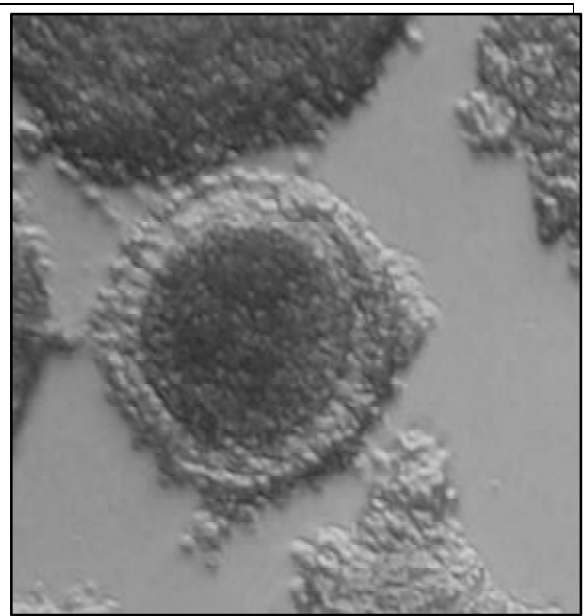


Рис. 19. Ооцит-кумулюсний комплекс -2 бали

Обладнання та матеріали: яєчники корів, пінцет, ножиці, чашка Петрі, скальпель, середовище 199 з NEPEs, середовище 199 з солями ЕРЛА, бінокулярна лупа, напівавтоматичні піпетки.

Хід роботи.

1. Яєчники корів (рис. 20) відбирають на бойні після забою від клінічно здорових корів. Доставляють у лабораторію в термосі при температурі +30–+33 С° протягом 2–3 годин.

2. В лабораторії яєчники промивають 4 рази в теплому (+37 – +38 С°) стерильному фосфатно–сольовому розчині Дюльбекко із 0,075 мг/мл канаміцин сульфату.

3. Видалення ооцит-кумулюсних комплексів з антральних фолікулів яєчників корів проводять в стерильних умовах шляхом розсічення фолікулів лезом безпечної бритви (рис. 21) в середовищі 199 з Перес.



Рис. 20. Яєчники корови

4. Видалення ооцит-кумулюсних комплексів, їх відбір та постановку на дозрівання, запліднення і подальше культивування здійснюють також у стерильних умовах боксу. Для культивування відбирають ооцит-кумулюсних комплексів 120–130 мкм, з суцільним щільним кумулюсом, неущожденою прозорою оболонкою та гомогенною невакуолізованою ооплазмою правильної округлої форми, без видимих морфологічних ознак атрезії.

5. Вилучені ОКК 6-разово відмивають в середовищі 199, із вмістом 25мМ буфера Перес, 10 % ембріональної сироватки теляти та одноразово промивають в середовищі для дозрівання. Відбір та відмивання ооцит-кумулюсних комплексів



Рис. 21. Розсічення стінки фолікула лезом бритви

здійснюють на нагрівальному столику при $+37^{\circ}\text{C}$.

6. Ооцити дозрівають *in vitro* протягом 46 год. в чашках Петрі (25 ооцит-кумулясних комплексів у 1 см^3) у середовищі 199 на розчині Ерла, доповненому 20% інактивованої нагріванням (56°C , 30 хвилин) еструсної сироватки корів, $0,068\text{ мг/см}^3$ канаміцину сульфату, $0,11\text{ мг/см}^3$ натрію пірувату і $0,1\text{ мг/см}^3$ глутаміну та $3 - 5 \times 10^6$ клітин гранульози на см^3 , які вилучають з преантральних фолікулів. Дозрівання здійснюють в умовах CO_2 -інкубатора при $t=38,5^{\circ}\text{C}$.

Критерієм повноцінного дозрівання ооцитів є виявлення полярного тіла.

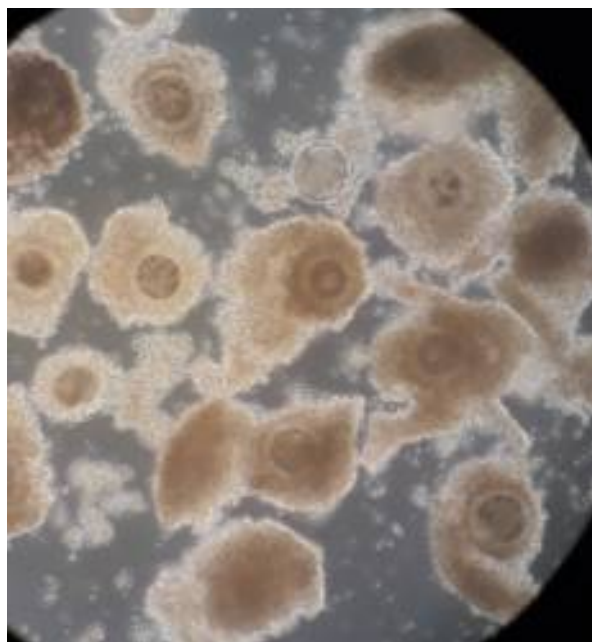


Рис. 22. Ооцит-кумулясні комплекси корови



Питання для самоконтролю:

1. Що таке «яйцеклітина», опишіть її будову?
2. Назвіть етапи фолікулогенезу.
3. Назвіть етапи оогенезу.
4. У чому відмінності фолікуло- і оогенезу?
5. Що ви розумієте під поняттям «суперовуляція»?
6. Які ви знаєте препарати для стимуляції суперовуляції?
7. Які є методи оцінки ооцитів?
8. Що враховують при класифікації ооцит-кумулясних комплексів за балами?
9. Які ооцити вважаються аномальними? Яка їх подальша доля?

РОЗДІЛ 4: СПЕРМАТОГЕНЕЗ ТА ОЦІНКА ЯКОСТІ СПЕРМИ

Сперматозоїд – це дрібна, здатна рухатися гаплоїдна клітина самців тварин, яка здатна проникати в яйцеклітину з ціллю активації і зародження нового індивідууму шляхом заповнення видового спадкового матеріалу. Сперматозоїд містить ядро і цитоплазму з її звичайними органелами. Спеціальна диференціація цитоплазми зумовлює його здатність до руху. Структура сперматозоїда зумовлена їх функцією, саме через це вони складаються з головки, шийки і хвостового відділу (рис. 23.). Головка – це передня частина сперматозоїда, довжина її складає приблизно 4-6 мкм, вона завжди розширена. Більшу частину головки займає щільне багато нуклеопротейдами ядро, в ньому локалізується спадковий матеріал (чоловічий набір щільно упакованих хромосом). Сперматозоїди гетерогенні, так як в їхніх ядрах містяться різні типи статевих хромосом. Спереду ядра міститься акросома (across – верхній, крайній, soma – тіло) – це невелика щільна гранула, яка заключена в вакуолю. Вона утворює передню частину головки. Акросома утворюється у результаті перебудови комплексу Гольджі. В акросомі знаходиться акросомна нитка і ферменти: гіалуронідаза, спермолізину (D, E) і проакрозин. Під впливом ферментів при заплідненні у яйцеклітині порушується цілісність вторинної оболонки, що необхідно при проникненні сперматозоїда всередину яйцеклітини. Акросома грає суттєву роль у стимуляції яйцеклітини до подальшого розвитку.

За головою розташовується шийка, довжиною приблизно 0,6 мкм та складається з двох центріолей: проксимальної та дистальної. Перша при заплідненні вноситься в цитоплазму яйцеклітини, зумовлюючи її ділення. Дистальна центріоль також складається з двох частин: передньої та задньої. Від передньої починається осьова нитка хвостика, саме через це її відносять до апарату руху сперматозоїда. Задня частина дистальної центріолі має форму кільця і знаходиться на межі початкової і головної частини хвостового відділу сперматозоїда.

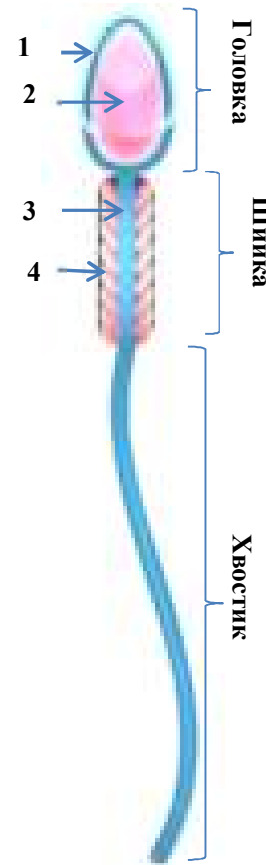


Рис. 23. Спрощена схема будови сперматозоїда:

- 1 – акросома;**
- 2 – ядро;**
- 3 – центріоль;**
- 4 – мітохондрії.**

Хвостовий відділ, довжина якого знаходиться у межах 20–30 мкм, складається із початкової, головної та кінцевої частин. В центрі всього хвостика проходить осьова нитка, яка слугує його скоротливим елементом. Зазвичай хвостик буває сильно витягнутим і по довжині в багато разів перевищує головку. В початковій частині хвостика зосереджена основна маса цитоплазми сперматозоїда. Тут багато мітохондрій, які розміщені по спіралі навколо осової нитки. Функціональна роль хвостика – забезпечення руху сперматозоїда по геніталіям самки. В середині яйцеклітини органом руху у сперматозоїда стає центріоль.

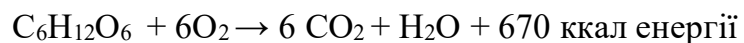
Сперматозоїди здатні до руху в напрямку до яйцеклітини (хемотаксис) і проти току рідини (реотаксис). Вони володіють мінімальним запасом поживних речовин, які дуже швидко витрачаються при їх русі. В хвостіку містяться ферменти сукциндегідраза і аденозитофосфатаза, а також скоротливий білок – спермозин, які в комплексі забезпечують рух сперматозоїда.

У тварин з зовнішнім заплідненням поступальний рух сперматозоїдів здійснюється по спіралі. Сперматозоїди тварин з внутрішнім заплідненням рухаються в статевих шляхах самки прямолінійно. Швидкість руху сперматозоїдів доволі висока, в середньому він дорівнює 7,5 см/сек. Таким чином, сперматозоїд забезпечує зустріч і створює необхідні умови для свого проникнення в яйцеклітину.

Довжина сперматозоїдів різних тварин варіюється, але, в основній своїй масі, це дрібні клітини. Ніякої залежності між розмірами сперматозоїдів і розмірами тварини не прослідковується. Так, довжина сперматозоїда горобця складає 200, морської свинки – 100, бика – 65, кролика 20 мкм.

Головна відмінність сперматозоїдів від інших клітин – їх здатність до активного руху за рахунок енергії дихання і гліколізу. Основні біоенергетичні процеси, що відбуваються у всіх без винятку складових частинах сперматозоїда, є головним чином джерелами енергії, що забезпечують їх життєздатність, рух та запліднюючу здатність. У дослідях багатьох вчених було встановлено, що основними джерелами енергії є дихання, гліколіз і руйнування АТФ.

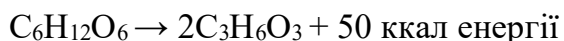
Сперматозоїди – факультативні анаероби, тобто можуть жити і рухатися як в присутності кисню, так і в безкисневому середовищі. Дихання – біохімічний процес, що забезпечує клітини енергією. Близько 90 % всієї необхідної енергії сперматозоїдів отримують за рахунок дихання, в процесі якого під впливом кисню окислюються насамперед, прості цукри: фруктоза, глюкоза, а потім інші речовини (ліпіди, білки). У результаті дихання утворюються діоксид вуглецю, вода і аміак (при окисленні білків), і виділяється велика кількість енергії. Хімічно процес дихання можна виразити такою формулою:



Вказана кількість енергії виділяється при розпаді 1 грам-молекули фруктози. Дихання, як і більшість життєвих процесів, посилюється з підвищенням температури та послаблюється при її зниженні, при чому на кожні 10°C підвищення чи зниження температури воно, відповідно, підвищує чи

знижує кількість приблизно у 2 рази. Лужне середовище підвищує інтенсивність дихання сперматозоїдів, кисле, навпаки – знижує. При відсутності кисню джерелом енергії служить цукор (фруктоза і глюкоза), який засвоюється шляхом гліколізу та фруктолізу.

Гліколіз – це друге після дихання джерело енергії для сперматозоїдів. Суть цього процесу полягає у тому, що розщеплення цукру відбувається без участі кисню. Процес гліколізу можна виразити такою формулою:



При гліколізі з 1 грам-молекули фруктози утворюється дві молекули молочної кислоти і майже 10% від загальної кількості енергії.

Третім джерелом енергії, яке забезпечує рух сперматозоїдів, є АТФ, молекула якого складається з аденіну, рибози та трьох частин фосфорної кислоти. При відриванні однієї молекули фосфорної кислоти АТФ перетворюється на аденозинтрифосфат (АДФ), цей процес можна виразити таким рівнянням:



Розрив макроенергетичного зв'язку забезпечується безпосередньо спермозином, який має властивості ферменту. Енергія, яка виділяється при відщепленні фосфату, передається спермозину, той скорочується, і в результаті відбувається пряме перетворення хімічної енергії у механічну. Енергію для реасинтезу АДФ в АТФ сперматозоїди отримують під час процесу дихання та гліколізу.

4.1. СПЕРМАТОГЕНЕЗ

Сперматогенез представляє собою серію високоспеціалізованих, суворо регульованих процесів, що включають мітоз, мейоз і диференціювання клітин-попередників сперматозоїдів. Цей процес проходить в епітелію звивистих сім'яних каналців сім'яників. Розвиток і підтримка сперматогенезу у дорослих особин залежать від функціонування клітин Сертолі сім'яників і контролюються гонадотропінами (ЛГ і ФСГ) і стероїдними гормонами (тестостерон і естрадіол). Сформовані сперматозоїди з сім'яних каналців надходять в придаток сім'яника - епідіміс, де вони дозрівають і набувають рухливості. Фізіологічне протікання процесів формування сперматозоїдів в сім'яниках і їх дозрівання в придатку сім'яника в остаточному підсумку формує якість сперми - сукупність ознак, що визначають її здатність до запліднення. Основними показниками якості сперми вважаються концентрація сперматозоїдів в еякуляті, частка рухливих сперматозоїдів і частка морфологічних аномальних форм сперматозоїдів.

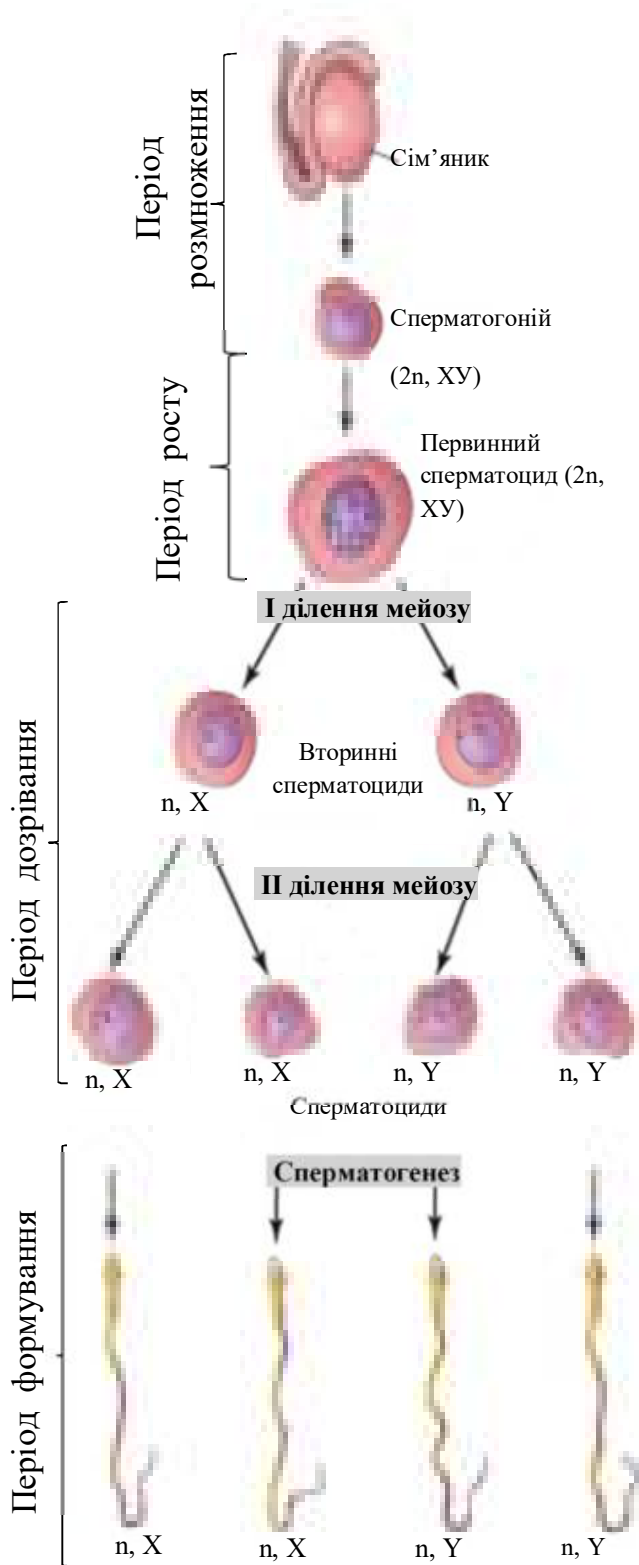


Рис. 24. Сперматогенез

Формування сперматозоїдів проходить чотири етапи (рис. 24): розмноження, ріст, дозрівання (що проходять подібно до оогенезу) і формування.

Період формування – характерний тільки для сперматогенезу і слугують завершальним періодом розвитку, в ході якого округла клітина – сперматид – набуває морфологічні властивості, характерні для сперматозоїда. В ході формування світле округле ядро сперматиди поступово ущільнюється, стає овальним і переміщається до плазмолемі, тобто до тієї частини клітини, яка в подальшому, стає її переднім кінцем. Комплекс Гольджі переміщається до ядра і продукує велику гранулу – акробласт. Останній збільшується в розмірах і в вигляді чохлика охоплює ядро сперматиди – майбутню головку сперматозоїда. В середній зоні акробласта з найменших зерен формується акросома, вона багата ферментом гіалуронідазою. До протилежного від ядра полюсу переміщається центросома, в якій розрізняють проксимальну і дистальну центріолі. При цьому вони розміщуються до довжині осі клітин так, що одна з них (дистальна) розміщується далі від центру, ніж інша (проксимальна). З дистальної

виростає джгутик який виходить з клітини перетворюючись на осьову нитку, а проксимальна при заплідненні потрапляє у зиготу і приймає участь у діленні.

Ділянка цитоплазми, обмежений центріолями, утворює шийку. Дистальна центріоль ділиться на дві частини: передню і задню. Від передньої частини дистальної центріолі відростає осьова нитка хвостика, яка складається з мікротрубочок. Задня частина дистальної центріолі набуває вигляд кільця. Вона сповзаючи по осевій нитці хвостика тягнучи за собою цитоплазму сперматиди, що містить мітохондрії і глікоген, розміщуючись між початковим і головним відділами хвостика сперматозоїда. Зміщуючись по хвостіку, цитоплазма таким чином «одягає» головну його частину. Клітина продовжує видовжуватись і набуває форми сперматозоїда. Різноманітні форми сперматозоїдів викликана деякими відмінностями в процесі формування із сперматид.

4.2. СПЕРМА

Сперма – продукт життєдіяльності залоз статевого апарату самців. Сперма за своїми фізико-хімічними і біологічними особливостями – неоднорідна рідина, яка утворюється від змішування сперматозоїдів з секретами придатка і придаткових статевих залоз (цибулиноподібна, передміхурова (простата) і сім'яні міхурці) в процесі еякуляції.

Сперма складається з двох основних частин: сперматозоїдів – статевих клітин самця, які утворюються в звивистих каналцях придатка сім'яника, і плазми – рідкої частини сперми, яка складається із секрету придатка сім'яника і секретів придаткових статевих залоз.

Сперматозоїди – найважливіший компонент сперми, вони володіють запліднюючою здатністю, автономним рухом, і в них закладені спадкова інформація. Плазма складна по хімічному складу рідина, яка містить поживні речовини для сперматозоїдів, солі, вітаміни, ферменти, що у комплексному своєму впливі забезпечують життєздатність сперматозоїдів після виходу їх з статевих шляхів самця на певний час. В природніх умовах плазма, слугуючи середовищем для сперматозоїдів, грає незамінну роль у заплідненні. В умовах штучного осіменіння, як довів І. І. Іванов, плазма може бути замінена на різноманітні розчини, що мають відповідний осмотичний тиск, поживні речовини і реакцію середовища.

Об'єм еякуляту (кількість сперми, що виділяється самцем за одні садку), співвідношення сперматозоїдів і плазми залежать від кількості секретів придаткових залоз і варіюються не тільки по видах тварин, по і всередині одного виду, а також в одного і того ж самця при різних умовах годівлі, утримання, експлуатації тощо.

В'язкість сперми і питома вага лежать у прямій залежності від концентрації сперматозоїдів. Наприклад, в'язкість сперми бика при концентрації сперматозоїдів 1 млрд в 1 мл складає 3,5–4, а при концентрації в 2 млрд досягає 7–10 (в'язкість води 1). В'язкість сперми залежить від стану плідника, умов утримання, годівлі, якості секретів статевих придаткових залоз.

Сперма у своєму складі містить 90–98 % води і 2–10 % сухої речовини. Основними її компонентами є білки (60 % сухої речовини) і ліпіди. В склад білків входять амінокислоти, які містять у своєму складі сірку. У спермі також виявляють лимонну кислоту, вільні амінокислоти, сорбіт, інозитол. В еякуляті

широко представлені біологічно активні речовини: ферменти (кисла і лужна фосфатаза, гіалуронідаза, глюкозидаза, амілаза, ліпаза, протеаза, оксидаза та інші), анти аглютиніни, простагландини, гормони (андрогени, естроген), вітаміни (аскорбінова кислота, тіамін, рибофлавін, ретинол). В сухій речовині сперми міститься приблизно 1 % золи, у її склад входить фосфор, кальцій, магній, калій, натрій, хлор, цинк, залізо, купрум і ряд інших елементів.

Важливою складовою сперми є цукор, в основній своїй масі це фруктоза, в меншій кількості глюкоза, галактоза, арабіноза та інші. Цукор сперми виробляється сім'яними міхурцями під впливом статевих гормонів. Процентне співвідношення цукру в спермі залежить від годівлі плідника.

Секрети придаткових залоз грають важливу роль в утворенні сперми і забезпечують життєдіяльність сперматозоїдів. Перед статевим актом вони очищають сечостатевий канал від залишків сечі, зволожують його і кінцеву частину статевого члена, що полегшує його вхід в піхву. Розбавляючи густу масу сперматозоїдів, секрети сприяють кращому проходженню сперми по сечостатевому каналу. Слабо лужне середовище придаткових статевих залоз, наявність електролітів(особливо солей натрію) і інші речовини виводять сперматозоїди із стану анабіозу. Набуваючи активного стану, вони швидко витрачають свої життєві ресурси, через це час їхнього існування сильно обмежений.

Рухливість сперматозоїдів. Нерухомий стан сперматозоїдів у придатках сім'яників, при якому вони зберігають життєздатність, називається анабіозом. У хвості придатка сім'яника підтримується слабо кисла реакція середовища (рН 6,3–6,4), завдяки чому сперматозоїди перебувають у стані природного анабіозу. Тривалого збереження життя сперматозоїдів, крім цього, сприяють знижена температура, в'язкий секрет каналу придатка, щільне розташування сперматозоїдів, рясне постачання поживними речовинами і швидке видалення продуктів метаболізму. У хвості придатка сперматозоїди зберігають рухливість до 2 місяців, здатність до запліднення - протягом 1 місяця.

В кінцевому відділі протоки придатка сім'яника сперматозоїдів покриваються тонкою ліпідно-білковою оболонкою, набувають однакового негативного електричного заряду і починають відштовхуватися один від одного, що дозволяє їм у подальшому активно рухатися. Активний рух сперматозоїдів – одна з основних умов можливості зустрічі їх з яйцеклітиною та повноцінності процесу запліднення. Розрізняють декілька видів руху сперматозоїдів у самців: прямолінійно-поступальний, маневрний, коливальний та нерухомі – мертві сперматозоїди.

Сперматозоїди рухаються зі швидкістю 2–5 мм за хвилину. В статевих органах самки тварин вони рухаються прямолінійно, що залежить від симетрії голівки. Спрямування руху сперматозоїдів визначається реотаксисом, тобто здатністю рухатися проти течії рідини. Реотаксис проявляється лише при порівняно слабкому зустрічному потоці слизу. Швидкість руху сперматозоїдів залежить від температури, рН середовища та його в'язкості. В кислому середовищі голівки сперматозоїдів набрякають, округлюються втрачають асиметрію і тому вони набувають колового руху, що заважає їм рухатися

прямолинійно і мінімізує можливість зустрічі з яйцеклітиною. Швидкість руху сперматозоїдів в свіжо-отриманій спермі знаходиться в межах 30–80 мкм/сек або в середньому 4 мм за хвилину. У сперматозоїдах малий запас поживних речовин, вони його швидко втрачають і через 24–36 годин гинуть, якщо не зустрінуться з яйцеклітиною.

Щоб зберегти життєздатність сперматозоїдів їх повертають до стану анабіозу. Завдяки анабіозу витрата енергетичних ресурсів на процеси життєдіяльності спрямовує і накопичення продуктів метаболізму різко скорочується, що збільшує термін життя клітин поза організмом. Це широко використовують в штучному заплідненні. Досить сказати, що всі існуючі способи короткочасного і тривалого зберігання сперми засновані на створенні і підтримці анабіозу. В даний час відомо кілька методів створення штучного анабіозу сперматозоїдів: зниження температури до 2–4°C, глибоке охолодження сперматозоїдів (до 196 °C); зниження рН сперми до 6,3–6,4 завдяки використанню органічних кислот (вугільної, лимонної та ін); застосування хімічних інгібіторів метаболічних процесів в сперматозоїдах (хелатон та ін.).

4.2.1. Методи отримання сперми

Техніка одержання сперми повинна бути технічно простою, легкодоступною, безпечною для здоров'я плідників та не викликати у самців больових відчуттів. При отриманні сперми необхідно отримувати весь еякулят та не забруднювати сперму.

Одержання сперми – це складний процес, від якого залежить раціональне використання плідника, кількість і якість сперми. На сьогодні виділяють наступні методи отримання сперми:

- піхвові (власне піхвовий та губковий) отримують із піхви самки в стані статевої охоти після спарування її з самцем;
- уретральні (мастурбація, фістульний, застосування спермозбирача, проведення масажу ампул спермопроводів, електроеякуляції та штучної вагіни) сперму одержують безпосередньо з уретрального каналу самця;
- хірургічний передбачає отримання сперми після проведення відповідної операції.

Піхвові методи отримання сперми.

При піхвовому або дзеркальному методі після природної садки плідника на самку, в її піхву вводять піхвове дзеркало і вибирають сперму за допомогою ложки або просто рукою. Недоліками цього методу є:

- допускається природний статевий акт, який не виключає небезпеки перенесення заразних захворювань,
- необхідність мати самку в охоті;
- виділена плідником сперма розріджується секретами статевих органів самки і її повністю не можна зібрати.
- у тварин з матковим типом природного парування цей метод цілком непридатний через анатомічні особливості будови піхви (вузька і довга) і введення під час коїтусу сперми безпосередньо в матку.

У зрівнянстві піхвовий метод застосовують для отримання сперми від песців, лисів, норок та соболів. Так, одразу після статевого акту самок заносять у тепле приміщення, де за допомогою спеціальних теплих, стерильних скляних трубочок з кулькою висмоктують сперму з передньої частини піхви.

З часом на зміну піхвовому методу І. І. Івановим був запропонований губковий метод. За використання даного методу отримання сперми перед статевим актом у піхву самки за допомогою корнцанга вкладають знезаражену м'яку грецьку губку, яка після коїтусу із самцем вбирає у себе сперму. Потім губку виймають і видавлювали спеціальним пресом. Варто відмітити, що даний метод відбору сперми зберіг недоліки піхвового методу. Додатково, губка, як стороннє тіло, може гальмувати статеві рефлекси і порушувати динаміку еякуляції, а під час видавлювання сперми багато сперматозоїдів травмуються. На даний час дані методи отримання сперми не використовуються.

Хірургічні методи

В 30-х роках минулого сторіччя була запропонована операція промежнинної уретростомії при захворюваннях статевого члена у жеребців. Дещо пізніше цю операцію застосовували для одержання сперми від бугаїв, а потім у свою практику ввів і Х. І. Животков у конярстві. Уретростомію сечостатевого каналу проводять так, щоб нижній кінець фістули знаходився між сідничними горбами тварин. Під час отримання сперми у жеребця корінь хвоста забинтовують, а краї фістули протирають ватним тампоном, змоченим 50–60 % розчином спирту. Жеребець робить природну садку на кобилу в стані статевої охоти. Технік при цьому відводить хвіст набік, до отвору фістули підставляє спермоприймач чи скляний стаканчик і збирає сперму. Недоліками даного методу є:

- необхідно мати оперованих самців і самок в стані охоти;
- не виключається природний статевий акт, хоч сперма і не потрапляє

у піхву.

До хірургічних методів відносяться кастрація плідників з наступним збиранням сперми з придатків сім'яників, а також операція фістули сім'япроводів.

Уретральні методи.

Якщо суть піхвових методів зводилась до збирання сперми з піхви самки після коїтусу, то при уретральних методах її отримують безпосередньо з уретри самця, користуючись різними прийомами та приладами.

Ще у 1925 р. Кейз, а згодом Міллер і Еванс запропонували отримувати сперму від бугаїв шляхом масажу ампул сім'япроводів через пряму кишку, Масаж ампул викликає їх судомне скорочення і сперма виділяється назовні. При цьому попередньо вистригають шерсть навколо препуційного отвору, промивають порожнину препуція 1 % розчином натрію хлориду. Плідника підводять до корови в стані статевої охоти і витримують декілька хвилин (щоб спермії з придатка сім'яника перемістилися в ампули сім'япроводів). В цей час вводять в пряму кишку бугая підготовлену руку в акушерській рукавиці, змащену вазеліном, звільняють її від фекалій знаходять на досальній частині шийки сечового міхура ампули сім'япроводів в палець товщиною. Обережно роблять їх масаж спереду назад, протягом 2–3 хв. Коли з препуційного отвору

починає виділятися сперма (без ерекції статевого члена), технік збирає її у підставлений посудину. Проте цим методом можна користуватися лише тоді, коли інші методи застосувати не можливо (наприклад, при хворобах кінцівок, хребта, недостатньому прояві статевих рефлексів і т. п.). Недоліками цього методу є те, що при частих масажах прямої кишки може виникнути її запалення, а необережні маніпуляції в ній можуть навіть закінчитись її пошкодженнями та перфорацією.

Метод мастурбації полягає у механічному подразненні голівки статевого члена при терті її препуційним мішком. Цей метод використовується для одержання сперми у кобелів та хутрових звірів. У кобелів швидко виникає рефлекс ерекції при мастурбації і після декількох прогладжувань головки статевого члена через препуцій настає еякуляція.

Метод електроєякуляції дозволяє отримувати сперму від бугая, барана, папа, кроля, а також птахів без попереднього привчання самців. Він може використовуватися і для одержання сперми від диких тварин при гібридизації. Даний метод полягає у подразненні нервової системи самця переривчастим електричним струмом низької напруги і малої сили за допомогою спеціального приладу – електроєякулятора. При одержанні сперми у плідника його фіксують в станку, звільняють пряму кишку від фекальних мас і вводять в пряму кишку щуп електроєякулятора, зволожений фізіологічним розчином (на глибину: до 30 см бугаю; 7–15 см – барану), а другий електрод – пінцет Пеана приєднують до верхівки калитки. Після чого здійснюють подразнення центру еякуляції, нервових закінчень ампул сім'япроводів періодичними вмиканнями на 5 секунд і розмиканнями на 5–10 секунд приладу. Для викликання еякуляції у барана застосовують електричний струм напругою від 4 до 8 В при силі струму 1,5–2 мА, а у бугая – 8–10 до 20–30 В і силі струму 500–700 мА. При цьому настає подразнення центру еякуляції, розташованого в поперековій частині спинного мозку, а також симпатичних і парасимпатичних нервів статевих органів, внаслідок чого настає еякуляція. Цим методом отримують сперму від плідників, які відмовляються або не можуть робити садку на штучну вагіну (дуже велика маса, старість, хвороби копит, ушкодження суглобів, зв'язок та м'язів тазових кінцівок, анатомічні дефекти та новоутворення статевого апарату, гальмування статевих рефлексів і т.п.).

Метод отримання сперми за допомогою штучної вагіни є основним на станціях штучного осіменіння, що дозволяє отримати від самця повноцінну сперму без сторонніх домішок. Штучна вагіна повинна бути не шкідливою для здоров'я плідника; при її застосуванні виключається можливість передачі інфекційних захворювань через статевий акт, в ній створюються умови, необхідні для нормального проявлення рефлексу еякуляції.

У 1932 р. вперше була запропонована штучна вагіна, яка дозволила відтворити у ній подразнення нервових закінчень статевого члена плідника, які необхідні для створення повноцінного еякуляту. Такими подразниками є: відповідна температура, тиск і слизька поверхня.

Штучна вагіна складається з двостінного циліндра, в міжстінний простір якого наливається тепла вода і нагнітається повітря. На одному кінці вагіни

закріплюється спермоприймач. Для кожного виду тварин є своя модель штучної вагіни, але всі вони побудовані за одним принципом. Вона складається:

- циліндр, в якому є патрубок для наливання води та нагнітання повітря; гумової камери;
- ебонітовий краник або ж загвинчувана гайка у вагіні жеребця та вагіні І. І. Родіна для бугая;
- спермоприймач ча гумового спермоприймача у вагіні для жеребця чи сполучної трубки для приєднання спермоприймача у вагіні для кнура;
- гумові кільця для закріплення камери на циліндрі у вагіні для бугая, кнура, жеребця;
- водяного манометра з гумовим балоном чи кулями Річардсона у вагіні для кнура конструкції О. В. Квасницького.

Для отримання сперми від бугая застосовують штучну вагіну конструкції 1942 р. її циліндр довжиною 50 см та діаметром 8 см, виготовлений з товстої гуми, в середину якого вставляють еластичну камеру, кінці камери завертаються на краї циліндра і закріплюють гумовими кільцями. На один кінець штучної вагіни закріплюється поролонова накладка, а до другого приєднують спермоприймач. Правильно підготовлена штучна вагіна повинна мати температуру в межах 40–42°C, слизьку внутрішню поверхню та тиск 50–60 мм. рт. ст.

В подальшому з'явилися нові моделі штучних вагін:

- І. І. Родіна – металева з балоноподібним розширенням діаметром 13,6 см у верхній частині циліндра для вільного руху головки прутня під час еякуляції;
- Д.Д. Логвінова вкорочена зі спеціальною конусовидною насадкою з прозорого термостійкого скла та герметичним спермоприймачем.
- вкорочені до 33 см вагіни, в яких спермоприймач з'єднаний конусоподібною гумовою трубкою довжиною 17 см із штучною вагіною;
- вкорочені до 30 см штучні вагіни з одноразовим поліетиленовим спермоприймачем.

Для одержання сперми у барана використовують вагіну зразка 1942 року. Вона має твердий ебонітовий, капроновий або гумовий корпус довжиною 20 см і діаметром 5,5 см та спермоприймач.



Рис. 25. Штучна вагіна, що використовується для отримання сперми жеребців та биків.

Логвинов Д. Д. та інші для асептичного одержання сперми рекомендують приєднувати до кінців вкороченої вагіни поліетиленові мембрани (діафрагми) з хрестоподібним розрізом в центрі чи тільки на вхідний отвір стерильну поролонову накладку також з розрізом в центрі, а одноразовий поліетиленовий спермоприймач після отримання сперми герметизувати. Спермоприймачі у вагінах для бугая та барана бувають скляними, одно- чи двостінними. Одностінні можна використовувати при температурі повітря у манежі в межах не нижче 18-20 °С. У всіх інших випадках користуються двостінними спермоприймачами, в міжстінний простір яких наливають теплу воду.

Для жеребця запропонована штучна вагіна зразка 1952 року з алюмінію або оцинкованого заліза з ручкою для тримання вагіни.

За кордоном є більш сучасні штучні вагіни для жеребців. Серед них можна назвати такі:

- штучна вагіна для жеребця “Hannover”, яка має в комплекті корпус, гумові камери, фіксаційні кільця та шкіряну ручку для фіксації;

- штучна вагіна для жеребців “Missouri”, в комплект якої входить подвійний латексний вкладиш, шкіряний футляр та спермоприймач, її довжина приблизно 55 см;

- штучна вагіна для жеребців “Colorado SU” в її комплект входить 2 гумові трубки, 10 гумових кілець, 2 затискачі, 25 одноразових вкладишів, 25 спермоприймачів, 25 нейлонових фільтрів, термос та пластмасовий корпус.



Рис. 26. Штучна вагіна для жеребців “Missouri”

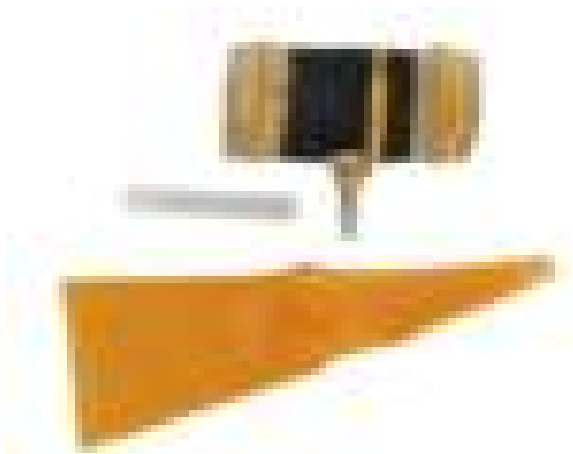


Рис. 27. Штучна вагіна для кнурів

Для отримання сперми у кнура використовують штучні вагіни двох типів:

- гумову вагіну конструкції В. К. Милованова або штучну вагіну ВІТ – це вагіна для бугая зразка 1942 року, але корпус якої вкорочено на 10–15 см;

- металеву вагіну конструкції А. В. Квасницького з Полтавського науково-дослідного інституту свинарства. Вона може бути двох варіантів: водоналивна або електронагрівальна (електрична).

Штучна вагіна для кроля складається із пластикового чи щільного гумового корпусу з двома отворами, навколо яких є виступи для фіксації гумової камери. Через два патрубки з ебонітовими краниками наливають у вагіну теплу воду. Спермоприймачем служить невеличка пробірка, що з'єднується з балоном гумовою трубкою.

У Болгарії сконструйовано штучні вагіни для півня та селезня. Циліндр вагіни для півня каучуковий довжиною 5 см має лійкоподібну форму, з діаметром у широкій частині 5 см і у вузькій -1,5 см. Внутрішня камера вагіни виготовлена з еластичного каучуку. Штучна вагіна для селезня складається лише з основного циліндра.



Рис. 28. Штучна вагіна для кроля

4.2.2. Рух сперматозоїдів геніталіями самки

Механізм просування сперматозоїдів в статевих шляхах самки, введених при штучному або природному осіменінні, ще не достатньо вивчений, а тому залишається актуальною проблемою біотехнології відтворення.

Як відомо, сперматозоїди плідників самостійно рухаються прямолінійно поступально, що сприяє їх переміщенню від місця введення до місця запліднення – ампулоподібного розширення яйцепроводів. Крім того, сперматозоїдам властива здатність до реотаксису, тобто рух проти течії рідини. Виділення слизу під час тічки та статевої охоти у самок спрямовує їх рух у піхві, матці та яйцепроводах.

У тварин з матковим типом осіменіння велика кількість сперми, яка вводиться в статеві шляхи, своєю масою сприяє руху сперматозоїдів до місця запліднення. У тварин з піхвовим типом осіменіння у шийку матки проникає лише до 0,5 % сперматозоїдів, що викликано великою складчастістю слизової оболонки шийки матки та густим слизом.

Більшість вчених вважають, що дуже велику роль відіграють в просуванні сперматозоїдів до місця запліднення скорочення м'язів матки та яйцепроводів, яке зростає під час тічки та статевої охоти. Скорочення матки стимулюється також окситоцином, який виділяється задньою долею гіпофіза в результаті подразнення рецепторів статевих органів самки. При цьому штучне введення сперми викликає таку ж саму реакцію зі сторони матки, як і при природному статевому акті.

У деяких видів тварин у спермі присутні простагландини, які виділяються передміхуровою залозою. Вони володіють утеротонічною дією і сприяють руху сперматозоїдів завдяки скороченню м'язів матки. Після виділення сперми у ній утворюється ацетилхолін, що також підсилює моторику матки. Скорочення повздовжніх з одночасним розслабленням циркулярних м'язів призводить до

розкриття шийки матки.

Як встановлено, скороченню матки під час статевого збудження сприяє присутність самця. Якщо до кобили в стані статевої охоти підвести жеребця, у неї починають скорочуватися циркулярні м'язи матки, а потім через декілька хвилин – повздожні. Це призводить до розрідження і засмоктуванню сперми в матку та яйцепроводи. Потім повздожні м'язи розслаблюються, а циркулярні скорочуються, що призводить до ще глибшого засмоктування сперми в матку та яйцепроводи. Завдяки вищеописаній дії м'язів самки сперматозоїди досягають верхівки рогів кобили за декілька секунд.

Отже, рух сперматозоїдів у статевих шляхах самки залежить від реотаксису, тривалості статевого акту та моторики матки. При потраплянні сперматозоїдів у яйцепровід додаються рухи в'їчастого епітелію та скорочення м'язів черева. Швидкість руху сперматозоїдів залежить від їх рухливості, присутності самця біля самки, подразнень рецепторів гені талій під час статевого акту чи штучного осіменіння.

Швидкість руху сперматозоїдів до яйцепроводів у різних видів тварин відрізняється, так у корів їх виявляли в яйцепроводах через від 2,5 хв. до 14 годин, у овець – від 6 хв. до 1 години, у кобил - через 30-60 хв., у свиней при природному осіменінні – через 30-60 хв., а при штучному осіменінні – через 1,5–2 години. Варто зазначити, що яйцепроводів досягають не всі сперматозоїди, частина їх затримується в складках шийки матки, потрапляє у вивідні протоки маткових залоз чи аглютинуються. Крім того, вхід в яйцепровід відкривається лише в кінці охоти, тому найкращим періодом для досягнення ампул яйцепроводів є статеві охота у самок.

4.2.3. Аглютинація сперматозоїдів

Сперматозоїди мають негативний електричний заряд, що забезпечують взаємне відштовхування сперматозоїдів, попереджуючи їх склеювання. Під впливом електричного заряду сперматозоїди розміщуються паралельно, що створює певний порядок їхнього руху. Зниження електричного заряду послаблює взаємне відштовхування сперматозоїдів, і вони починають склеюватися головками чи іншими частинами. Це явище називається аглютинацією. Аглютинація сперми виникає при наявності в спермі позитивно заряджених іонів чи спермаглютинінів, підвищеної кислотності середовища.

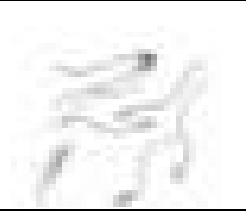
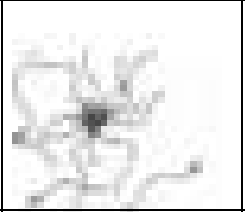
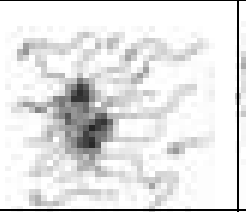
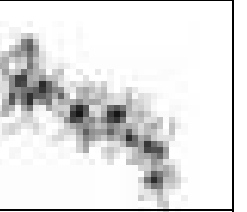
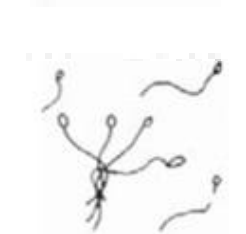

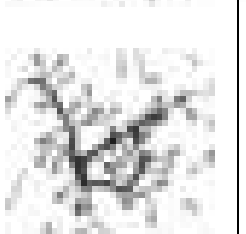
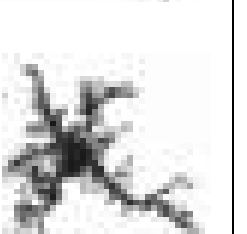

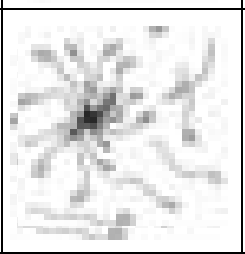
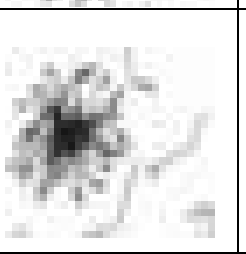
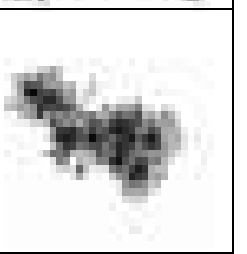

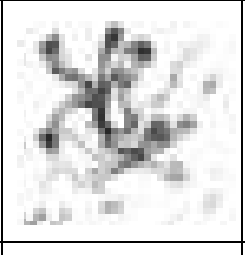
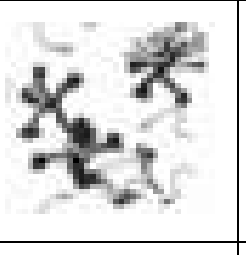
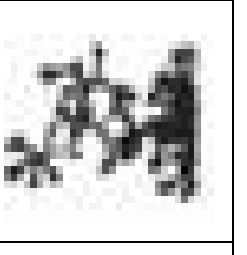
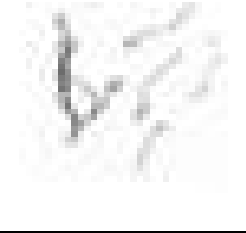
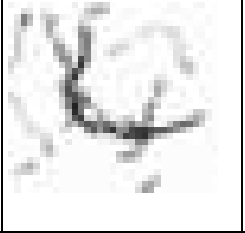
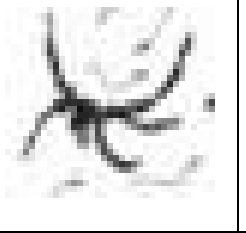
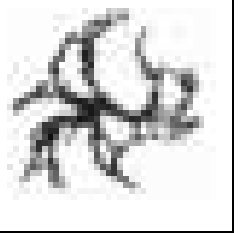
Аглютинація може бути зворотна, якщо сперматозоїди склеюються лише головками і зберігають рухливість – «зірчаста аглютинація» і незворотною, коли сперматозоїди склеюються один з одним неупорядковано (табл. 2)

Доведено існування спермаглютинінів в статевих шляхах самки відносно сперматозоїдів самців іншого виду. Утворення спермаглютинінів, як реакція організму, виникає при парентеральному проникненні білка сперматозоїдів в організм, що виникає при багаторазовому введенні сперми у статеві шляхи самки.

У молодих самок спермаглютинінів немає, на відміну від тварин, що багато народжували. В природних умовах у здорових тварин в фолікулярній рідині і секретах придаткових залоз присутні антиаглютиніни, які попереджують

аглотинацію і навіть відновлюють нормальний стан сперматозоїдів при зірчастій аглотинації.

Таблиця 2. Ступінь аглотинації сперматозоїдів

Частини, що з'єднались	Ступінь аглотинації			
	Ізольований (<10 сперматозоїдів аглотиновані, багато вільних)	Помірний(10-50 сперматозоїдів аглотиновані, багато вільних)	Сильний (>50 сперматозоїдів аглотиновані деякі вільні)	Тотальний (всі сперматозоїди аглотиновані)
Головка до головки				
Хвостик до хвостика				
Кінчиками хвостиків				
Змішана (голівки до головок, хвостики до хвостиків)				
Плутана (не можливо виявити місце аглотинації)				

4.2.4. Дія факторів зовнішнього середовища на сперматозоїди

Підвищення температури до 40 °С помітно активізує сперматозоїди, але при цьому різко скорочується термін їх життя. При 45 °С сперматозоїди втрачають здатність до запліднення внаслідок інактивації ферментних систем, а при 48°С гинуть.

Поступове зниження температури уповільнює рух сперматозоїдів, оскільки гальмуються дихання і фруктоліз. При 15°C рух стає коливальним, а після охолодження до 5°C припиняється (температурний анабіоз).

Прямі сонячні промені вбивають сперматозоїди за 20-40 хв. Несприятливим є і сильне електричне світло. Розсіяне світло не має шкідливого впливу.

У свіже отриманої сперми бика і барана нейтральна або близька до нейтральної реакція (рН 6,7–7,0), у сперми кнура і жеребця – слаболужна (рН 7,2–7,6), собаки – слабо кисла (рН 5,8–6,9). Накопичення водневих іонів гальмує процеси життєдіяльності сперматозоїдів. При зниженні рН настає кислотний анабіоз, подальше зниження викликає загибель сперматозоїдів.

Зрушення рН в лужну сторону спочатку активізує сперматозоїди, але при рН 7,8–8,0 вони гинуть.

У сільськогосподарських тварин осмотичний тиск сперми знаходиться в межах від 7,6 до 9,0 атм. (695 кПа). У середовищі з меншим осмотичним тиском (гіпотонічні розчини) сперматозоїди набухають, в середовищі з підвищеним осмотичним тиском (гіпертонічні розчини) зморщуються; в тому й іншому випадках швидко гинуть.

Іони електролітів, що знаходяться в плазмі і в самих сперматозоїдах, можуть надавати різноманітну дію: ущільнювати або розпушувати оболонку сперматозоїда; нейтралізувати електричний заряд; змінювати проникність мембран, гальмувати або, навпаки, активізувати метаболічні процеси.

Електроліти складаються з катіонів та аніонів. Одно- і двовалентні катіони істотно не змінюють виживаність сперматозоїдів. Аніони чинять сильніший вплив, ніж катіони, причому дія аніонів залежить від валентності. Аніони хлоридів розпушують оболонку і руйнують ліпопротеїдний покрив. Аніони фосфатів, сульфатів, цитратів, навпаки, ущільнюють оболонку спрямовує і стабілізують електричний потенціал.

Більшість хімічних сполук для сперматозоїдів токсичні. З неорганічних речовин особливо отруйні солі і оксиди важких металів (ртуті, свинцю), оскільки вони блокують ферментні системи. Шкідливо діють на сперматозоїди оксиди цинку, алюмінію, заліза, міді, срібла; тому в практиці штучного осіменіння користуються скляними, пластмасовими, хромованими, нікельованими інструментами.

Пари летких органічних речовин (лізол, креолін, скипидар, формалін, нашатирний спирт, ефір, йодоформ, ксероформ) згубно діють на сперматозоїди навіть на відстані. Надзвичайно сильно діють детергенти (миючі засоби), кислоти - неорганічні (сірчана, соляна, азотна) і ряд органічних (оцтова, молочна, масляна), окисники (йод, хлор, перманганат калію, перекис водню).

4.2.5. Оцінка якості сперми

В практиці штучного осіменіння використовують два методи визначення запліднюючої здатності плідників – прямий та непрямий. Суть прямого методу (використовують при природному паруванні) полягає у тому, що одним самцем запліднюють групу самок, а потім підраховують кількість вагітних самок та вираховують процент заплідненості. При непрямому методі (використовують

тільки при штучному осіменінні) одразу визначають якісні показники сперми, які потім співставляють з розробленими нормативними. Потім, після проведеної оцінки сперми того чи іншого плідника, осіменяють цією спермою групу самок і підраховують процент заплідненості.

Всі методи оцінки показників сперми умовно ділять на три групи:

1. макроскопічна – об'єм, колір запах, консистенція та наявність сторонніх домішок;
2. мікроскопічна оцінка – густина, активність, концентрація, відсоток живих і мертвих, процент патологічних форм, живучість сперматозоїдів поза організмом;
3. мікробіологічна оцінка – загальна мікробіологічна контамінація, колі-титр, колі-індекс.

Дослідження сперми за об'ємом, кольором, запахом та консистенцією

Кожний одержаний еякулят негайно досліджують за кольором, запахом, консистенцією та об'ємом. Таку оцінку називають ще макроскопічною, органолептичною, окомірною або ветеринарно-санітарною. Це перший етап дослідження свіжо взятої сперми.

Колір, консистенцію, запах сперми, а також відсутність або наявність сторонніх домішок визначають в еякуляті, безпосередньо в спермоприймачі.

Присутність в спермі частинок фекалій, землі, бруду, підстилки тощо вказує про антисанітарні умови утримання плідників та не виконання правил взяття сперми. Не виливаючи одержаний еякулят із спермоприймача, встановлюють відсутність у спермі гною (жовті або бурі згустки), крові, сечі, згустків. Сперма жеребця має домішки слизистого секрету міхурцевидних залоз, а сперма кнура – клейкі, драглисті зерна секрету цибулинно-сечівникових залоз.

Колір сперми визначають оглядом її при доброму освітленні в спермоприймачі, вимірюванні об'єму, переливанні або фільтрації. Колір і консистенція сперми характерні для кожного виду тварин і залежить від насичення її сперміями. В нормі сперма барана однорідна, жовтувата, біла з жовтуватим відтінком або жовтувата - коричнева. У бугая сперма частіше біла, молочно – біла, білувата - жовтувата, менш густа з консистенцією, ніж сперма барана. Сперма жеребця і кнура сірувато - біла, світло - сіра, молочно кольору з сіруватим відтінком (нагадує колір молока, сильно розведеного водою) У птахів сперма молочно – біла з жовтуватим відтінком. Яскраво - червоний колір сперми вказує на домішки крові в результаті свіжих травм статевих органів, темно - червоного кольору набуває сперма при травмах давнього походження. Домішки сечі надають спермі інтенсивного жовтого кольору. Зеленоватий колір із гнильним запахом та білуватими пластівцями виникає при запаленні додаткових статевих залоз при враженні сім'яників.

Консистенцію сперми визначають при переливанні та фільтруванні сперми, а також коловими рухами вмісту в посудині, наданні спермоприймачу похилого положення. Вона залежить головним чином від насичення сперми сперміями. У барана нормальна сперма сметаноподібної консистенції, у бугая – нагадує консистенцію молока, у кнура і жеребця – нагадує консистенцію молока розведеного водою, вона водяниста (у кнурів – з домішками клейких драглистих

зерен, у жеребців – з домішками слизу), у птахів сперма вершкоподібної консистенції.

Запах сперми встановлюють рухом повітря рукою від ємності із спермою при відкритті кришки спермоприймача та після виливання сперми із спермоприймача. Сперма здорових плідників, як правило, не має специфічного запаху. Лише сперма барана може мати запах жиропоту, а сперма бугая – запах парного (свіжо видоєного) молока. Неприємний, гнильний запах сперми вказує на запальний процес статевих органів, запах аміаку – на забруднення сечею та невимитий препуцій у кнура.

Отже, сперма із сторонніми домішками, із зміненою консистенцією, запахом і кольором непридатна для використання. Її бракують, а плідника піддають всебічному клінічному і лабораторному дослідженню, проводять відповідне лікування і не допускають до отримання сперми до повного видужування. Про патологічні процеси в статевих органах можна судити за виявленням в спермі при її мікроскопії еритроцитів, трихомонад, а в зафарбованих мазках - мікробів.

Об'єм еякуляту визначають за поділками градуйованого спермоприймача, а якщо він не градуйований, то сперму переливають у градуйований змішувач сперми, циліндр, мензурку, спермоприймач або набирають у шприц для осіменіння самок сільськогосподарських тварин. Цей посуд попередньо миють, стерилізують і підігрівають до 30–35 °С. Об'єм можна визначити також шляхом доливання до сперми певної кількості розріджувача при температурі 30–35 °С. Розбавлену таким чином сперму обережно по стінці переливають у градуйований посуд і встановлюють загальний об'єм розріджувача і визначають об'єм еякуляту. Необхідно зауважити, що коли для визначення об'єму еякуляту до сперми доливають розбавник, потрібно попередньо провести дослідження свіж взятої, нерозбавленої сперми на густину і активність сперматозоїдів, а також взяти пробу сперми для визначення (встановлення) її концентрації та виживання. Відомо, що спермоприймачі для бугая і барана є градуйовані і об'єм одержаної сперми визначають без переливання в інший посуд. Вимірювальний посуд із спермою зразу ж закривають стерильною кришкою. Це забезпечує більш високу її стерильність. Об'єм еякуляту в одноразовому поліетиленовому спермоприймачі визначають зважуванням на точних лабораторних вагах, знаючи стандартну масу відокремленої частини спермоприймача. Маса 1 г сперми відповідає 1 мл.

Об'єми сперми жеребців і кнурів вимірюють після фільтрації густих секретів додаткових статевих залоз. Сперму, взятую від жеребця, фільтрують із спермоприймача через складену в четверо стерильну марлеву серветку в теплий (30–35 °С) стерильний мірний циліндр або мензурку і закривають скляною стерильною кришкою. Густий тягучий слизистий секрет міхурцевидних залоз, який залишається на марлі, враховують окремо і потім викидають. Об'єм еякуляту кнура в прозорих пластмасових спермоприймачах із фільтром, встановленим в його горловину, визначають за поділками на стінці спермоприймача. Якщо сперму від кнура беруть на вагіну без фільтру в спермоприймачі, то її переливають в теплу (30–35 °С) стерильну мірну мензурку,

фільтрують через в четверо складену стерильну марлю, на якій залишається желеподібний секрет або слизисті зерна (так звані сагові зерна) цибулинно-сечівникових залоз. Об'єм цього секрету визначають окремо і потім викидають. Він викликає аглютинацію спермій. Об'єм еякуляту в різних тварин не однаковий, залежить від ступеня розбавлення вмісту придатка сім'яника секретами додаткових статевих залоз. Барани, цапи, бугаї виділяють сперму малого об'єму, вимірюваного мілілітрами. Жеребці і кнурі виділяють еякуляти об'єму, вимірюваного десятками, сотнями мілілітрів. Об'єм еякуляту у барана становить 0,8–2 мл; у бугая – 3–5 мл, іноді 10 і більше (до 20 мл); у жеребця – 40–120 мл, іноді до 250 мл; у кнура – 250–500 мл і до 1,2 л, у птахів – 0,2–1,3 мл.

Таблиця 3. Показники візуальної оцінки якості сперми плідників с.-г. тварин та птахів

Вид тварин	Об'єм еякуляту		Колір	Запах	Консистенція
	в середньому	коливання			
Баран	0,8-2	0,5-3	Жовтуватий, білий з жовтуватим відтінком, жовтувато-коричневий	Без запаху або з запахом жиропоту	Однорідна, сметаноподібна
Бугай	3-5	1-15	Білий, молочно-білий, білувато-жовтуватий	Парного молока або без запаху	Вершкоподібна
Жеребець	40-120	20-250	Сірувато-білий, світло-сірий, молочного кольору з сіруватим відтінком	Без запаху	Водяниста з домішками клейких драглистих зерен
Кнур	250-500	100-1200	Сірувато-білий, світло-сірий, молочного кольору з сіруватим відтінком	Без запаху	Водяниста з домішками слизу
Півень		0,2-0,5	Молочно-білий, жовтуватий	Без запаху	Вершкоподібна
Індик		0,2-0,4	Молочно-білий, жовтуватий	Без запаху	Вершкоподібна
Гусак		0,1-0,3	Молочно-білий, жовтуватий	Без запаху	Вершкоподібна
Качур		0,2-0,3	Білий, молочно-білий	Без запаху	Вершкоподібна

При порушенні динаміки статевих рефлексів, режиму статевого використання, умов годівлі та утримання, захворюванні плідника, враженні

статевих органів може наступити зменшення об'єму еякуляту нижче мінімально допустимого рівня. Такий стан називають олігосперматизмом.

Якщо за зовнішніми ознаками свіжо отримана сперма не має відхилень від нормальних показників об'єму, кольору, запаху і консистенції, її в обов'язковому порядку на всіх станціях і пунктах штучного осіменіння с.-г. тварин її додатково перевіряють за густиною, активністю та консистенцією.

Мікроскопічна оцінка якості сперми за густиною та рухливістю

Окомірна оцінка сперми під мікроскопом за густиною і рухливістю – найпростіший спосіб оцінки її якості. Вона дещо суб'єктивна, але це найбільш простий і доступний із способів оцінки якості сперми. Щоб не допустити помилок при оцінці потрібні: тренування очей, знання і вміння роботи з мікроскопом та виконання певних вимог роботи із спермою.

Перед роботою предметні та накривні скельця миють теплим 2–3 % розчином натрію бікарбонату, споліскують чистою теплою водою і після 15–20 хв. кип'ятіння насухо витирають стерильними марлевими серветками. Перед дослідженням сперми у мікроскопі протирають чистою серветкою дзеркало, скельця окуляра та об'єктива, не розбираючи їх.

Відомо, що сперма, особливо свіжо одержана, дуже чутлива до змін температури. Її охолодження знижує активність сперміїв і навіть може привести до загибелі (наступає температурний шок). Тому дослідження сперми проводять у лабораторії, де температура приміщення не знижується нижче 18–20 °С. Рухливість сперміїв у повній мірі проявляється при температурі 36–40 °С і тому для оцінки сперми за показником рухливості статевих клітин оцінюють на електричному нагрівальному столику з автоматичним регулюванням температури (столик Пакенаса).

Коловими рухами або легенькими коливаннями спермоприймача чи флакончика зі спермою обережно розмішують сперму, а потім стерильною скляною паличкою або Пастерівською піпеткою наносять краплину сперми середніх розмірів на підігріте до 38–40 °С стерильне і сухе предметне скло ближче до одного краю і обережно накривають чистим, сухим і підігрітим накривним склом так, щоб не було порожнини і бульбашок повітря. Краплину сперми потрібно брати завжди одного (середнього) об'єму з таким розрахунком, щоб вона рівномірно заповнила увесь простір під накривним скельцем і не витікала за його краї.

При оцінці сперми, розбавленої жовтковим або молочним розріджувачем, беруть крапельку сперми не середніх, а малих розмірів, щоб вона мала під накривним склом найменшу товщину. Тоді краще видно спермії між кульками жовтка або молочного жиру. Другу та наступні краплини сперми наносять на предметне скло в ряд, відступаючи одна від одної на ширину покривного скла. Предметне скло з роздавленою краплиною сперми кладуть на предметний столик мікроскопу (або на поверхню нагрівального столика, встановленого на предметний столик мікроскопу) під об'єктив 8× або 20× і дивлячись в окуляр дуже повільно піднімають тубус за допомогою макрогвинта до появи зображення в полі зору. Повертаючи мікрогвинт в ту чи іншу сторону, добиваються більшої чіткості зображення. Слід зауважити, що при яскравому

освітлені не пофарбовані, напівпрозорі спермії погано видно. А тому розглядати краплину сперми слід при розсіяному освітленні, у дещо затемненому полі зору. Для цього трохи звужують діафрагму, опускають конденсор або повертають дзеркало. Після знаходження сперміїв в полі зору мікроскопу при малому збільшенні переходять до дослідження роздавленої краплини при середньому збільшенні мікроскопу, встановивши об'єктив 40× і окуляр 10× або 15×.

Після встановлення доброго освітлення і чіткого зображення сперміїв визначають одночасно густину і рухливість сперміїв в одній і тій же краплині і не в одному, а в не менше 3-х, полях зору роздавленої краплини сперми, пересуваючи предметне скло під об'єктивом мікроскопу. Вся окомірна оцінка сперми при доброму вмінні роботи з мікроскопом і тренуванні очей займає близько 1–2 хвилини. Слід пам'ятати, що після дослідження одної краплини сперми правильно наведений мікроскоп залишають в тому ж положенні і не піднімають тубус, а тільки пересувають предметне скло або його знімають, замінюючи іншим.

Густина – ступінь насичення сперми сперміями, залежить від концентрації сперміїв і ступеню розбавлення їх секретами придаткових статевих залоз. За густиною оцінюють лише свіжо взяту, не розбавлену сперму.

За густиною не розріджена сперма може мати такі оцінки:

- густа (скорочено позначається літерою Г) – все поле зору мікроскопа суцільно заповнене сперміями і між ними не видно проміжків або є незначні проміжки між ними. У ній важко визначити рух окремих сперміїв. У густій спермі міститься понад 1 млрд. сперміїв в 1 мл;

- середня (С) – в полі зору мікроскопу між сперміями добре помітні проміжки, але їх розміри менше довжини сперміїв або приблизно на довжину одного спермія. Добре помітно рух окремих сперміїв. У спермі середньої густини міститься від 400 млн. до 1 млрд. сперміїв в 1 мл;

- рідка (Р) – в полі зору мікроскопу спермії розкидані, проміжки між ними більші довжини одного спермія. В 1 мл такої сперми міститься менше 400 млн. сперміїв.

Таблиця 4. Залежність густини сперми від концентрації сперматозоїдів

Плідник	Густина сперми, млрд/мл		
	Густа	Середня	Рідка
Бугай	>1,0	0,5–1,0	<0,5
Баран	>2,0	1,0–2,0	<1,0
Кнур	0,20	0,10–0,20	<0,10
Жеребець	0,25	0,15–0,25	<0,15

Слід пам'ятати, що сперма різних плідників значно відрізняється за густиною. Так барани в нормі виділяють тільки густу сперму, бугаї – густу і середню, а жеребці та кнури – частіше рідку та середню. Для використання допускається сперма бугая, жеребця, кнура і птахів з оцінкою “густа і середня”, а сперма барана – тільки “густа”. Одночасно з оцінкою сперми за густиною визначають і рухливість спермій як свіжо отриманої, так і розбавленої розріджувачами сперми. Якщо у хорошій за густиною спермі спермії мають погану активність, то така сперма непридатна для розбавлення та осіменіння.

Визначення рухливості (активності) спермій у спермі

При дослідженні сперми під мікроскопом в полі зору можуть зустрічатися сперматозоїди з різними видами руху, головним чином з трьома: прямолінійно-поступальним, манежним і коливальним.

Нормальні, повноцінні спермії рухаються вперед по прямій лінії, переміщуються в напрямку повздовжньої осі спермія, це прямолінійно-поступальний рух. Спермії з таким видом руху здатні в статевих органах самок рухатися на зустріч яйцеклітинам та приймати участь у їх заплідненні. Чим більше спермій з прямолінійно-поступальним рухом, тим вища запліднюваність самок.

Коловий (манежний) рух – сперматозоїди рухаються навколо своєї голівки, або за колом, радіус якого приблизно дорівнює довжині спермія, у напрямку або проти руху годинникової стрілки. Такий рух є ненормальним, він свідчить про ослаблення, неповноцінність сперматозоїдів. У риб коловий рух спермій є нормальним, він забезпечує зустріч спермій з яйцеклітинами у воді.

Коливальний рух – спермії здригаються, коливаються на одному місці, вигинаються, проводять слабкі рухи хвостом, голівкою, переміщуються поштовхами з одного боку в інший, але не рухаються поступально. Коливальний рух – ознака неповноцінності або швидкої загибелі спермій. Однак коливальні рухи можуть бути і у нормальних спермій при охолодженні сперми, порушенні умов зберігання сперми, нагромадженні в ній молочної або вугільної кислот тощо. Такі сперми можуть відновлювати прямолінійний поступальний рух при підігріванні або підлюговуванні середовища. Отже оцінку рухливості сперми слід проводити тільки при температурі 38–40 °С.

Встановлено, що всі спермії несуть одноіменний, від'ємний електричний заряд. У спермі високої якості однойменно заряджені статеві клітини відштовхуються одна від одної, не відбувається злипання і зіткнення спермій. При підвищеній кислотності сперми, наявності іонів деяких металів, імунізації організму чужорідним білком, запальних процесах в статевих органах чи впливу інших несприятливих факторів відбувається нейтралізація негативного заряду спермій і вони аглютинують (склеюються між собою). Аглютинація свідчить про погану якість сперми.

У деяких густих еякулятах спермії під час еякуляції не встигають повністю вийти із стану анабіозу, проявляючи при цьому слабку рухливість. Таку сперму необхідно перевірити після додавання до неї 2,9 % розчину натрію лимоннокислого, підігрітого до 38–40 °С. Для цього на предметне скло наносять

дві краплини розчину і краплину сперми, накривають накривним склом і оцінюють якість у кількох полях зору при температурі 38–40 °С. При дослідженні спермій на рухливість даний показник визначають візуально оцінюють який відсоток спермій у полі зору мікроскопу мають нормальний прямолінійний рух.

Спермії з манежним і коливальним рухом умовно вважають мертвими і при оцінці за бальною системою не враховуються. Якщо всі спермії нерухливі, ставлять оцінку Н (некроспермія - нерухливість), манежний (коловий) рух спермій позначають літерою М, коливальний - літерою К.

Рухливість спермій оцінюють в балах, за десятибальною шкалою. Вищу оцінку 10 балів одержує сперма, в якій практично всі 100 % спермій рухаються прямолінійно-поступально. Однак такої сперми практично не буває, оскільки в кожному еякуляті є спермії різного віку, ступеня зрілості, збудливості і рухливості. Тому високою оцінкою активності вважають 9 балів, тобто якщо 9 спермій з 10 мають прямолінійно-поступальний рух. При 80 % спермій з прямолінійно-поступальним рухом ставлять 8 балів, при 70 % – 7 і т. д.

У науковій літературі часто виражають рухливість спермій безпосередньо у відсотках спермій, що мають прямолінійний поступальний рух, і пишуть, наприклад, замість бала 9 – 90, замість 3 – 30 і т. д. Знак відсотка при цьому не пишуть. Слід зазначити, що у густій свіжоодрержаній спермі барана і бугая буває важко визначити, який відсоток спермій має той чи інший вид руху. Тоді ставлять бал за такими ознаками: якщо у спермі спостерігається бурхливий вихреподібний рух, ставлять вищий бал 10, при дещо сповільненому вихреподібному русі ставлять 9. Завихрення в спермі створюється при зіткненні струмин (потоків) спермій, що мають однойменні електричні заряди і рухаються прямолінійно та енергійно. Завихрення, що утворилося, відразу ж зникає, ніби розсмоктується. Може бути скупчення окремих ослаблених або ж не рухливих спермій. Ці скупчення плавають у вигляді темних острівців, які не зникають, і наявність їх знижує бал оцінки. Початківцям, новачкам рекомендують проводити визначення активності сперматозоїдів в балах не у всьому полі зору мікроскопу, а по секторах, окремих ділянках поля зору. При цьому одночасно враховують і записують в чисельник число підрахованих спермій, а в знаменник – тільки з прямолінійно-поступальним рухом. Потім одержані дані складають і вираховують відсоток спермій з прямолінійно-поступальним рухом. Оцінку сперми за густиною і рухливістю проводять в декількох (не менше трьох) полях зору мікроскопу і потім виводять середній показник. На деяких підприємствах використовують мікроскопи з телекамерою, яка дає змогу спостерігати рухливість спермій на екрані телевізора, що полегшує оцінку якості сперми.

Для розрідження та зберігання використовують сперму барана та бугая з оцінкою не нижче Г-8, кнура Г і С не нижче 7 балів, жеребця – Г і С не нижче 5 балів. В журналі обліку якості одержаної сперми ставлять оцінку густини і рухливості кожного еякуляту окремо, позначаючи літерами густину, а цифрами рухливість (наприклад, Г-8, С-9, С-7, і т.д.). При оцінці розрідженої сперми в журнал записують результати лише активності спермій.

Після закінчення роботи всі частини мікроскопу протирають чистою серветкою і накривають марлевою серветкою чи ковпаком з поліетиленової плівки або ж ставлять у спеціальний футляр для мікроскопу.

Розбавлену і охолоджену (заморожену) сперму оцінюють на рухливість після розморожування за спеціальною методикою.

Головним недоліком цього методу є суб'єктивність, необхідність мати досвід при визначенні якості сперми під мікроскопом.

Мікроскопічна оцінка сперми. Показники цієї оцінки визначають за допомогою мікроскопа. Концентрація підраховується у лічильній камері. При цьому сперму розріджують у співвідношенні 1:20–1:100 у 0,9 % розчину хлориду натрію з парою крапель 38 % формаліну.

Таблиця 5. Основні показники якості сперми самців різних видів тварин

Вид самця	Об'єм еякуляту, мл	Концентрація сперматозоїдів у 1 мл, млрд.	Загальна кількість сперматозоїдів у еякуляті, млрд.
Бугай	4–5	1,0–1,4	4–10
Баран	1–2	2,0–4,0	2–10
Кнур	150–300	0,1–0,2	20–80
Жеребець	50–120	0,1–0,2	6–15

Вади сперми:

Асперматизм – повна відсутність еякуляту при отриманні сперми.

Олігосперматизм – зменшення об'єму еякуляту.

Аспермія – відсутність у еякуляті сперматозоїдів.

Олігоспермія – зменшення кількості сперматозоїдів у еякуляті.

Тератоспермія – збільшений вміст патологічних сперматозоїдів.

Некроспермія – в одержаному еякуляті всі сперматозоїди мертві.

Визначення рівня рН практично не дає ніякої суттєвої інформації про якість сперми, тому що рН, особливо в кінцевій фазі, може бути дуже різним.

Активність сперми. Під активністю розуміють відсоткове співвідношення сперматозоїдів, які рухаються прямолінійно поступально до сперматозоїдів з маневрними, коливальними рухами чи мертвих. Визначають цей показник у балах. Оцінку рухомості проводять, по можливості, зразу ж після отримання проби. Для цього невелика крапля сперми наноситься на предметне скельце, накривається покривним і зразу ж під мікроскопом при 100-400 кратному збільшенні оцінюється відсоткова кількість рухомих сперматозоїдів в тонкому прошарку. Більша частина сперматозоїдів повинна рухатися прямолінійно-поступально. Для зберігання і використання допускається свіжо-отримана сперма з показником активності не нижче 8 балів. При морфологічній оцінці при 200-800 кратному збільшенні слід звертати увагу на єдність форми

сперматозоїдів і оцінювати кількість аномальних сперматозоїдів. В критичних випадках слід відправити тонкі висушені на повітрі мазки для спеціальних досліджень.

Таблиця 6. Нормальні показники еякуляту псів

Фракції	Об'єм в мл	Колір	Щільність (сперматозоїдів /мкл)	pH	Актив- ність,%	Патоло- гічні форми, %
Попередня (перша)	0,2–0,3	Прозорий іноді ледь жовтуватий	Відсутні або поодинокі	6,0–6,4		
Основна (друга)	0,5–4,0	Білий (від мутно-білого до молочного)	$2-5 \times 10^5$ ($1-15 \times 10^5$)	6,0–6,8	70–90	20
Кінцева (третя)	2–30	Ледь мутний або прозорий	Поодинокі або відсутні	6,6–7,4		

Мікробіологічна характеристика сперми. В спермі самців визначають такі показники: загальна мікробна контамінація – кількість мікробних клітин в 1 мл свіжо-отриманої сперми. За цими показниками виділяють 5 ступенів чистоти сперми:

1. стерильна – не містить мікробів;
 2. незначно забруднена – до 1000 мікробів;
 3. слабо забруднена – до 2000 мікробів;
 4. середньо забруднена – до 5000 мікробів;
 5. сильно забруднена – понад 5000 мікробів.
- З ветеринарно-санітарних вимог до використання допускається свіжо-отримана сперма самців 1-4 ступенів чистоти.

4.3. ПОПЕРЕДНІЙ ВІДБІР СПЕРМАТОЗОЇДІВ ЗА СТАТТЮ

За останні кілька років, методи відбору сперматозоїдів за статтю пройшли шлях від лабораторних випробувань до промислового використання у розведенні великої рогатої худоби. Для дослідження зміни співвідношення статей для телят було використано ряд методів, але ідея сортування або вибору сперми набуло найбільшого розвитку з моменту появи штучного осіменіння.

Генетичний механізм визначення статі забезпечує розподіл нащадків за статтю у співвідношенні 1:1. Популяція гамет самця має гетерогенність (XY), а

самки – гомогенність (XX). На підставі цього розроблені методи розділення сперми самців на гамети, що містять X- і Y-хромосоми і, таким чином, з'являлась можливість штучно регулювати співвідношення статі у сільськогосподарських тварин. У цьому разі запліднення яйцеклітин сперматозоїдами з X-хромосомами (X-несуча сперма) викликає появу самок, а сперматозоїдами з Y-хромосомами (Y-несуча сперма) – самців.

Диморфізм сперматозоїдів самців, що містять різні статеві хромосоми, полягає в тому, що сперматозоїди з Y-хромосомами мають меншу масу і величину. У ссавців розміри X-хромосоми звичайно більші порівняно з розмірами Y-хромосоми. Так, середній розмір X-хромосоми великої рогатої худоби складає 6,17 мкм, а у Y-хромосоми – 2,22 мкм. На підставі цього було розроблено різні методи: центрифугування, седиментації (осадження), електрофорезу, фільтрації, цитофлуорометрії, імунологічні та ін.

Центрифугування і седиментація. Перша спроба регулювання статі за допомогою центрифугування була зроблена ще у 1925 році, але експеримент не дав позитивних результатів. У 1976 році було проведено центрифугування сперми кроля з використанням градієнта густини у глюкозо-жовточно-цитратному середовищі із додаванням 12 % лактози. Час центрифугування складав 15 хвилин, при 1000 об/хв. за температури 20°C. У результаті осіменіння кролиць спермою з верхньої фракції було отримано 58,6 % самців, а з нижньої – 40,1 %. Повторне центрифугування сперми не привело до розширення зрушення щодо статі у нащадків. Виходячи з припущення, що сперматозоїди з X-хромосомою через свою більшу масу, будуть швидше осаджуватися, ніж сперматозоїди з Y-хромосомою, було використано метод седиментації. Осіменіння кролиць спермою з верхньої фракції привело до народження високої долі самців (27:7), а з нижньої фракції – самок (27:11). Однак, сперматозоїди бугая цим методом поділити не вдалося.

Проводилася седиментація сперми бугая за допомогою градієнта щільності у середовищі, що складалося зі знежиреного молока і яєчного жовтка. Процес розділення сперматозоїдів закінчувався через 1–3 години. Запліднення спермою з нижніх фракцій викликало народження 70 % телиць, а з верхньої фракції – 63,9 %. Однак, середовище з знежиреного молока і яєчного жовтка не вдалося чітко стандартизувати, тому метод виявився ненадійним і не знайшов використання на практиці. Суперечливість результатів експериментів щодо регулювання співвідношення статі у нащадків, заснованих на розділенні сперматозоїдів за їх масою, пояснюється тим, що маса сперматозоїдів характеризується значною варіабельністю і не має достатньо вірогідного зв'язку з X- і Y-хромосомами. Здебільшого сперматозоїди з Y-хромосомою були легші, ніж сперматозоїди з X-хромосомою всього на 2–4 %.

Метод фільтрації. В основу методу покладена різна рухливість сперматозоїдів з різними статевими хромосомами. Так, більш легкі сперматозоїди з Y-хромосомою володіють більшою рухливістю і швидше проходять через в'язкий шар бичачого сироваткового альбуміну (БСА). Була використана вертикальна колонка з трьома шарами, причому концентрація альбуміну збільшувалася зверху вниз. За допомогою забарвлення сперматозоїдів

акрихіном було встановлено, що нижня фракція містить до 85 % сперматозоїдів в із статевої Y-хромосою. Біологічної перевірки методу на самках зроблено не було. Подальші перевірки цього методу мали суперечливі результати. Використання зазначеного методу в 1975 році дало можливість отримати 58,6 % бугаїв з 158 телят (в результаті штучного запліднення корів сперматозоїдами з статевої Y-хромосою).

Електрофорез. Уперше припущення щодо різної поведінки сперматозоїдів у магнітному полі зробив біолог М. К Кольцов у 1930 році. Було встановлено, що сперматозоїди кролів з X-хромосомами в процесі електрофорезу спрямовуються до аноду, сперматозоїди з Y-хромосою – до катоду. У 60-х роках ця гіпотеза була підтверджена отриманням надлишку самок у нащадків кролів після штучного осіменіння анодними сперматозоїдів і самців після штучного осіменіння катодними сперматозоїдів. Однак, розділення сперми бугаїв на фракції за допомогою електрофорезу не дало позитивного результату і різниця між нащадками різних статей, отриманих за запліднення корів різними фракціями сперми, виявилася статистично невірогідною.

Як видно, було кілька спроб розробити метод, який буде ефективно розділяти сперму на фракції, що містять більшу концентрації X- чи Y-несучої сперми. На даний час лише один спосіб виявився комерційно життєздатним – це проточна цитометрія.

Проточна цитометрія. Даний тип сортування сперми за статтю був вперше досліджений в 1980-х роках. Але при використанні свіжої сперми після розділення відмічали низький рівень запліднення. Проте, робота науковців в лабораторних і польових умовах дозволила поліпшити результати, і вже в 1999 році отримали перше потомство телят з використанням замороженої сексованої сперми. Зрештою, сперма розділена за статтю стала комерційно доступною у великих масштабах у США в 2004 році.

Недоліками проточної цитометрії є його складність та повільні темпи розділення. Даний метод заснований на тому, що X-несуча сперма містить на 3,4 % – у кнурів, 3,8 % – у бугаїв, 4,2% – у баранів, більше ДНК ніж Y-несуча. Перед сортуванням сперматозоїди забарвлюють флюороорисцентним барвником,

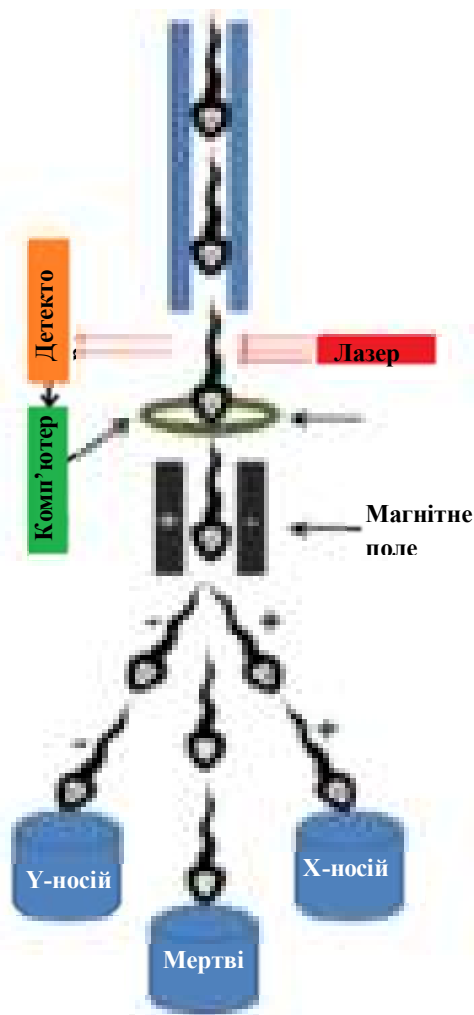


Рис. 29. Схема проведення проточної цитометрії

а потім пропускають через потік цитометру у вигляді крапель рідини, що містять один сперматозоїд у краплі.

Через різницю в кількості ДНК, Х-несуча сперма світиться яскравіше, ніж У-несуча сперма при впливі світла. Це дозволяє лазеру цитометра і детектору визначити стать сперматозоїда на основі кількості світла який він випромінює. Потім наноситься позитивний або негативний зарядна краплі, що містять сперматозоїди. Позитивно заряджені краплі відхиляються в одну сторону, негативно заряджені – в іншу, а незаряджені краплі проходять прямо. У незаряджених краплях може міститись сперма з подвійним набором хромосом, з пошкодженим генетичним матеріалом, або клітини, що не біли направлені у жодному із напрямків.

Клітини сперми проходять через машину зі швидкістю близько 60миль на годину. Це здається швидко, але, з огляду на те, що вона проходить в один прийом, а один еякулят може містити більше 7 мільярдів сперматозоїдів, то розділення сперматозоїдів за статтю займає в 3–4 рази більше часу ніж звичайна обробка сперми. Таким чином даний метод обробки сперми дає меншу кількість сперматозоїдів у соломинці при підвищенні вартості однієї спермодози.

4.4. АНАЛІЗ ФРАГМЕНТАЦІЇ ДНК СПЕРМАТОЗОЇДІВ МЕТОДОМ «HALOMAX»

Однією з можливих причин порушення фертильності у самців – фрагментація ДНК сперматозоїдів. Це розподіл на фрагменти ланцюга ДНК, що знаходиться у ядрі сперматозоїда, яка виконує його основну роль – передача генетичного матеріалу наступному поколінню. Фрагментація ДНК сперматозоїдів вважається однією із причин безпліддя. Сперматозоїди навіть з значним пошкодженням ДНК можуть зберігати здатність до запліднення, проте у подальшому в ембріональному розвитку плода можуть бути виявлені порушення, що зазвичай призводить до переривання вагітності.

На даний час розроблені ряд лабораторних методів, що дозволяють оцінити рівень фрагментації ДНК сперматозоїдів. Вони досить трудомісткі і економічно затратні, до того ж велика їх частина потребує додаткового обладнання. Одним з найбільш спецефічних і чутливих методів є метод з використанням тест-системи «HALOMAX», який дозволяє доволі швидко і якісно виконати оцінку ступеню фрагментації ДНК сперматозоїдів у зразку. Дану тест-систему використовують при ранньому відборі племінних самців, оскільки фрагментація ДНК сперми прогнозує репродуктивну здатність тварини, а також для контролю фертильності племінного самця, оскільки фрагментація ДНК сперми чутлива до зовнішніх факторів, які можуть впливати на якість сперми, включаючи щеплення, інфекції або патології, такі як варикоцеле. Нарешті, Halomax використовують як контроль якості, оскільки фрагментація ДНК сперматозоїдів чутлива до ятрогенного пошкодження, спричиненого розріджувачами сперми, кріопротекторами, процесами заморожування та охолодження та будь-яким іншим маніпуляціям, таким як процедури сексування-сперми. Варто відмітити, що Halomax є специфічним для кожного виду тварин: бика, пса, жеребця, осла, миші, кнура та барана.



Дослід 1. ОЦІНКА ЯКОСТІ СПЕРМИ МЕТОДОМ «HALOMAX»

Мета роботи: провести аналіз ступеню фрагментації сперматозоїдів пса.

Обладнання та матеріали: сперма пса, фосфатно-буферний розчин, мікроскоп, водяна баня, автоматична піпетка, «HALOMAX»: агарозний гель, скельця з спеціальним покриттям, денатураційний засіб розчин 1 (DA), розчин для лізису розчин 2 (LS), розчин еозину 3 (SSA), розчин тіазину 4 (SSB), поплавки, CO₂-інкубатор, холодильник.

Хід роботи.

1. Помістіть пробірку з агарозою у поплавки і розплавте за допомогою водяної бані при 95–100 С° протягом 5 хвилин або до повного розплавлення.

2. Розлийте у 10 епіндорфів по 100 мікролітрів. Перед використанням витримайте епіндорф при 37°С протягом 5 хвилин для запобігання геліфікації. Епіндорфи, які не використовуватимуться зберігайте в холодильнику разом з комплектом.

3. Розчин 1 та 2 комплекту тримають при кімнатній температурі (22 С°) протягом усього процесу.

4. Підготуйте скельця з спеціальним покриттям, які будуть використовуватися.

5. Розбавте зразок сперми фосфатно-буферним розчином до максимум 20 мільйон сперми на мілілітр.

6. Відразу після цього перенесіть 50 мкл проби сперми в епіндорф з агарозою і обережно перемішайте автоматичною піпеткою. Не допускається утворення бульбашок.

7. Після цього на центр лунки зразка ("S") помістіть краплю 8 мкл суспензії клітин. Покрити покривним склом. Акуратно натисніть, уникаючи утворення бульбашок повітря. Скельце потрібно тримати в горизонтальному положенні протягом усього процесу. Використовуйте лунку "C" для контролю.

8. Помістіть скельце на холодну поверхню (наприклад, металеву або скляну тарілку, попередньо охоложену до 4 С°) і перенесіть в холодильник t=4 С° на 5 хвилин для затвердіння агарози.

9. Вийміть скельце з холодильника і обережно зсуньте покривне скельце. Всі процедури потрібно проводити при кімнатній температурі (22 С°).

10. Помістіть скельце горизонтально на підвищенні, в чашку Петрі. Нанесіть на лунку розчин 1 (DA), переконавшись, що вона повністю покрита реактивом протягом всього процесу. Витримайте протягом 7 хвилин. Потім злийте реактив, нахилиючи і поверніть у горизонтальне положення.

11. Дуже важливо злити реактив без струшування. Виконайте видалення реактиву дозволяючи йому стекти.

12. Нанесіть на лунку розчин 2 (LS), переконавшись, що вона повністю покрита реактивом протягом 20 хвилин. Потім злийте реактив, нахилиючи і поверніть у горизонтальне положення. Скельце не струшують.

13. Промийте предметне скло протягом 5 хв, покривши рясною дистильованою водою використовуючи Пастерівську піпетку. Потім видаліть реактив, нахиливши. Поверніть у горизонтальне положення. Зневодніть,

залити 70% етанолом, витримайте 2 хвилини. Злийте реактив та нанесіть 100 % етанол на 2 хвилини. Злийте і дайте горизонтально просохнути на фільтрувальному папері

14. Після висихання скельця можна зберігати при кімнатній температурі в сухому і темному місці кілька місяців.

15. Помістіть скельце горизонтально на підвищенні в чашку Петрі. Нанесіть розчин 3 (SSA) на лунку, переконайтеся, що вони повністю покриті, витримайте протягом 7 хвилин. Потім видаліть фарбу, нахиливши скельце. Поверніть у горизонтальне положення.

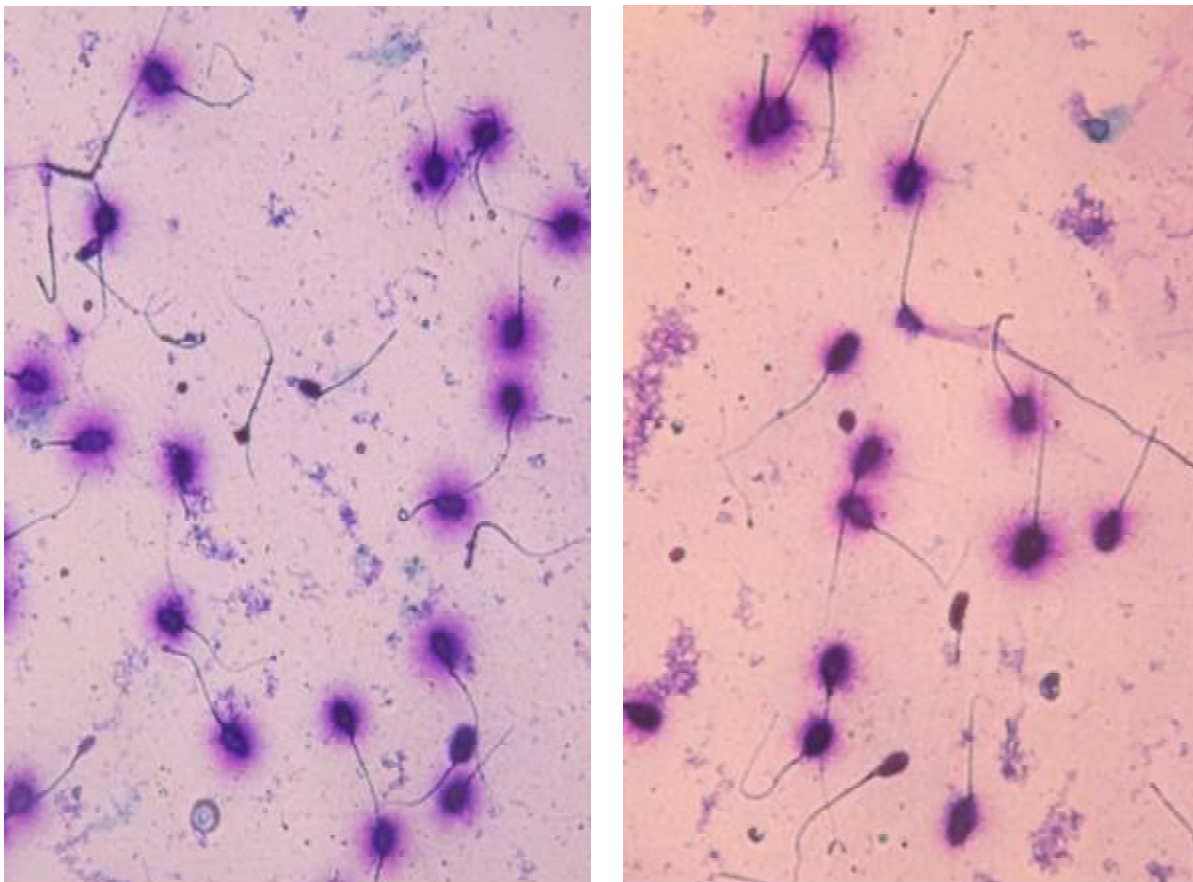


Рис. 30. Зразки сперми оброблені методом «HALOMAX»

16. Нанесіть на скельце розчин 4 (SSB), переконайтеся, що вони повністю покриті, витримайте протягом 7 хвилин. Потім видаліть фарбу, нахиливши скельце. Дайте висохнути при кімнатній температурі.

17. Обчисліть відсоток сперми з фрагментованою ДНК.

Оцінку сперматозоїдів проводять за наступними критеріями:

Сперматозоїди без фрагментації ДНК:

- сперматозоїди з великим ореолом: ті, ширина ореолу яких аналогічна або перевищує діаметр головки;
- сперматозоїди з ореолом середнього розміру: їх розмір ореолу знаходиться між великим і дуже маленьким ореолом.

"інші": ядра, які не відповідають сперматозоїдам. Одна з морфологічних характеристик що їх відрізняє - відсутність хвоста. Ці клітини не повинні включатися в оцінку.

Сперматозоїди з фрагментованою ДНК:

- сперматозоїди з малим ореолом: ширина ореолу аналогічна або менша на 1/3 діаметра головки;
- сперматозоїди без ореолу;
- сперматозоїди без ореолу та деградації: ті, які не мають ореолу та мають головку, що не повністю або слабо профарбовані.

4.5. ЗНАЧЕННЯ ТЕСТУ НА ГІПООСМОТИЧНИЙ НАБРЯК СПЕРМАТОЗОЇДІВ

Оцінка функціонального стану мембрани сперми є важливим маркером для запліднювальної здатності сперматозоїдів. Тест на гіпоосмотичний набряк (HOST) – один з найкращих методів оцінки цілісності мембрани сперми. Аналіз заснований на тому, що транспорт рідини відбувається через інтактну (неушкоджену) клітинну (живі клітини) в гіпоосмотичних умовах до досягнення рівноваги. Намагаючись досягти рівноваги між внутрішньоклітинним і позаклітинним просторами, функціонально неушкоджені оболонки починають набрякати, починаючи з хвоста сперматозоїдів. Такі сперматозоїди позначаються як набряклі або HOST-реактивні (HOST+), що означає функціонально неушкоджені мембрани, але сперматозоїди з дефектною мембраною не набрякають і хвости їх не згинаються, тому здаються нормальними. Вода потрапляє лише в область хвоста і створює різні види завитків. Поява завитка у хвості сперми в цьому тесті – ознака того, що вода транспортувалася та чинила опір плазматичній мембрані, і це вказує на те, що джгутикова мембрана є неушкодженою. Оцінка стану мембрани сперми є важливою, оскільки необхідна неушкоджена та функціонально активна мембрана для метаболізму, ємності, реакції акросоми, прикріплення та проникнення в ооцит. Таким чином, оцінка стану мембрани сперматозоїдів виявляється вагомим маркером для запліднювальної здатності сперматозоїдів. Тому використання цього недорогого і простого аналізу рекомендовано як додатковий показник запліднювальності.



Дослід 2. ДОСЛІДЖЕННЯ СПЕРМАТОЗОЇДІВ БИКА ТЕСТОМ НА ГІПООСМОТИЧНИЙ НАБРЯК

Мета роботи: дослідити функціональний стан мембрани тестом на гіпоосмотичний набряк

Обладнання та матеріали: сперма бика, автоматична піпетка, Пастерівські піпетки, водяна баня, покривні скельця, предметні скельця, гіпоосмотичний розчин, мікроскоп, камера Горяєва, CO₂-інкубатор, секундомір.

Хід роботи.

1. Сперму відбирають у плідника на 2–7 добу утримання. Еякулят розріджують і розпіпетовують, в ідеалі дослідження мають бути виконані

протягом 30–60 хв. після садки.

2. У випадку дослідження кріоконсервованої сперми її розморожують безпосередньо перед дослідженням при температурі 37 °С.

3. Досліджуваний зразок має містити 8–10 млн сперматозоїдів у 1 мл. У випадку невідповідності зразка вказаним параметрам його необхідно розбавити фосфатно-буферним розчином або сконцентрувати шляхом центрифугування.

4. Реагенти перед використанням нагріти до кімнатної температури.

5. Ідентифікувати наявні зразки.

6. Інкубувати гіпоосмотичний розчин при температурі 37 °С протягом 5-10 хвилин.

7. До гіпоосмотичного розчину, що інкубувався, додати 0,1 мл та розпіпетувати.

8. Інкубувати отриманий розчин протягом 30 хвилин (максимум 2 години) при 37 °С.

9. Після інкубування акуратно розпіпетувати розчин і 10–15 мкл перенести на предметне скло та покрити покривним.

10. Необхідно уникати утворення пухирців повітря.

11. Зразок досліджувати під мікроскопом при збільшенні у 40 разів. Провести оцінку не менш ніж 200 сперматозоїдів оцінюючи хвостик закручений (набряк) і прямий (відсутність набряку).

Зазвичай спостерігаються наступні типи набряку хвостика:

- набряк кінчика – спостерігається набряк лише кінчика хвостика сперматозоїда;

- набряк шийки – набряк хвостика спостерігається у місці переходу хвостика у шийку, у таких сперматозоїдів відмічають як наявність так і відсутність набряку;

- укорочений та потовщений хвостик

- частково чи повна петля на хвостіку сперматозоїда, так званий хвостик «повітряна кулька» як наслідок набряку.

На відміну від аналізів з використання барвників, тест на гіпоосмотичний набряк не вбиває сперматозоїди, завдяки чому даний аналіз можна проводити безпосередньо перед ICSI, а не набряклі



Рис. 31. Зразки сперми при оцінці тесту на гіпоосмотичний набряк (стрілкою вказано

сперматозоїди можна використовувати для осіменіння.

4.6. ВИЗНАЧЕННЯ СПІВВІДНОШЕННЯ ВІДСОТКУ НОРМАЛЬНИХ ТА ПАТОЛОГІЧНИХ ФОРМ СПЕРМАТОЗОЇДІВ

У кожному еякуляті серед нормальних спермій є патологічні. Кількість їх змінюється при запальних процесах у сім'яниках, загальних захворюваннях організму, порушенні режиму догляду і використання плідників тощо. Відсоток патологічних форм спермій визначають у спермі кожного здорового плідника щоквартально, тобто 3–4 рази на рік, а також у випадках різкого і стійкого погіршення якості сперми. Конкретними причинами утворення патологічних форм спермій можуть бути:

- недостатньо розвинені сім'яники;
- захворювання сім'яника та придатка (гігантські та карликові спермії); значні проміжки часу між коїтусами, які обумовлюють старіння та руйнування спермій у придатку;
- статеве виснаження плідника внаслідок надмірного статевого використання або недостатньої годівлі (спермії з цитоплазматичними крапельками – незрілі спермії). Чим ближче до голівки розташована крапелька, тим молодший спермій.

Розрізняють патологію голівки (гігантська, карликова, асиметрична, кругла, подвійна, без хвоста тощо), шийки (подвійна, зігнута, потовщена тощо), тіла (зігнуте, подвоєне, скручене, ниткоподібне, з цитоплазматичною крапелькою тощо) і хвостика спермія (короткий, зігнутий, подвійний, скручений тощо).

Велика кількість патологічних форм спермій свідчить про порушення спермогенезу, шкідливий вплив патологічно змінених секретів придаткових статевих залоз і сечових шляхів або вказує на порушення правил отримання сперми і її зберігання в зовнішньому середовищі. Високий відсоток патологічних форм спермій може бути причиною неплідності. Наявність у спермі значної кількості патологічних форм спермій називається тератоспермією.



Дослід 3. ВИЗНАЧЕННЯ СПІВВІДНОШЕННЯ ВІДСОТКУ НОРМАЛЬНИХ ТА ПАТОЛОГІЧНИХ ФОРМ СПЕРМАТОЗОЇДІВ

Мета роботи: навчитися визначати співвідношення відсотка нормальних та патологічних форм сперматозоїдів.

Обладнання та матеріали: свіжоотримана сперма, центрифужні пробірки, фізіологічний розчин, знежирині предметні скельця, біокулярна лупа, Пастерівська піпетка, фільтрувальний папір, 1 % розчин метиленового синього чи фуксину, 96 % спирт.

Хід роботи.

1. Для зручності підрахунку свіжоотриману сперму розбавте фізіологічним розчином: у барана – у 20–30 разів, у бугая – 10–15 разів, у жеребця

і у кнура – 2–5 разів.

2. На кінець знежиреного предметного скла скляною паличкою або піпеткою нанесіть невелику краплю розбавленої сперми і зробіть мазок шляхом стікання краплі нахиленим склом.

3. Висушіть на повітрі.

4. Можна фарбувати зразок з попередньою фіксацією 96 % спиртом, для цього після того, як зробили мазок методом стікаючої краплі, висухіть його на повітрі, а потім занурьте у ванночку з 96 % етиловим спиртом на 1–2 хв. для фіксації.

5. Накрийте смужкою фільтрувального паперу, на яку обережно краплями нанесіть фарбу (1 % розчин метиленової синьки чи фуксину) і витримайте 3–5 хв.

6. Змийте фарбу дистильованою водою.

7. Мазок висухіть на повітрі.

8. При збільшенні мікроскопа у 400–600 разів у кількох полях зору підрахуйте кількість нормальних і патологічних спермійв (загальна кількість їх повинна бути не менше 500). Від загальної кількості визначте відсоток патологічних форм сперматозоїдів за формулою:

$$П\% = (П \times 100) / 500, \text{ де}$$

П% – відсоток патологічних форм спермійв;

П – кількість підрахованих патологічних форм спермійв;

500 - загальна кількість підрахованих спермійв.

У спермі барана вміст патологічних форм сперматозоїдів не повинен перевищувати 14 %, бугая – 18 %, кнура – 20 %, жеребця – 20 %.



Дослід 4. ПІДГОТОВКА СПЕРМАТОЗОЇДІВ ДО ОСІМЕНІННЯ ЯЙЦЕКЛІТИН *IN VITRO*

Мета роботи: розглянути основні принципи підготовки сперматозоїдів кнура до осіменіння яйцеклітин *in vitro*.

Обладнання та матеріали: розбавлена сперма кнура, центрифужні пробірки, середовище TALP –Ca, біокулярна лупа, напівавтоматичні піпетки центрифуга.

Хід роботи.

1. Яйцеклітини осіменяють сперматозоїдами кнура. При осіменінні поза організмом видалення сперматозоїдів із розріджувача проводять методом їх спливання або „флотації” (swim-up), що дає змогу відмити сперматозоїди від розбавника та відібрати найбільш рухливі. При цьому застосовується одноразове 15-хвилинне спливання найбільш рухливих сперматозоїдів у пробірках, розміщених під кутом 45 °С. На дно похилених флаконів (4–6 шт) під 1 см³ модифікованого середовища Тіроде (TALP) без іонів Ca²⁺, внести 0,2 см³

суспензії сперматозоїдів з наступним відбором поверхневого шару середовища.

2. Відібрати суспензію рухливих гамет відцентрифугувати при 900g протягом 5 хвилин.

3. Відбирати рідину до осаду і розбавити осад свіжим середовищем TALP без іонів Ca^{2+} до концентрації $1-5 \times 10^7$ сперматозоїдів/см³.



Питання для самоконтролю:

1. Що таке «сперматозоїд», опишіть його будову?
2. Назвіть етапи сперматогенезу.
3. Яка головна відмінність сперматозоїдів від інших клітин?
4. Що ви розумієте поняттям «сперма» з чого вона складається?
5. Які є ступені аглютинації сперматозоїдів?
6. Якими методами проводять попередній відбір сперматозоїдів за статтю?
7. З якою метою використовують тест-систему «HALOMAX» при оцінці сперматозоїдів?
8. З якою метою проводять тест на гіпоосмотичний набряк сперматозоїдів?

РОЗДІЛ 5: ЗАПЛІДНЕННЯ

Запліднення (*fertilisatio*) — це процес злиття чоловічої і жіночої гамет, внаслідок чого відбувається відновлення диплоїдного набору хромосом, характерного для кожного виду тварин, і утворюється одноклітинний зародок — зигота. Заплідненню передують потрапляння сім'яної рідини у статеві шляхи (при внутрішньому заплідненні) або у середовище, де знаходиться яйцеклітина (при зовнішньому заплідненні). У процесі запліднення розрізняють три фази:

- дистантна взаємодія сперматозоїда і яйцеклітини, що забезпечується сукупністю дії неспецифічних факторів, які підвищують ймовірність зустрічі статевих клітин;

- контактна взаємодія і проникнення сперматозоїда в яйцеклітину — здійснюється за допомогою акросоми (акросомальна реакція). При цьому ферменти гіалуронідаза і протеази розчиняють контакти між фолікулярними клітинами зернистої зони;

- penetрація сперматозоїда до яйцеклітини з утворенням спочатку чоловічого і жіночого пронуклеусів та наступним формуванням зиготи.

Процес внутрішнього запліднення яйцеклітини відбувається в ампулі яйцепроводу, куди доходить невелика кількість сперматозоїдів, хоча при еякуляції в статевий тракт самки потрапляє до декількох мільярдів. Період, протягом якого овульовані яйцеклітини здатні до запліднення, різний у різних видів ссавців, але зазвичай не перевищує 24 години. Приблизно за цей же час сперматозоїди втрачають здатність до запліднення, перебуваючи в статевому тракті самки.

У ссавців статеві шляхи самки беруть активну участь у процесі запліднення. Після еякуляції, сперматозоїди, для придбання здатності до запліднення, повинні пройти процес капацитації (рис. 32). При цьому у них відбуваються зміни структури ліпідів клітинної мембрани, що виражається у зміні співвідношення холестерину і фосфоліпідів. Зниження вмісту холестерину дестабілізує мембрану акросоми, що є необхідною умовою для злиття мембран.

Відомо, що найважливішою ознакою капацитації, що пройшла є придбання сперматозоїдом здатності впізнавати прозору оболонку ооцита. У той час, як на поверхні сперматозоїда, що не пройшов капацитацію, присутні вуглеводи («*coating factors*»), які перешкоджають його прикріпленню до яйцеклітини. Ці вуглеводи являють собою полімер з залишків галактози і N-ацетилглюкозаміну, що повторюються. Вони блокують рецептори сперматозоїда, у вигляді молекули ферменту N-ацетилглюкозамінгалактозил-трансферази (глікозилтрансферази), що розпізнають прозору оболонку. Молекули глікозилтрансферази вбудовані в плазматичну мембрану сперматозоїдів безпосередньо над акросомою, причому їх активні центри звернені назовні. При капацитації глікозилтрансферази розпізнають N-ацетилглюкозамінні залишки білків прозорої оболонки.

При капацитації, блокуючі фермент вуглеводи зникають і молекули глікозилтрансферази, на поверхні сперматозоїда, оголюються. У нормі цей фермент каталізує приєднання активованих залишків галактози до вуглеводної

ланцюга, що закінчуються N-ацетилглюкозаміном. Однак у статевих шляхах самки активовані залишки галактози відсутні.

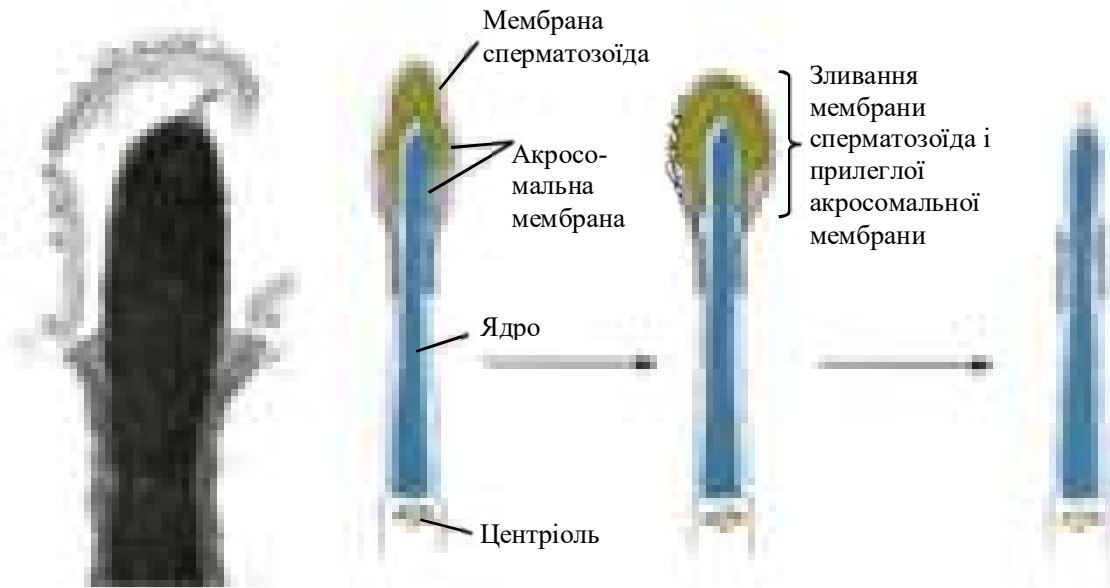


Рис. 32. Капацитація

Тому глікозилтрансферази сперматозоїдів просто приєднується до N-ацетилглюкозаміновими залишкам білків прозорої оболонки яйцеклітини. Таким чином, за типом ключ-замок прикріплюється спермій до ооцитів.

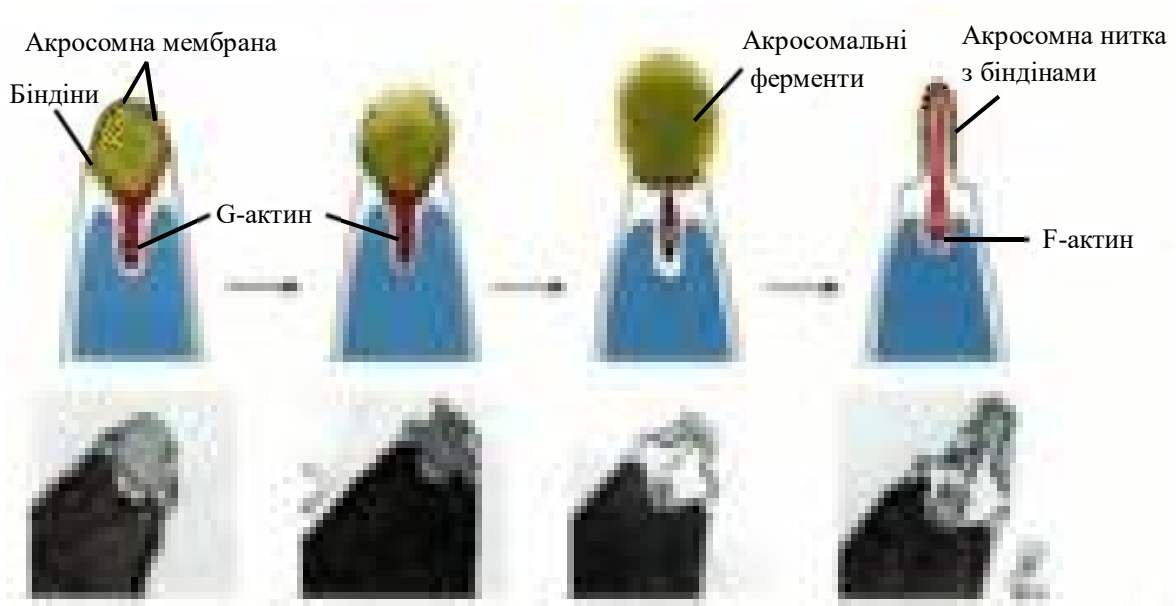


Рис. 33. Етапи акросомальної реакції

Акросомна реакція призводить до виділення ферментів, лізуючого зв'язку між фолікулярними клітинами, оточуючими ооцит (рис. 34). Ферменти, виділені з акросоми, називають лізином. Вони включають гіалуронідазу, яка розчеплює гіалуронову кислоту матриксу, і фермент, що розсіює клітини кумулюса. Крім

Сперматозоїди швидко проходять через блискучу оболонку. Це проходження здійснюється завдяки спільним діям акрозину, пов'язаного з внутрішньою акросомною мембраною, і активних рухів хвоста сперматозоїда. Пройшовши через блискучу оболонку спермій, потрапляє в перивітеліновий простір.

Якщо блок поліспермії функціонує на рівні блискучої оболонки, то в перивітеліновий простір потрапляє один сперматозоїд. Якщо поліспермія блокується на рівні плазматичної мембрани яйцеклітини, то в перивітеліновому просторі можна знайти багато сперматозоїдів, хоча тільки один з них зіллється з яйцеклітиною.

Спермій зливається з плазматичною мембраною яйцеклітини екваторіальним постакросомальним районом голівки. Процес злиття відбувається при взаємодії цього спеціалізованого району мембрани сперматозоїдів і мікворосинок плазматичної мембрани яйцеклітини та займає кілька хвилин.

Після проникнення в яйцеклітину головка сперматозоїдів швидко втрачає оболонку, і хроматин починає деконденсуватися. Внаслідок контакту деконденсованого хроматину сперматозоїда з цитоплазмою яйцеклітини відбуваються локальні зміни субкортикального шару, в який потрапляє спермій. Молекули глобулярного актину полімеризуються, утворюючи скупчення мікрофіламентів. Плазматична мембрана яйцеклітини випинається, утворюючи «горбок» і втрачаючи мікворосинки, з'являється так званий конус запліднення.

5.1. ЗАПЛІДНЕННЯ *IN VITRO*

Необхідність запліднення *in vitro* виникає, коли є потреба одержати ембріони на ранніх стадіях розвитку, а також отримати велику кількість ооцитів від вимушено забитих високопродуктивних тварин. Запліднення *in vitro* також має вирішальне значення в дослідках з генної інженерії, де зиготи необхідні на стадії двох пронуклеусів. Перші телята, одержані після пересадження дуже ранніх ембріонів, не мали економічного ефекту. У 1988–1989 рр. у лабораторії М. Прокоф'єва під керівництвом Л. К. Ернста одержали телят від пересадження запліднених поза організмом ембріонів на більш пізніх стадіях розвитку. Нині відпрацьована методика і технологія запліднення яйцеклітин *in vitro*, що дає можливість проводити всі етапи отримання ембріонів (дозрівання, запліднення і ранній розвиток) без використання тимчасових реципієнтів та одержувати високий вихід повноцінних ембріонів.

Прикладне значення методів дозрівання і запліднення ооцитів *in vitro* полягає в одержанні додаткової кількості дешевих ембріонів, насамперед, в одноплідних тварин. Ці методи дозволяють:

– по-перше, отримувати ембріони від високоцінних донорів, що не реагують або слабо реагують на гормональну обробку;

– по-друге, використовувати генетичний потенціал видатних за племінними і продуктивними якостями тварин після їх вибракування за віком або з інших причин; – по-третє, збільшити поголів'я нащадків, наприклад,

шляхом підсадження отриманих поза організмом морул і бластоцист низькопродуктивним реципієнтам.

Методи *in vitro* запліднення:

Метод ІКСІ (ICSI) (*Intra Cytoplasmic Sperm Injection* — дослівно «введення сперматозоїда в цитоплазму ооцита» також ІЦІС — інтроцитоплазмична ін'єкція сперми).

Отримання сперматозоїдів для ІКСІ може здійснюватися з еякуляту або хірургічними методами (з придатка чи сім'яника). При проведенні ІКСІ сперма обробляється таким чином, щоб з неї можна було виділити хоча б один нормальний рухливий сперматозоїд. За допомогою мікроінструментів під мікроскопом вибирається сперматозоїд хорошої якості. Він поміщається в мікроголку, за допомогою якої здійснюється прокол блискучої оболонки яйцеклітини, а потім сперматозоїд вводиться в цитоплазму яйцеклітини. Таким чином проводиться запліднення всіх отриманих при пункції яйцеклітин. Процедура ІКСІ проводиться в день отримання яйцеклітин або наступного дня, якщо не відбулося самостійного запліднення. Перед проведенням ІКСІ видаляються клітини променистого вінця, які оточують яйцеклітину. Для процедури ІКСІ використовують ооцити МІІ (зріла яйцеклітина і полярне тільце) (рис. 35.).

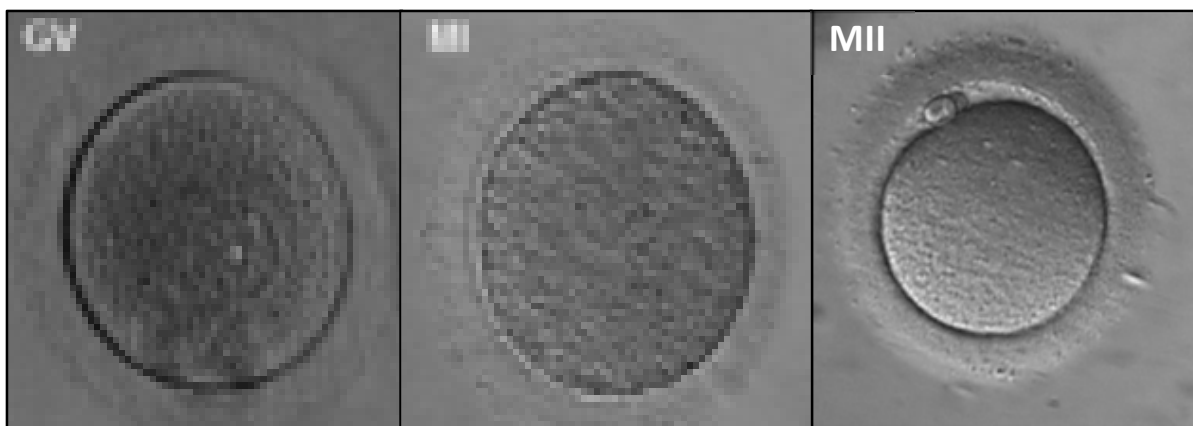


Рис. 35. Мейотичний стан ооцитів

Послідовність проведення процедури ІКСІ (ICSI) (рис.36):

1. Імобілізація сперматозоїдів - сперматозоїд знерухомлений шляхом перетирання його хвоста.
2. Засмокування сперматозоїдів в спеціальну голку.
3. Закріплення ооцита на холдер.
4. Прокол ооцита і відсмокування невеликої кількості ооплазми
5. Ін'єкція сперматозоїда разом з ооплазмою.

Подальший розвиток ембріона протікає так само, як і при природньому заплідненні. Показники частоти запліднення при ІКСІ можуть коливатися від 30 до 80 %. Немає гарантії, що будь-яка з яйцеклітин після проведення процедури заплідниться. Нездатність яйцеклітини до запліднення і ділення може бути пов'язана з труднощами самої процедури (пошкодження яйцеклітини), а також з якістю обох статевих клітин. Так, наприклад, при виборі сперматозоїдів для ІКСІ

зовні вони можуть бути хорошої якості (рухливість і будова), але містити хромосомні аномалії. Якість яйцеклітин також впливає на результати проведення ІКСІ.

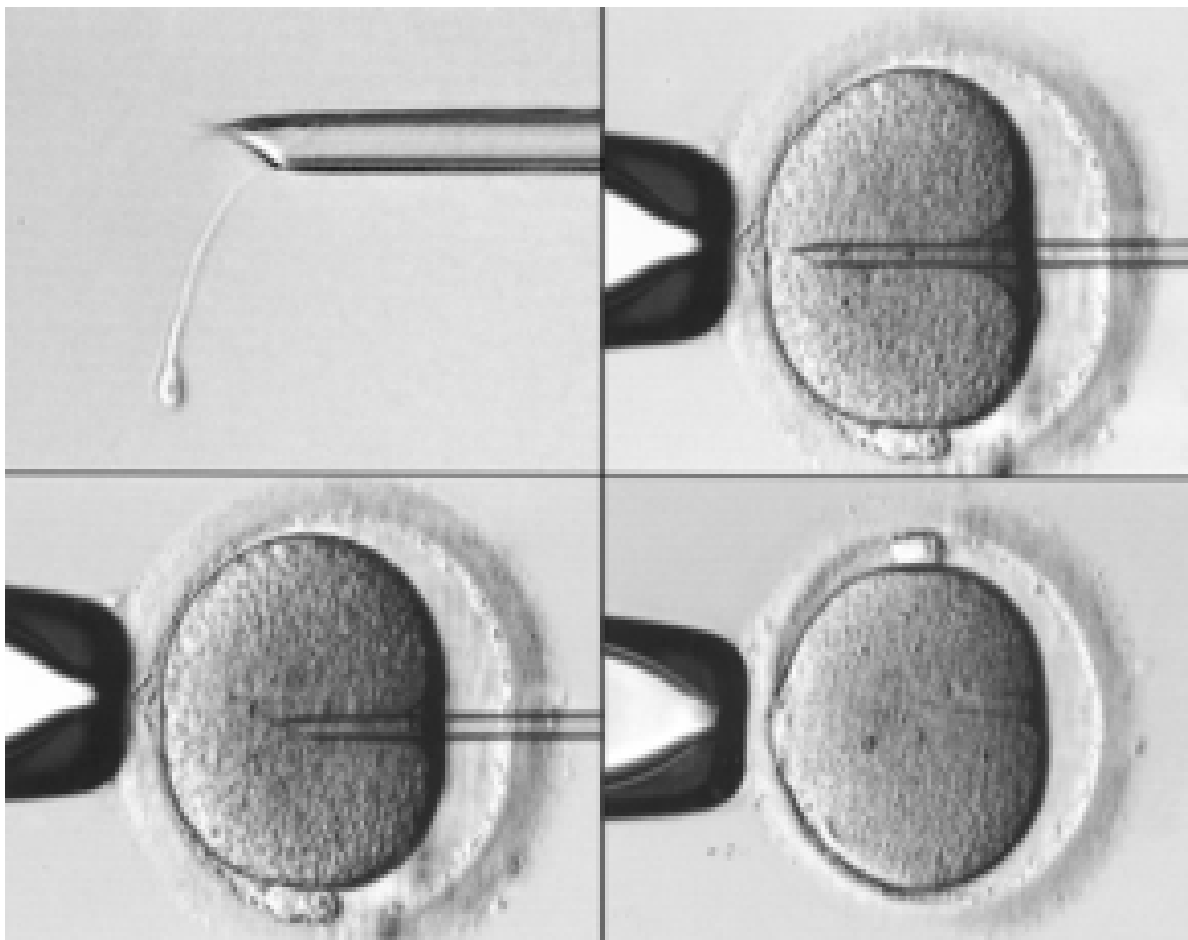


Рис. 36: Послідовність проведення запліднення методом ІКСІ

Інсеминація *in vitro* – співкультивування ооцитів та сперматозоїдів поза межами організму.



Дослід 1. ЗАПЛІДНЕННЯ ЯЙЦЕКЛІТИН *IN VITRO*

Мета роботи: розглянути основні принципи осіменіння яйцеклітин *in vitro*.

Обладнання та матеріали: підготовлена сперма кнура, центрифужні пробірки, середовище TALP -IVF, бінокулярна лупа, напівавтоматичні піпетки, чашки Петрі, CO₂- інкубатор.

Хід роботи.

1. Гамети після дозрівання самостійно втрачають клітини кумулюсу. Піпетування та 5–6-разове відмивання ооцитів після дозрівання виконують в середовищі TALP для відмивання.

2. У чашці Петрі за допомогою автоматичної піпетки готують крапельну систему (наносять середовище TALP IVF у вигляді крапель об'ємом

50–60 мкл.), після чого систему покривають парафіновим маслом.

3. За допомогою піпетки у кожную краплину поміщають по 5 яйцеклітин.

Таблиця 7. Хімічний склад середовищ для проведення запліднення яйцеклітин поза організмом

Компоненти фірми Sigma	У розрахунку на 20 мл води, мг		
	TALP БЕЗ іонів Ca ²⁺	TALP для відмивання	TALP – IVF
1. Натрію хлорид	130,9	133,2	133,2
2. Калію хлорид	4,0	4,76	4,76
3. Натрію гідросульфат	42,0	3,36	41,8
4. Натрію дигідрофосфат	0,94	0,94	0,94
5. Натрію лактат	11,2	11,2	11,2
6. Магнію хлорид	2,0	2,0	2,0
7. Кальцію хлорид	-	4,4	4,4
8. Нерес	24,0	48,0	48,0
9. Феноловий червоний	0,15	0,2	0,2
10. Канаміцин сульфату	1,5	1,5	1,5
11. Натрію піруват	2,2	1,1	1,5
12. БСА	120,0 (A4919)	60,0 (A4919)	60,0 (A 6003)
13. Глюкоза	50,0	20,0	-

4. За допомогою скляної пастерівської піпетки у кожную краплину вносять суспензію із заздалегідь підготовленими сперматозоїдами.

5. Капацитовані поза організмом сперматозоїди кнура та оцити спільно інкубують у протягом 18 годин при концентрації рухливих сперматозоїдів 250 тис на 1см³ та температурі 38,5 °С і 5 % CO₂ в атмосфері повітря та pH 7,8.

6. Через 18 годин яйцеклітини, які мають два пронуклеуси відмивають від сперматозоїдів в TALP для відмивання та переносять для подальшого культивування в середовище NCSU–23.



Дослід 2. КУЛЬТИВУВАННЯ ЕМБРІОНІВ СВИНЕЙ *IN VITRO*

Мета роботи: розглянути основні принципи культивування ембріонів *in vitro*.

Обладнання та матеріали: зиготи свиней, середовище NCSU–23, парафінове масло, біокулярна лупа, напівавтоматичні піпетки, чашки Петрі, CO₂- інкубатор.

Таблиця 8. Хімічний склад середовища NCSU-23

Компоненти фірми Sigma	м Моль
1. Натрію хлорид	108,6
2. Калію хлорид	4,79
3. Натрію гідросульфат	25,07
4. Калію дигідрофосфат	1,49
5. Магнію сульфат	1,19
6. Кальцію хлорид	1,7
7. Глютамін	1,0
8. Таурин	7,0
9. Гіпотаурин	5,0
10. БСА (мг/мл, А6003)	4,0
11. Глюкоза	5,55

Хід роботи.

1. Готують крапельну систему (у чашці Петрі роблять краплини об'ємом 50-60 мкл. із середовища NCSU–23).
2. Крапельну систему покривають парафіновим маслом.
3. Чашку Петрі поміщають у CO₂-інкубатор на 2 години, для еквалібрації поживного середовища та парафінового масла.
4. За допомогою піпетки поміщають по 2 зиготи у кожну краплину.
5. Культивування ембріонів до стадії морули-бластоцисти виконують протягом 5–6 діб.



Питання для самоконтролю:

1. Що таке запліднення?
2. Які фази запліднення розрізняють?
3. Як класифікують ооцит-кумулюсні комплекси?
4. Які розрізняють види запліднення *in vitro*?

РОЗДІЛ 6: ПЕРЕДІМПЛАНТАЦІЙНИЙ РОЗВИТОК

Ділення бластомерів ембріона відбувається синхронно, так що при кожному дробленні кількість бластомерів подвоюється.

До середини 2-клітинної стадії зародки повністю залежать від ооплазматичних запасів білків і м-РНК. З середини 2-клітинної стадії активуються гени зародка. В цей же час починають руйнуватись м-РНК ооцита, але білки, трансльовані з цих м-РНК зберігаються до стадії бластоцисти, а деякі і пізніше. В кінці двохбластомерної стадії в деяких ядрах з'являються типові ядерця, тобто активуються рибосомальні гени зародка. Ці гени, на даній стадії, експресуються і в основному вони необхідні для підтримання життєдіяльності клітин. Ядра, знаходячись під контролем цитоплазматичних факторів яйця, виконують переважно функції клітинних органодів, що забезпечують впорядкованість дроблення (рис. 37).

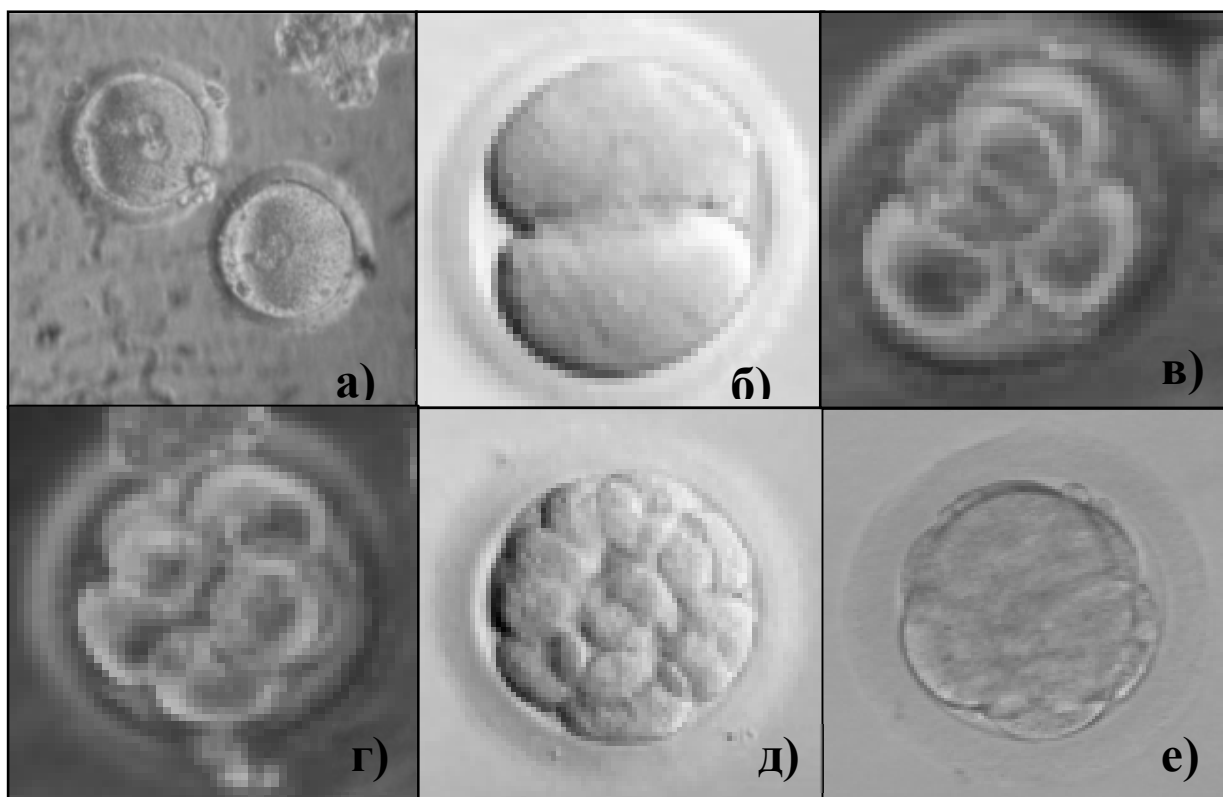


Рис. 37. Процес розвитку ембріона in vitro: а) зиготи; б) 2-ох, в) 4-ох та г) 8 – клітинні ембріони; д) рання та е) пізня морули

На 3-4 добу розвитку починається процес компактизації. Між бластомерами встановлюються так звані щільні контакти, і вони «розпластуються» один по іншому створюючи зливу механічно напружену структуру – компактизовану морулу. Стадія морули присутня у багатьох видів, але у амфібій і риб вона виглядає як «груна винограду» і лише у ссавців, як «комочок пластиліну» за

рахунок щільних контактів між клітинами і механічної напруги. В компактизованій морулі невиражені межі (рис. 38).

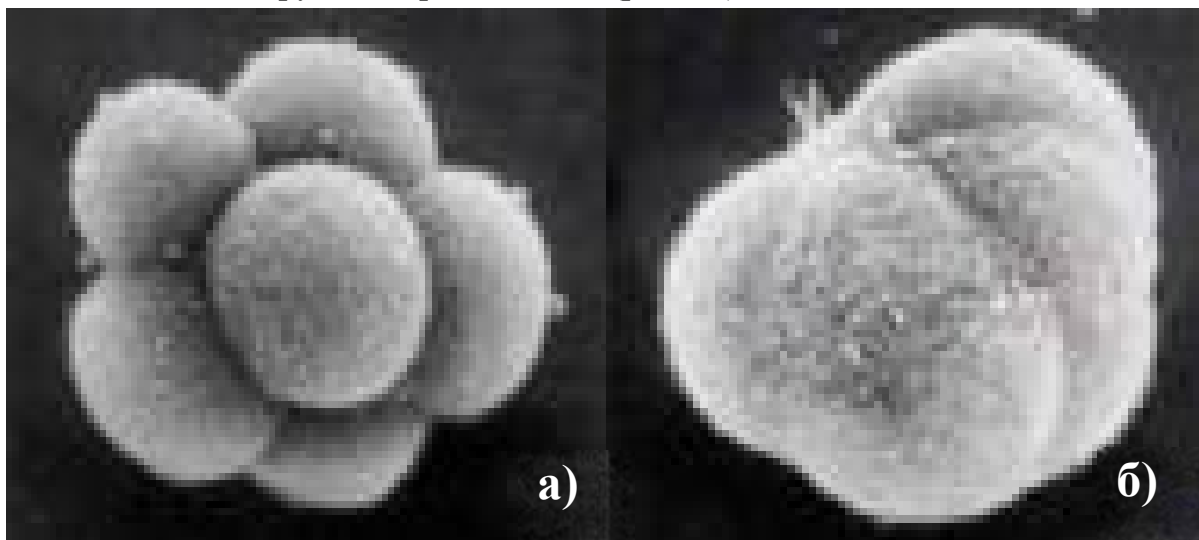


Рис. 38. Скануюча електронна мікрофотографія а) не компактизованого та б) компактизованого 8-клітинного мишачого ембріона

У принципі, компактизація відбувається не за рахунок встановлення щільних контактів. Спочатку клітини починають формувати довгі відростки, якими намагаються «зачепитися» за «сусідів». На кінці відростків локалізуються так звані кадгеріни - білки міжклітинних контактів. Вони «прилипають» до кадгеринів сусідніх клітин, але це «прилипання» вимагає іонів кальцію. Якщо ж кальцію в середовищі немає, контакт не встановиться. Медіаторами міжклітинної адгезії також служать глікопротеїни, що функціонують на поверхнях мікрворсинок. Одним з цих глікопротеїнів є увоморулін. Антитіла до увоморуліну викликають декомпактизацію бластомерів. При компактизації відбувається ущільнення контактуючих поверхонь сусідніх бластомерів, мікрворсинки укорочуються шляхом деполімеризації актину. Таким чином, бластомери набувають полярності, яка виражається в наявності мікрворсинок тільки на зовнішній частині їх мембран, яка не контактує з іншими бластомерами, а також в асиметричному положенні внутрішньоклітинних компонентів. Уздовж зовнішньої поверхні збирається так званий актиновий цитоскелет (він є скрізь, але тут він особливо розвинений).

Цей цитоскелет механічно натягує зовнішні поверхні клітин. У підсумку, клітини починають «розпластуватися» один по одному - ембріон компактизується. Однак, на цьому етапі компактизація все ще вимагає кальцію. І якщо ембріон помістити в середовище без кальцію, морула знову «розкомпактизується», набувши подоби «виноградної грони»

На наступному етапі між клітинами встановлюються справжні щільні контакти, і морула втрачає свою «кальцій-залежність». Ці етапи так і називаються: кальцій-залежна і кальцій-незалежна морула.

Площина наступного ділення орієнтована так, щоб використовувати цю симетрію для створення двох різних потомків поляризованого бластомера –

полярної клітини, яка розташовується ззовні морули, і аполярної, розташованої всередині неї. Так, клітини компактизованого зародка діляться і утворюють 16- і 32-клітинну морулу.

Після компактизації тісна упаковка бластомерів стабілізується більш досконалими міжклітинними контактами: всередині морули, між клітинами, виникають щільні контакти, а на поверхні морули утворюються щільні контакти, що призводить до ізоляції внутрішніх клітин морули. Якість морули оцінювати найскладніше, але теж можливо.

Морула повинна складатися не менше, ніж з 8 клітин і бути «добре компактизованою», тобто майже сферичної форми, без «виступів» і «западин». Якщо морула складається з меншої кількості клітин, або вони утворюють окремі нез'язані компактні області, це знижує оцінку. Також знижують оцінку вакуолі і фрагментація.

Під час 6-го і 7-го ділень дроблення морула перетворюється в бластоцисту (зародковий пухирець). Стадія бластоцисти відіграє важливу роль, так як при перетворенні морули на бластоцисту відбувається перший процес диференціювання. Більша частина нащадків зовнішніх клітин морули стають клітинами трофобласта. Ця група клітин не утворює ембріональних структур, а перетворюється на хоріон, який бере участь в утворенні плаценти. Тканини плаценти забезпечують отримання плодом кисню і поживних речовин від матері; секретують гормони, необхідні для виношування плода; синтезують регулятори імунної відповіді, завдяки яким не відбувається відторгнення плода. Однак клітини трофобласта не здатні утворити ні однієї клітини самого зародка. Вони необхідні для імплантації зародка в стінку матки.

Внутрішні (аполярні) клітини 16-клітинної морули, до яких іноді додаються і зовнішні (при переході до 32-клітинної стадії), утворюють ембріобласт – внутрішню клітинну масу. Клітини ембріобласта призначені для розвитку зародка і для індукції процесів, необхідних для повноцінної імплантації і плацентації. Внутрішня клітинна маса, разом з трофобластом, також бере участь у формуванні зародкових оболонок.

Встановлено, що бластомери, які на 2-клітинній стадії діляться першими, з більшою вірогідністю виявляються всередині внутрішніх клітин морули, а отже і серед клітин ембріобласта. Це означає, що вони мають більшу вірогідність потрапити в склад тіла зародка.

Морула представляє собою кулясте скупчення бластомерів, позбавлене порожнини, а бластоциста – пухирець, який складається зі стінки (трофобласт), порожнини з рідиною (бластоцеле) і скупчення клітин ембріобласта на одному з полюсів внутрішньої поверхні трофобласта (рис. 39) .

Процес утворення порожнини, тобто утворення бластоцисти, називається кавітацією. Накопичення рідини у зародку потребує витрат енергії і залежить від активного переносу іонів Na у внутрішні міжклітинні простори. В плазматичних мембранах клітин трофобласта є калій-натрієвий насос, який переносить іони Na всередину зародка, при цьому осмотичний тиск підвищується і сюди починає поступати рідина.

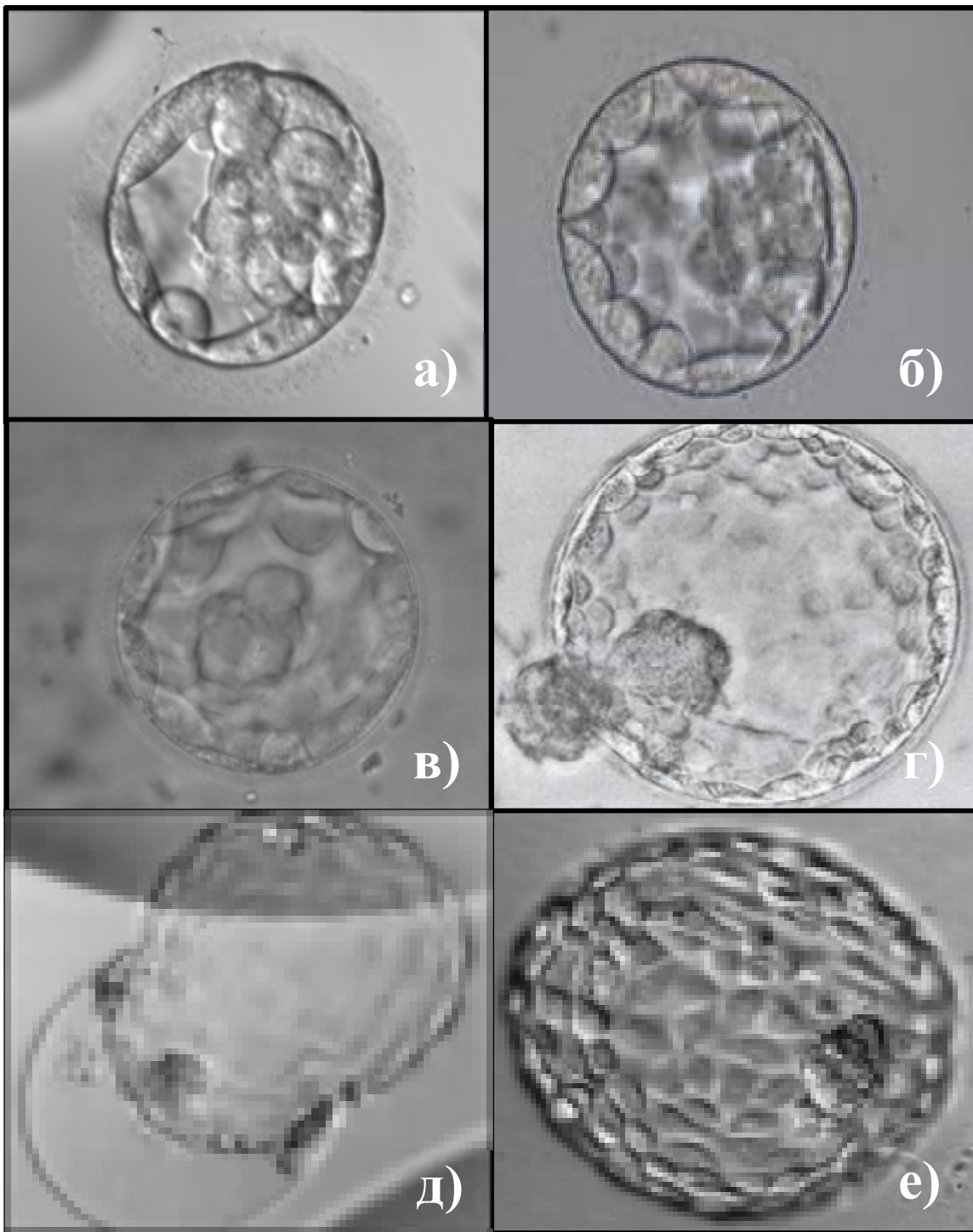


Рис. 39. Стадії розвитку бластоцисти: а) рання, б) пізня та в) еспандована бластоцисти ,г) та д) бластоциста виходить з зони пелюціда е) бластоциста, яка вийшла з зони пелюціда

Накопичуючись між бластомерами, рідина відсуває бластомери до одного з полюсів трофобласта, тут із них формується ембріобласт. Щільні контакти,

якими з'єднуються клітини трофобласта допомагають утримати рідину в порожнині.

Чим більше бластоцеле і краще розвинута внутрішня клітинна маса і трофобласт – тим більше потенціал ембріона до імплантації. Коли порожнина бластоцисти досягає значних розмірів, стоншена за рахунок розтягу прозорої оболонки розривається і починається процес хетчингу, тобто виходу бластоцисти із зони пелюціда. Тільки після закінчення цього процесу бластоциста здатна імплантуватися в ендометрій матки.

Тотіпотентність

Зигота містить повний набір генів і всю генетичну інформацію даного виду, породи і особи.

Тотіпотентність – це здатність клітини до формування будь-якої тканини, аж до розвитку з неї нормальної особи.

Клітини (бластомери) ранніх ембріонів (до 8-клітинної стадії) ідентичні і зародок володіє вражаючою здатністю до регуляції розвитку, тобто з кожного окремого бластомера може утворитися повноцінна тварина. Це означає, що бластомери здатні замінювати один одного, що дає можливість утворення ембріона з одного бластомера. Деградовані бластомери замінюються хорошими, на всіх стадіях розвитку, до настання процесу компактизації. Також, із поділених навпіл морул і бластоцист, половинки яких містять клітини ембріон- і трофобласта, можна отримати повноцінний ембріон.

Утворення однойцевих близнюків – це звичайна властивість тотіпотентності. Використання цієї властивості дає можливість отримувати ідентичних близнюків.

Часові параметри розвитку ембріонів

Овуляція у нормально корів з нормальним циклом відбувається через 30-32 год. після початку тічки. Запліднення ооцита повноцінним спермієм настає вже через 3-4 год. після овуляції.

Злиття пронуклеусів відбувається через 15 год. після запліднення. Запліднені *in vitro* яйцеклітини корів досягають 2, 4 і 8-клітинної фази в період між 15-24 год., 35-40 год. і через 45-50 год. після запліднення.

Ранні і пізні морули, а також ранні бластоцисти з'являються через 120 год.

Через 8 діб в середовищі виявляються пізні і експандовані бластоцисти, через 264 годин (11 діб) – що вийшли із зони пелюціда.

В таблиці 8 вказана динаміка розвитку ембріонів *in vitro* та *in vivo*.

Загальні підходи до оцінки якості ембріонів

Оцінка стану зародків слугує для відбору незапліднених яйцеклітин і визначення стадії розвитку ембріонів, а також виявлення пошкоджень окремих бластомерів чи всього ембріона. Морфологічна оцінка є основним методом визначення якості клітин. При цьому враховуються основні морфологічні ознаки повноцінності, які можуть візуально спостерігатися у ембріона, а саме: цілісність і рівномірність розвитку бластомерів, прозорість перивітелінового простору, цілісність прозорої оболонки, відповідності стадії розвитку віку ембріона. Частилки на поверхні прозорої оболонки вказують на можливість бактеріального зараження. Часто при інфікуванні статевих органів донорів яйцеклітини

залишаються незаплідненими. Відмінності величини між бластомерами у межах 2:1 оцінюються як нормальні, так як до дослідження потрапляють ембріони при різній послідовності циклів ділення. Більш сильні відмінності величини (4:1 і більше) виникають, якщо окремі бластомери припиняють ділення. Стиснення бластомерів – це в більшості випадків наслідок гіпертонічних навантажень. Деформація виникає при зміненому внутрішньому тиску клітин, чи в результаті дефектів в клітинних мембранах.

По результатах оцінки робиться заключення про якість ембріона і приймається рішення щодо його подальшого використання.

Таблиця 9. Динаміка розвитку ембріонів *in vitro* та *in vivo*

Стадія розвитку	Час розвитку, год.	
	<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>
2-клітинні	15-24	24-72
4-клітинні	35-40	48-72
8-клітинні	45-50	72-120
16-клітинні	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

Ознаки ембріонів, які знаходяться на різних стадіях розвитку між 6 і 9 добою після овуляції, представлені в таблиці 9.

Морфологічна оцінка якості ембріонів

Всі оцінені ембріони відносять до трьох основних груп:

- нормально розвинені (повноцінні) ембріони;
- частково-дегенеровані ембріони;
- дегенеровані ембріони (рис. 40).

Рідше зустрічаються нетипові ембріони – це бластоцисти з відхиленнями в області ембріо- і трофобласта.

Таблиця 10. Ознаки, що визначають стадію розвитку ембріона

Стадія розвитку	Скорочена назва	Кількість клітин	Діаметр, мкм	Ознаки
Початкова стадія дроблення		2-16	140-170	Бластомери округлої чи овальної форми, розташовуються вільно.
МОРУЛИ	Мо			Стадія компактизації: поступове укріплення клітинних контактів.
Рання морула	Мо I	16-32	140-170	Початок компактизації: скупчення клітин рівномірне, бластомери однакові за розмірами, перивіталіновий простір вільний від окремих бластомерів, плазми та інших включень.
Пізня морула	Мо II	32-64	140-170	Завершення компактизації: клітинний комплекс рівномірний, крайні бластомери однакової величини і наповнення, перивіталіновий простір вільний від окремих бластомерів, плазми та інших включень.
БЛАСТО-ЦИСТИ	Бл			Утворення ембріобласта, трофобласта і бластоцеле.
Рання бластоциста	Бл I	64-130	140-170	Маленьке, переважно ексцентричне бластоцеле у формі цилінда, візуалізується ембріо- і трофобласт.
Пізня бластоциста	Бл II	64-130	140-200	Ембріобласт локалізований, трофобласт рівномірний, зменшення перивіталінового

				простору внаслідок розширення бластоцеле.
Експандована бластоциста	Бл III	64-130	140-200	Ембріобласт має чіткі грані, через збільшення розмірів бластоцеле розширюється і стоншує зону пелюціда.
Повністю експандована бластоциста	Бл IV	130-200	180-220	Ембріобласт визначений чітко, розширення і стоншення зони пелюціда, максимально збільшене бластоцеле.
Бластоциста виходить з зони пелюціда	Бл IV	Більше 200	180-220	Відбувається наклывування і розрив зони пелюціда. Ембріо- і трофобласт починає виходити із зони.
Бластоциста, яка вийшла з зони пелюціда	Бл V	200-800	200-800	Шаровидна форма. Ембріо- і трофобласт чітко візуалізовані. Прозора оболонка відсутня.

Нормально-розвинуті (повноцінні) ембріони

Характеризуються повноцінним діленням всіх бластомерів, які утворюють морулу і бластоцисту.

За впливу різних факторів можуть утворюватися дефекти ооцитів і ембріонів. Ці дефекти призводять до відмирання бластомерів. Якщо всі бластомери зіпсовані ембріон дегенерує.

Частково-дегенеровані ембріони

В окремих випадках відбувається дегенерація частини бластомерів, які розташовуються поряд з нормальними бластомерами. Деградовані клітини можна ідентифікувати на стадії розвитку – морула. Вони проявляються як окремий клітинний матеріал і завжди знаходяться поза зв'язком компактно розташованих бластомерів.

Дегенеровані ембріони

При повному руйнуванні бластомерів, при їх нерівномірному діленні, затримці в розвитку та ін. ембріон визнається дегенерованим і непридатним до пересадки.

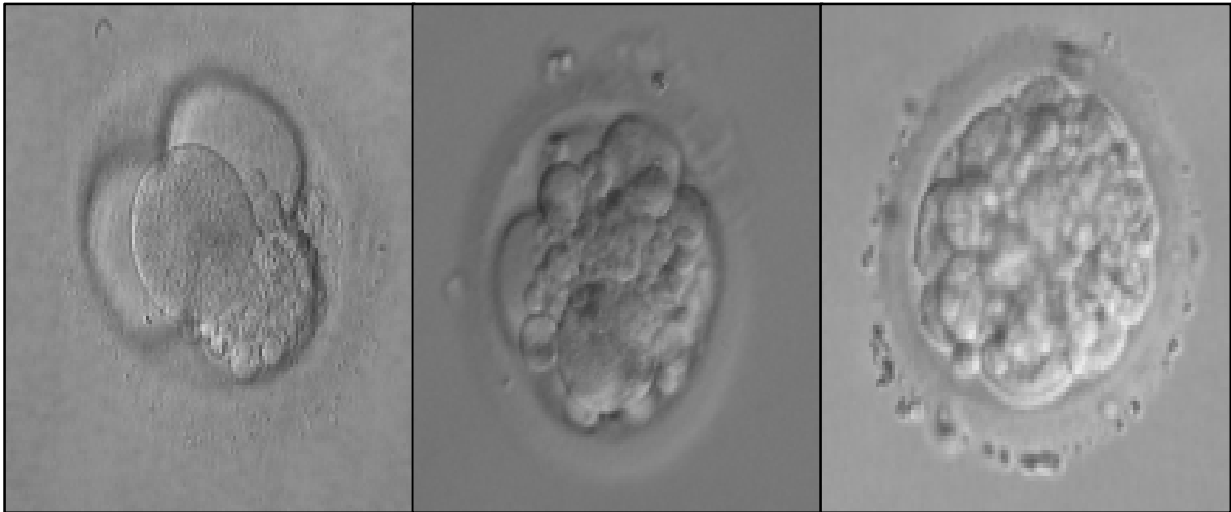


Рис. 40. Ембріони з різним ступенем дегенерації: а) 15-20%; б) 30-40%; в) більше 50%



Питання для самоконтролю:

1. Коли починається компактизація ембріона?
2. Які є стадії бластоцисти?
3. Як проводять оцінку якості ембріонів?
4. Що ви розумієте під поняттям «тотіпотентність»?
5. Які ембріони вважають дегенерованими?

РОЗДІЛ 7

СУЧАСНІ МЕТОДИ КЛІНІЧНОЇ ЕМБРІОЛОГІЇ У ВЕТЕРИНАРНІЙ МЕДИЦИНІ

7.1. КРІОКОНСЕРВУВАННЯ ООЦИТІВ, СПЕРМИ ТА ЕМБРІОНІВ

У біотехнології відтворення тварин важливим розділом є науковий напрямок, який пов'язаний із кріоконсервуванням генетичного матеріалу у вигляді гамет та ембріонів. Україна займає провідне місце в світі в науковому і практичному плані з кріоконсервування чоловічих гамет. Але щодо довготривалого зберігання і використання в практиці тваринництва жіночих статевих клітин наша країна немає значних успіхів. Ця проблема досить складна та вимагає значних економічних, інтелектуальних і практичних затрат. Нині розробка технології кріоконсервування жіночих гамет має для кожної країни пріоритетне значення, оскільки дає змогу зберігати для майбутніх поколінь біологічне різноманіття тваринного світу, інтенсифікувати селекційний процес і використовувати їх в практичній біотехнології відтворення тварин.

Досягнуті за останні десятиріччя успіхи в галузі біології розмноження сільськогосподарських тварин значно розширили можливості регулювання відтворювальної функції у тварин біотехнологічними методами, відкрили великі можливості зберігання та практичного використання репродуктивних клітин і ембріонів, залежно від потреб народного господарства.

Частіше заморожують ембріони, вони можуть бути заморожені на різних стадіях:

- Запліднені яйцеклітини (зиготи);
- ембріони на різних стадіях дроблення;
- бластоцисти.

Кріоконсервування репродуктивних клітин або ембріонів проводиться для того, щоб зупинити всі біологічні процеси в клітинах. Ефективний спосіб зробити це - піддати клітини впливу дуже низьких температур, таких як температура рідкого азоту (-196 ° C). При такій температурі в клітині не може відбуватися жоден метаболічний процес. Однак охолодження клітин до дуже низьких температур не позбавлене ризику. Внутрішньоклітинний простір ооцитів і ембріонів майже на 80% складається з води, так що вплив на клітини дуже низьких температур може спровокувати утворення кристалів льоду, що неминуче зашкодить клітини.

Існує два різні методи, які здатні обійти проблему наявності води у клітинах – це повільне заморожування і вітрифікація; обидва вони успішно використовуються для кріоконсервації ооцитів і ембріонів.

Існують два принципово різних методи повільного заморожування репродуктивних клітин:

- 1) повільне нерівноважне заморожування;
- 2) повільне рівноважний заморожування;

і два різних методи вітрифікації:

- 1) нерівноважна вітрифікація;
- 2) рівноважна вітрифікація.

Під час повільного нерівноважного заморожування температура спочатку опускається з 37°C до 22°C (кімнатна температура), і при цій температурі до репродуктивного матеріалу (яйцеклітина чи ембріон) додається кріопротектор. Після насичення кріопротектором (КП) клітину занурюють в фізіологічний сольовий розчин і охолоджують до температури -7°C (саме в цей момент активується утворення кристалів льоду в позаклітинному просторі). Оскільки такі кристали (лід) зазвичай складається з чистої води, а клітина занурена в фізіологічний розчин, концентрація солі у позаклітинному просторі зростає і підвищується осмолярність. У відповідь на таке підвищення осмолярності клітина починає втрачати воду і зморщуватися. Те, що відбувається далі, буде залежати від швидкості охолодження і від розміру клітини.

Якщо регульована швидкість охолодження є досить невеликою (для ооцитів і ембріонів зазвичай $0,3^{\circ}\text{C} / \text{хв.}$), відбувається падіння температури і утворення кристалів льоду в позаклітинному просторі, клітина буде реагувати на це поступовою втратою води, що в свою чергу призводить до зморщування клітини. Коли клітина охолоджується до температури, скажімо, від -30°C , вона вже втратила більшу частину своєї води (тобто вона досить зневоднена) так, що внутрішньоклітинний простір твердне без утворення внутрішньоклітинних кристалів льоду, які мають згубну дію. Проте, коли клітину з температурою від -30°C занурюють в рідкий азот, в ній будуть знаходитися мікроскопічні внутрішньоклітинні кристали льоду, які є нешкідливими за умови, що клітина буде відтавати дуже швидко ($> 300^{\circ}\text{C} / \text{хв.}$), щоб не допустити розростання цих кристалів льоду до розмірів, які можуть завдати шкоди. Після відтавання до температури 22°C кріопротектор розбавляється, до того як температура клітини знову досягне 37°C .

Перші кроки в процесі повільного рівноважного заморожування аналогічні крокам при повільному нерівноважному заморожуванні. Різниця полягає в тому, що повільне заморожування продовжується до того часу, коли температура клітини досягає -80°C . При такій температурі клітина втрачає всю, здатну заморожуватись, воду і може бути поміщена у рідкий азот без ризику утворення внутрішньоклітинних кристалів льоду. При даному методі заморозки клітини повинні вітати повільно ($< 25^{\circ}\text{C} / \text{хв.}$) задля попередження осмотичного шоку.

Після відтавання до температури 22°C кріопротектор розбавляється, до того як температура клітини знову досягне 37°C .

Недоліки повільного заморожування:

Коли клітини охолоджується повільно, їхня здатність до виживання залежить від швидкості охолодження і / або нагрівання.

- Необхідно уникати утворення позаклітинних і внутрішньоклітинних кристалів льоду.

- Клітини можуть загинути при охолодженні до $\sim 0^{\circ}\text{C}$.

- Клітини можуть пережити заморожування, але загинути від осмотичного шоку при відтаванні.

- Для захисту клітин від шкоди, завданої кріоконсервацією, можуть використовуватися різні хімічні речовини, так звані кріопротектори.

- Необхідне дороге устаткування, наприклад програмні заморозувачі для біологічних об'єктів.
- Кріоконсервація вимагає багато часу (3-5 годин в залежності від кінцевої точки повільного заморожування).
- Щоб забезпечити відтворені результати, необхідні надійні методи кріоконсервації.

Вітрифікація – перехід рідини при пониженні температури в скловидний стан. В кріобіології слово «вітрифікація» часто використовується як жаргонізм для позначення надшвидкого заморожування біологічних об'єктів. У короткому викладі, вітрифікація має відношення до фізичного процесу, при якому концентровані розчини кріопротекторних речовин при зниженні температура твердне без утворення кристалів.

У твердому стані зберігається нормальний розподіл молекул і іонів, таке ж, як в рідкому стані, і він може розглядатися як вкрай в'язкий твердий склоподібний стан. Перехід в склоподібний стан можна оцінити за допомогою диференційної скануючої колориметрії, рентгенодифракційним методом чи шляхом безпосереднього візуального спостереження.

Кріопротектори – речовини, що захищають живі об'єкти від шкідливої дії заморожування. Їх можна розділити на дві групи: проникаючі та непроникаючі кріопротектори; обидва види успішно використовуються для повільного заморожування і вітрифікація.

До групи проникаючих кріопротекторів відносяться такі речовини:

- диметилсульфоксид (ДМСО),
- гліцерин,
- пропіленгліколь (ПГ),
- етиленгліколь (ЕГ)
- метанол.

У 1954 році Лавлок довів, що всі ці кріопротектори здатні проникати через мембрани ооцитів і ембріонів, вони забезпечують захист як всередині, так і навколо клітин.

До непроникаючих кріопротекторів, відносяться:

- моносахариди (галактоза);
- дисахариди (сахароза і трегалоза);
- полісахариди (декстрини і гідроксіетильований крохмаль)
- полімери (поліетиленгліколь).

Згідно опублікованих результатів досліджень непроникаючих кріопротекторів відомо, що вони захищають клітини за допомогою дегідратації, стабілізації ліпідних біошарів і білків, або за рахунок зміни властивостей води в безпосередній близькості від мембран. Коли ооцити або ембріони відчуває вплив моно- або дисахаридів, клітини реагують осмотичною втратою води. Оскільки ці кріопротектори не проникають крізь мембрану, клітини залишаються стиснутими до тих пір, поки не відбудеться урівноваження.

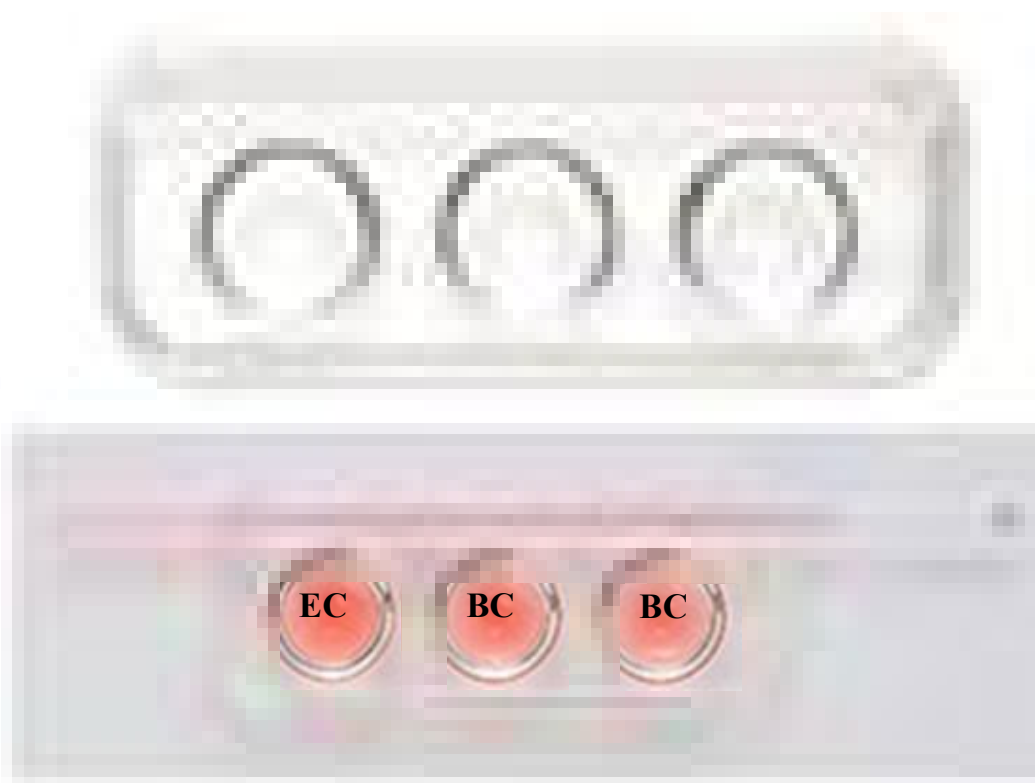


Рис. 41. Система для вітрифікації



Дослід 1. ЗАМОРОЖУВАННЯ ЯЙЦЕКЛІТИН ТА ЕМБРІОНІВ МЕТОДОМ ВІТРИФІКАЦІЇ

Мета роботи: розглянути основні принципи вітрифікації яйцеклітин та ембріонів.

Обладнання та матеріали: набір для вітрифікації (середовище для еквалібрації (ЕС), середовище для вітрифікації (ВС), кріотоп, 3-х лунковий планшет), піпетка для денудації ембріонів, рідкий азот, бінокулярна лупа, напівавтоматичні піпетки.

Хід роботи.

1. Весь процес повинен виконуватися при кімнатній температурі (25–27 °С).

2. Заповнюють контейнер (термос) рідким азотом.

3. Для яйцеклітин та ембріонів використовують тримач з капіляром діаметром 140–170 мкм., для ембріонів на стадії бластоцисти – 170–200 мкм.

4. Першу лунку планшета заповнюють 300 мкл середовищем для еквалібрації (ЕС); другу та третю лунки заповнюють 300 мкл середовищем для вітрифікації (ВС).

5. За допомогою піпетки розміщують яйцеклітини або ембріони на поверхню середовища для еквалібрації. Еквалібрують яйцеклітини протягом 15 хв, ембріони – протягом 12 хв.

Увага: наступні кроки повинні тривати не менше 25 с. та не більше 90 с.

6. Аспірують ооцит з невеликою кількістю середовища для еквілібрації, та поміщають у другу лунку (середовище для еквілібрації), опускаючи ембріон на середину глибини середовища (рис. 42).

7. Промивають піпетку від середовища.

8. Ооцит спливає у даному середовищі, тому 5–6 разів аспірують його піпеткою та випускають на дно лунки.

9. Коли яйцеклітина перестане повністю спливати, переміщують її у третю лунку на середину глибини вітрифікаційного розчину.

10. Промивають піпетку свіжим розчином для вітрифікації, та перемішують розчин навколо ооцита, очікуючи повного осадження ооцита на дно лунки.

11. Проводять аспірацію ооцита з розчином для вітрифікації на кінчику піпетки та поміщають біля чорної мітки на кріотоп в мінімальному об'ємі рідини (менше 0,1 мкл). У випадку більше 2 ооцитів формують окрему краплину для кожного.

12. Видаляють надлишок розчину для вітрифікації (рис. 43). Поміщають кінчик піпетки в нижню частину великої краплини розчину для вітрифікації. Пересувають піпетку в горизонтальному напрямку, цим самим розтягнувши краплю та проводять аспірацію надлишку рідини максимально зменшуючи краплю.

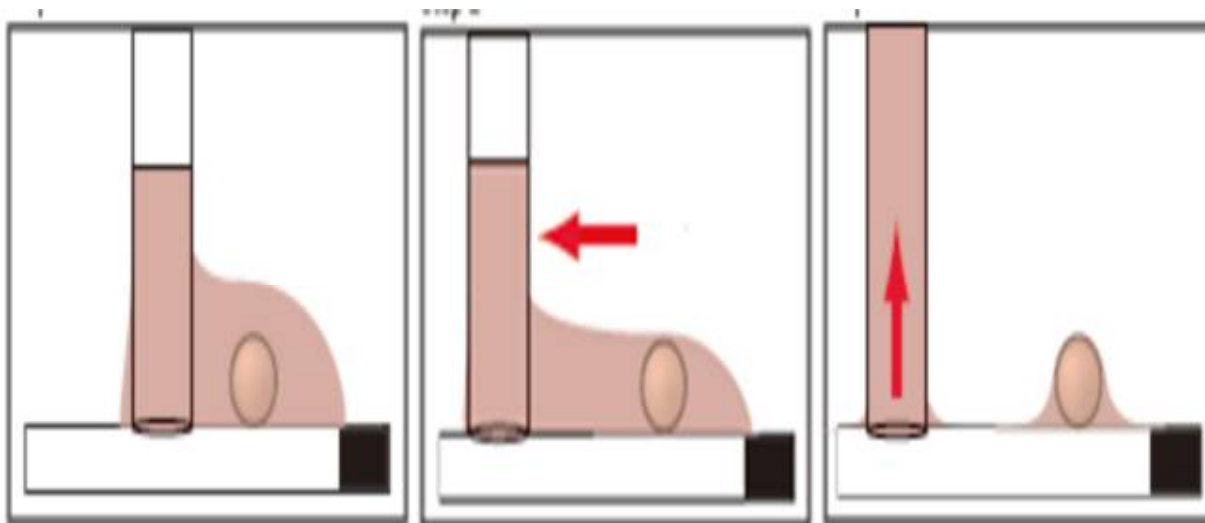
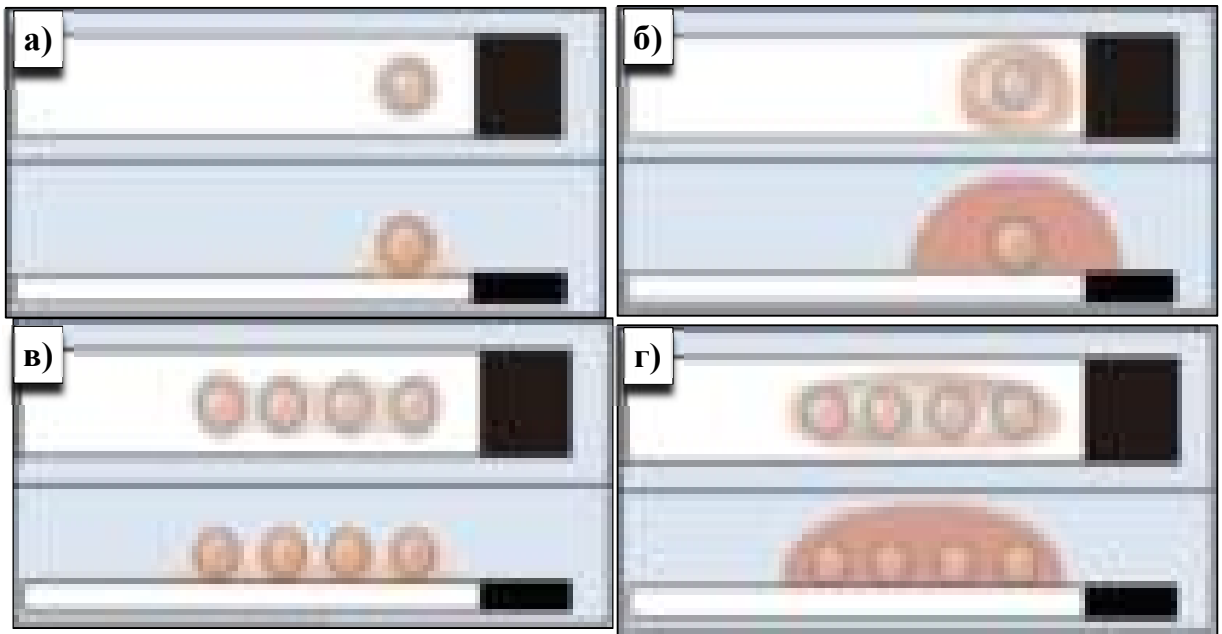


Рис. 42. Етапи видалення надлишку рідини для кріоконсервації з кріотопа

13. Перевіряють під мікроскопом, що ооцит знаходиться на кріотопі з мінімальним об'ємом розчину для вітрифікації (рис. 44).

14. Швидко занурюють кріотоп в свіжий рідкий азот.



**Рис. 43. Варіанти відбору вітрифікаційного розчину:
а) та в) правильний; б), г) не правильний варіант**



Рис. 44. Планшет для розморозки



Дослід 2. РОЗМОРОЖУВАННЯ ЯЙЦЕКЛІТИН ТА ЕМБРІОНІВ

Мета роботи: розглянути основні принципи розморожування яйцеклітин та ембріонів після вітрифікації.

Обладнання та матеріали: набір для розморожування (середовище для розморожування (РС), середовище для еквалібрації (ЕС), середовище для відмивання (ВС), 4-х лунковий планшет), піпетка для денудації ембріонів, вітрифіковані яйцеклітини/ембріони, бінокулярна лупа, напівавтоматичні піпетки.

Хід роботи.

1. Весь процес виконують при кімнатній температурі (25–27 °С).
2. Для яйцеклітин та ембріонів використовують денудуючу піпетку діаметром 140–170 мкм., для ембріонів на стадії бластоцисти – 170–200 мкм.
3. Середовище РС перед використанням розігрівають у термостаті при $t = -37^{\circ}\text{C}$ протягом 3 годин.
4. Середовища ЕС та ВС розігрівають при кімнатній температурі протягом 1 год перед використанням.
5. В лунку № 2 вносять 300 мкл середовища ЕС, в лунки № 3 і 4 вносять по 300 мкл середовища ВС.

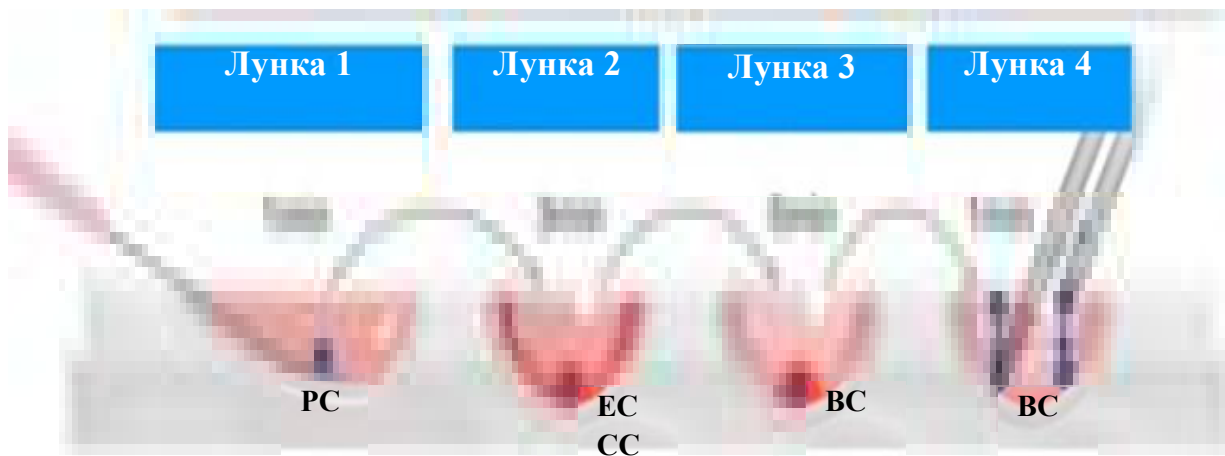


Рис. 45. Схема розморожування яйцеклітин (ембріонів)

6. Готують кріотоп для розморожування (за допомогою пінцета в умовах рідкого азоту знімають захисну кришку).
7. Беруть середовище РС з термостату та вносять його у лунку № 1.
8. Швидко (протягом 1 сек) занурюють кріотоп у лунку № 1, і чекають протягом 1 хв.
9. За допомогою піпетки переносять яйцеклітину/ембріон на дно лунки № 2, і залишають на 3 хвилини.
10. Переносять яйцеклітину/ембріон у лунку № 3 на 5 хвилини.
11. Переносять яйцеклітину/ембріон у лунку № 4 на 1 хвилину.

12. За допомогою піпетки переносять яйцеклітину/ембріон у середовище для культивування ембріонів.



Дослід 3. ЗАМОРОЖУВАННЯ СПЕРМИ КОБЕЛЯ

Мета роботи: розглянути та відпрацювати методику заморожування сперми кобеля.

Обладнання та матеріали: середовище для заморожування сперми кобелів КД 1, спрема, центрифужні пробірки, мікропробірки чи кріосоломинки, Пастерівські піпетки, напівавтоматична піпетка, кріованна, посуд Дюара з азотом, центрифуга.

Хід роботи.

1. Попередньо нагрівають середовище для заморожування сперми кобелів КД1 при кімнатній температурі 2 години.
2. Після розрідження сперми, вимірюють її об'єм та проводять оцінку.
3. Необхідно переконатися, що сперма та середовище для заморожування сперми кобеля КД1 мають кімнатну температуру. Після чого до сперми додають середовище для заморозки у співвідношенні 1:1. Середовище додають до сперми краплями, ретельно перемішують вміст пробірки після додавання кожної порції.
4. Еквілібрувати суміш при кімнатній температурі на 15 хвилин.
5. Фасують розбавлену сперму в кріосоломинки чи мікропробірки і запаковують їх відповідно до настанов виробника. Дуже важливо залишити простір незаповнений сумішшю з розрахунку на її розширення при заморожуванні.
6. Підписують спермодозу згідно журналу.
7. Поміщають соломинки чи мікропробірки на 30 хвилин у холодильник при температурі 4 °С.
8. Розміщують соломинки чи мікропробірки над парами азоту ще на 30 хвилин.
9. Переносять тримачі з спермодозами у рідкий азот (-196 °С) на постійне місце зберігання.



Дослід 4. ЗАМОРОЖУВАННЯ СПЕРМИ БУГАЯ

Мета роботи: розглянути та відпрацювати методику заморожування сперми бугая.

Обладнання та матеріали: середовище для заморожування сперми бугаїв (AndroMed Extender чи Triladyl), сперма, центрифужні пробірки, мікропробірки чи кріосоломинки, Пастерівські піпетки, напівавтоматична піпетка, посуд Дюара з азотом, кріованна, центрифуга.

Хід роботи:

1. Попередньо нагрівають середовище для заморожування сперми бугая при кімнатній температурі 2 години.
2. Відбирають сперму у бугая.

3. Визначають концентрацію.
4. Розбавляють сперму середовищем для заморожування сперми бугаїв 1:1 та центрифугують протягом 15 хв 300g.
5. Супернатант видаляють.
6. Осад розбавляють середовищем для заморожування сперми бугаїв до кінцевої концентрації сперматозоїдів 2×10^8 /мл.
7. Суміш еквілібрують у холодильнику 4 години.
8. Розфасовують суміш у соломинки, запаковують та поміщають в горизонтальному положенні на 10 хвилин безпосередньо над поверхнею рідкого азоту, у його парах.
9. Спермодози переносять у рідкий азот (-196 °C) на постійне місце зберігання.



Дослід 5. РОЗМОРОЖУВАННЯ СПЕРМИ

Мета роботи: розглянути та відпрацювати методику розморожування сперми.

Обладнання та матеріали: доза замороженої сперми, Пастерівська піпетка, водяна баня, середовище для тривалого зберігання сперми, центрифужна пробірка, центрифуга.

Хід роботи.

1. Дістають спермодозу з посуду Дюара та звіряють підпис з даними у журналі.
2. Відігрівають кріосоломинки у водяній бані при температурі 40 °C до повного відтаювання.
3. Відкривають кріосолиминку чи мікропробірку і переносять сперму, що відтаяла у центрифужну пробірку.
4. Піддають зразки сперми центрифугуванню при 300g протягом 10 хвилин для видалення кріопротектора.
5. Супернатант видаляють, а до осаду додають 1–2 мл середовища для тривалого зберігання сперми.
6. Оцінюють життєздатність сперматозоїдів

7.2. ПЕРЕДІМПЛАНТАЦІЙНА ДІАГНОСТИКА

З розвитком методів трансплантації і клонування ембріонів усе більшого значення набуває попередній відбір ембріонів за статтю і особливостям каріотипу. Впровадження методу визначення статі ембріонів перед їх трансплантацією дозволяє цілеспрямовано одержувати бугаїв-трансплантантів для племпідприємств, успішно вирішувати ряд інших практичних питань у тваринництві. Наприклад, для розширеного відтворення стада у товарних господарствах, що спеціалізуються на виробництві молока, бажано одержувати теличок, а в товарних господарствах, що спеціалізуються на виробництві яловичини, – бугайців. Упровадження методів ідентифікації статі в доімплантаційних ембріонів дозволить уникнути одержання безплідних теличок-фримартинів за трансплантації реципієнтові двох ембріонів. З цією метою використовують методи визначення каріотипу зародка (наявність X- і Y-

хромосом) або імуногенетичне визначення наявності спеціальних Н-У-антигенів, що містяться в зародках чоловічої статі. У наш час стать ембріонів великої рогатої худоби, які є на стадії доімплантаційного розвитку, визначають за допомогою цитогенетичного та імунологічного методів.

У цитогенетичному аналізі використовують 3 підходи (рис. 46.):

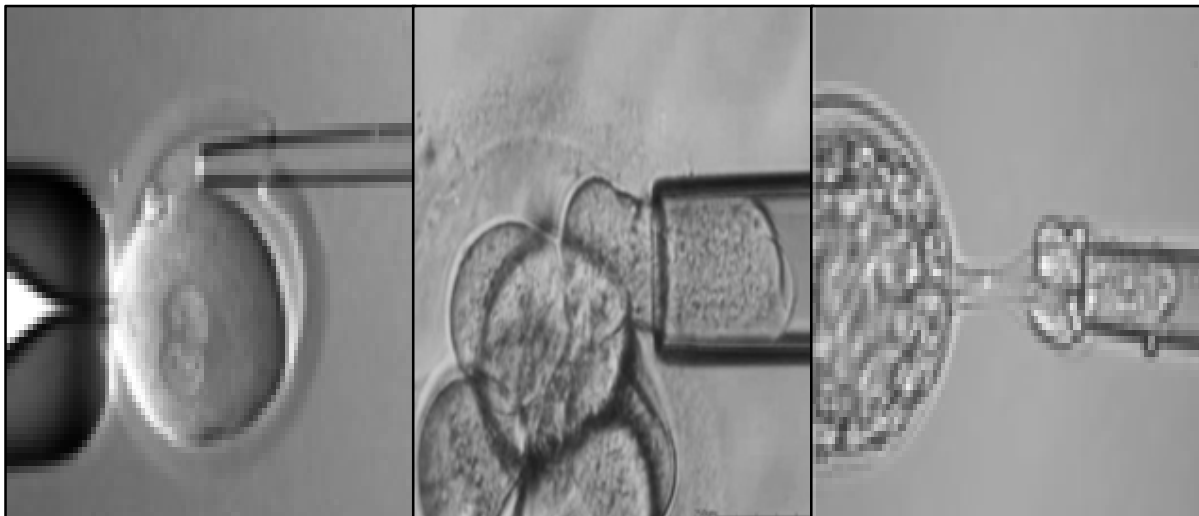


Рис. 46. Біопсія матеріалу для передімплантаційної діагностики: а) полярного тільца; б) бластомера; в) трофектодерми

- дослідження полярних тілець - редуційних клітинних утворень, які виникають при дозріванні яйцеклітини. Вони не грають ніякої ролі в заплідненні і можуть бути вилучені без пошкодження яйцеклітини. Їх тестування дає непряму інформацію про хромосомному наборі яйцеклітини, але не є гарантією її повноцінності і, вже тим більше, не є характеристикою майбутнього ембріона.

- дослідження бластомера - клітини ембріона на 3 добу його розвитку (6-8 клітинна стадія). У цей час клітини ембріона недиференційовані і можуть бути вилучені без наслідків. Їх тестування характеризує власне ембріон, але не виключає можливості мозаїцизму (коли клітини ембріона можуть мати різний хромосомний набір).

- дослідження клітин трофектодерми - клітин ембріонального походження, створюють зовнішню оболонку ембріона. Тестування клітин трофектодерми є характеристикою ембріона і враховує можливість мозаїцизму. Однак дослідження проводиться з 5 доби розвитку ембріона, що вимагає його заморожування на період аналізу (1-3 доби) і використання в подальшому в кріоциклах.

Молекулярно-цитогенетична діагностика є сучасним напрямом у цитогенетиці, мета якої – розробка і вживання нових високоефективних методів аналізу хромосом. Поява молекулярно-цитогенетичних методів відкрила у вивченні хромосом людини і тварин новий вимір – субмікроскопічний рівень.

Метод FISH-аналізу (*Fluorescence in situ hybridization*) дозволяє об'єктивно виявляти індивідуальні хромосоми і їхні окремі ділянки на метафазних

пластинках на основі особливостей їхньої молекулярно-генетичної будови. Об'єктом дослідження в даному разі є особливості нуклеотидного складу конкретної хромосоми або її окремої ділянки. Класичний метод FISH-аналізу заснований на гібридизації відомої за нуклеотидним складом ДНК-проби з ділянкою тестованої хромосоми і з подальшим виявленням результату гібридизації за міткою – флуоресцентним сигналом в очікуваному місці (рис. 47).

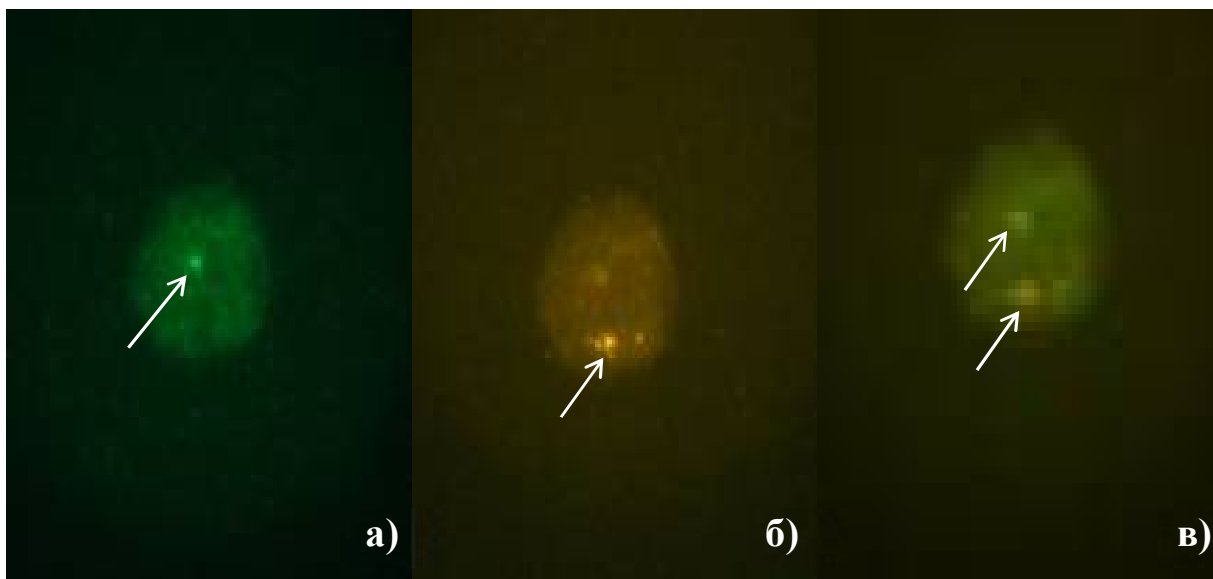


Рис. 47. Аналіз результатів отриманих після FISH: а) зелений світлофільтр (X-сигнал); б) жовтий світлофільтр (Y-сигнал); в) зображення оброблене у програмі FISH vision (сигнали X та Y).

Метод FISH-аналізу перетворився на необхідну аналітичну процедуру в ході цитогенетичного дослідження і став потрібним сьогодні в пре- і постнатальній діагностиці, в моніторингу зигот після штучного запліднення, в процедурі генетичної діагностики (ПГД) передімплантації під час селекції ембріонів з нормальним каріотипом за статтю і так далі. Основні переваги FISH-аналізу:

- висока роздільна здатність (на препаратах можна виявляти ті хромосомні порушення, що не візуалізуються в звичайному світловому мікроскопі);
- точність діагностики (розмір проб може варіювати від 90...100 тис. до декількох мільйонів пар нуклеотидів, так що як мішень можуть бути не лише окремі гени або хромосомні ділянки, а й ціла хромосома).
- FISH-аналіз дозволяє виявити, наприклад, декілька аномальних клітин серед тисяч з нормальним генотипом.

Зазвичай на третю добу життя в лабораторних умовах від декількох ембріонів – 7–10 мікроманіпулятором беруть один з 6–8 бластомерів. Негайно, протягом декількох годин, проводять FISH-діагностику хромосоми або діагностику ДНК однієї клітини за допомогою модифікацій ПЛР-методу. Дуже важливо зазначити, що біопсія ембріону проводиться на тому етапі розвитку,

коли всі його клітини – бластомери – не диференційовані, тотипотентні і тому можливе безпечне заміщення видаленої клітини за подальшого дроблення клітин, що залишилися.

Імунологічні методи. Стать ембріонів може бути встановлена ідентифікацією НУ-антигену за допомогою антитіл до Н-У. Виявлення зв'язування антитіл до Н-У-антигену з чоловічими ембріонами здійснюється двома методами. Характерною рисою першого, більш простого методу, є культивування клітин ембріонів у середовищі з комплементом, що приводить до лізису клітин ембріонів чоловічої статі. Більш практичним є другий метод, що не ушкоджує ембріони, сутність якого полягає в одержанні і використанні вторинних флуоресцентних антитіл до Н-У-антигену. Ефективність цього методу стосовно ембріонів великої рогатої худоби становить 85–87 %.

Перспективним підходом до ранньої діагностики статі ембріонів великої рогатої худоби є створення специфічного для ДНК У-хромосоми молекулярного зонда. Для його одержання виділену з лімфоцитів бугая ДНК розщеплюють за допомогою рестриктаз. На наступному етапі отримані фрагменти ДНК вводять до складу елементів що самостійно реплікуються – плазмід. Для цього очищені молекули плазмідної ДНК розрізають за допомогою тієї ж рестриктази і гібридизують із фрагментом ДНК бугая, що приводить до з'єднання комплементарних липких кінців ДНК бугая і плазміди. Гібридні молекули, що утворилися під дією ферменту лігази і складаються з хромосомної і плазмідної ДНК, вводять в оброблені спеціальним чином бактеріальні клітини з метою їх розмноження – клонування. Потім гібридні молекули ДНК виділяють з бактерій і розрізають знов за допомогою тієї ж рестриктази, виділяючи таким чином клоновані фрагменти хромосомної ДНК – основу зонда. З метою з'ясування наявності комплементарних послідовностей нуклеотидів, виділені з декількох клітин ембріонів великої рогатої худоби ДНК гібридизують з радіоактивно міченим клонованим ДНК-зондом, після чого методом радіоавтографії виявляють ділянки хромосом, що зв'язують зонд.

Можливості використання цього методу розширилися після розробки способів мічення зондів флуоресцентними барвниками, наприклад, біотипом. Дослідження препаратів ембріональних клітин під мікроскопом дозволяє відрізнити чоловічі клітини, ядра яких набувають бурого або чорного забарвлення, від жіночих – ядра не фарбуються. У даний час спосіб визначення статі доімплантаційних ембріонів при наявності або відсутності У-хромосоми за допомогою специфічного для ДНК У-хромосоми зонда є найточнішим. Його ефективність для ембріонів великої рогатої худоби – 100 %, однак цей метод потребує великих затрат часу. Аналіз відомої послідовності ДНК У-хромосоми дозволяє виявити також деякі хромосомні порушення, наприклад, наявність у клітинах ембріона двох У-хромосом.

Нещодавно було розроблено новий ефективний спосіб відбору ембріонів великої рогатої худоби за статтю перед їх трансплантацією із застосуванням полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), що забезпечує ампліфікацію специфічних повторюваних послідовностей ДНК У-хромосоми (потім ДНК піддають електрофорезу в 2-процентному агарозному гелі, який зафарбовують

бромистим етидієм і досліджують під ультрафіолетовим світлом). ПЛР дозволяє за єдиним бластомером, взятим шляхом біопсії, встановити стать доімплантаційного ембріона з дуже високою точністю (95,4 %) за відносно короткий час. Ця методика може бути застосована для досить великої кількості ембріонів; біопсія клітини за допомогою мікроманіпуляторів не впливає на здатність ембріонів до розвитку *in vitro* і ступінь їх приживлюваності порівняно з контрольними ембріонами.



Дослід 6. ПЕРЕДІМПЛАНТАЦІЙНА ДІАГНОСТИКА МЕТОДОМ FISH

Мета роботи: розглянути основні принципи передімплантаційного дослідження ембріонів FISH-методом.

Обладнання та матеріали: Tween-20, соляна кислота, фосфатно-буферний розчин, 70%-спирт, 90%-спирт, 100%-спирт, дистильована вода, ДНК-зонди, SSC-буфер, ядерний барвник – DAPI, предметні скельця, покривні скельця, хімічний олівець, гумовий клей, лак, кювети Шиффердекера, автоматичні піпетки, фазово-контрастний мікроскоп, флуоресцентний мікроскоп, водяна баня, гібридизатор.

Хід роботи.

1. Готують буфер для лізису бластомера 0,2 % Tween-20 в 0,01 М соляній кислоті (рН=2,0).
2. Роблять невелике коло (приблизно 5мм) на нижній поверхні предметного скельця та етикетують кожну пробу. Для кожного бластомера використовують окреме скельце з індивідуальною етикеткою, що відповідають кількості і порядковому номеру ембріона.
3. Наносять невелику кількість буфера для лізису всередину кола.
4. Переносять бластомер у буфер для лізису, при чому, у разі необхідності, додають буфер до повного розчинення цитоплазми.
5. Слідкують, щоб ядро залишалось у колі, якщо у бластомері немає ядра або їх більше ніж одне проводять біопсію іншої бластомера.
6. Залишають скельця на повітрі при кімнатній температурі до повного висихання зразка.
7. Розморожують зонди, шейкують і центрифугують 5 хв при 2000 об/хв. Відбирають необхідний для дослідження об'єм.
8. Попередньо промивають зафіксовані ядра використовуючи фосфатно-буферний розчин протягом 5 хв при кімнатній температурі.
9. Зразки промивають двічі у стерильній дистильованій воді.
10. Дегідратують скельця у етанолі висхідної концентрації (70 %, 90 %, 100 %) по 2 хвилини в кожному при кімнатній температурі, залишають сушити на повітрі.
11. Фіксують положення ядра всередині кола за допомогою фазово-контрастного мікроскопа.
12. Повторно дегідратують в 100 % етанолі протягом 2 хв. при кімнатній температурі, після чого висушують на повітрі.
13. На помічену ділянку скельця з ядром наносять 2 мкл зондів і

покривають покривним скельцем 9×9 № 0.

14. На краї покривного скельця наносять гумовий клей.
15. Проби поміщають у гібридизатор. Денатурують при 75 °С протягом 5хв., потім гібридизують протягом 16–20год в зволоженій камері при 37 °С.
16. Після гібридизації обережно знімають покривні скельця.
17. Промивають предметні скельця в 0,4×SSC-буфері у кюветі Шиффердекера протягом 5 хв. при температурі 71 °С.
18. Після чого промивають скельця в 4×SSC-буфері на 0,05 Tween-20 при кімнатній температурі.
19. Промивають проби у 2 кюветах з фосфатно-буферним розчином по 2 хв. при кімнатній температурі, після чого зливають рідину зі скельця.
20. На пробу наносять 6 мкл DAPI і покривають покривним скельцем 22×22мм №0.
21. Закріплюють край покривного скла лаком.
22. Аналізують зображення за допомогою флуоресцентного мікроскопа.

7.3. ЕМБРІОНАЛЬНІ СТОВБУРОВІ КЛІТИНИ

Ембріональні стовбурові клітини (ЕСК) – це нетрансформовані клітини, отримані з внутрішньої клітинної маси (ВКМ) доімплантаційного зародка. Вони зберігають плюрипотентний стан та здатність давати функціональні, диференційовані типи клітин *in vitro* та *in vivo*. Термін «ембріональна плюрипотентна стовбурова клітина» належить Лерою Стівену, який при дослідженні дії тютюнової смоли на частоту розвитку пухлин звернув увагу на спонтанне виникнення тестикулярної тератокарциноми у лінійних мишей. Виділення ліній ЕСК можливе лише на певних стадіях ембріогенезу. Тотіпотентними, з точки зору можливості розвитку життєздатного ембріона з зародковими оболонками та плацентою, є зигота та бластомери, що виникають в процесі дроблення. Втрата тотальної потенції зародкових клітин розпочинається на стадії пізньої морули, коли подальше комітування бластомерів залежить від їх розміщення. Бластомери ранньої морули зберігають тотіпотентність, оскільки експериментальні маніпуляції із зміною їх локалізації, не перешкоджають розвитку повноцінного плоду.

Нині існує декілька способів отримання ЕСК. Перший – отримання із ВКМ раннього ембріона на стадіях морули-бластоцисти; другий – отримання ЕСК із ембріональних карцином; третій – отримання примордіальних зародкових клітин із статевого горбика ембріона.

Клітинні лінії культивують на фідері з ембріональних фібробластів миші, оскільки останні виділяють чинники, що здатні запобігати диференціюванню. Пізніше було встановлено, що одним з таких факторів є LIF- цитокін родини ІІ-6, який взаємодіє з LIF-рецептором, що включає дві субодиниці *gp 130* та *gp 190*. Зв'язування LIF з його рецептором викликає активацію Jak-тирозин кінази, яка фосфорилує STAT3.

Значну роль при отриманні ЕСК має стан ембріонів. За даними Reubinoff, лише 50 % ВКМ можуть давати каріотипічно нормальні клітинні лінії.

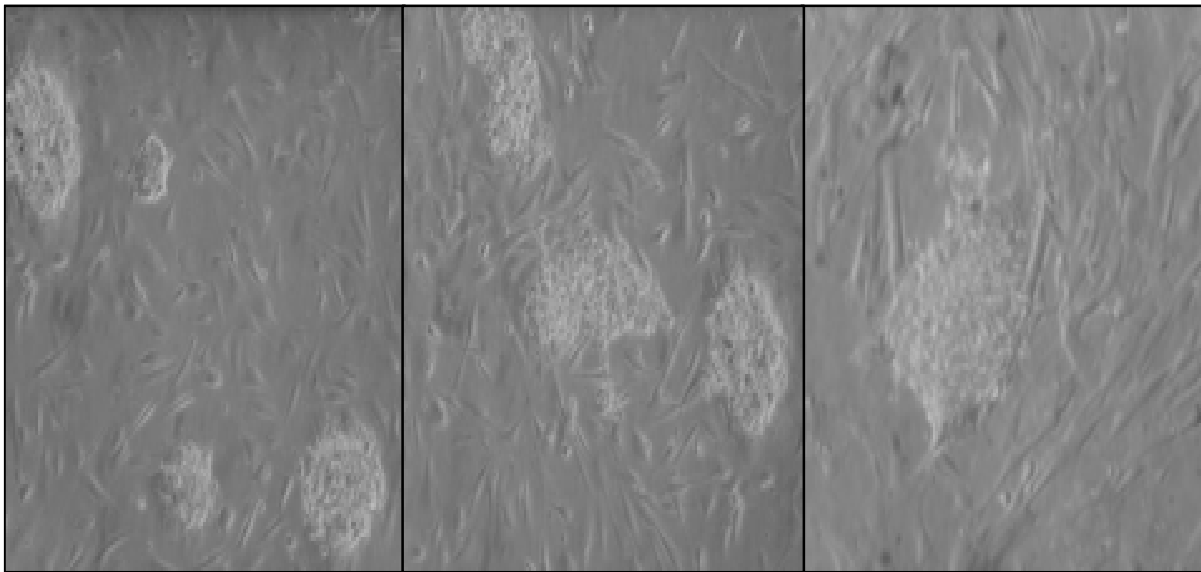


Рис. 48. Колонії ембріональних стовбурових клітин на фідерному шарі

Дослід 7. ОТРИМАННЯ ЕМБРІОНАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН

Мета роботи: розглянути основні принципи отримання та культивування ембріональних стовбурових клітин.

Обладнання та матеріали: середовище для культивування ЕСК, чашки Петрі, фідерний шар, ембріони свиней на стадії бластоцисти, фосфатно-буферний розчин, 0,5 %-й розчин пронази, піпетка для денудації ембріонів, бінокулярна лупа, напівавтоматичні піпетки.

Хід роботи.

1. Готують крапельну систему для дисоціації клітин ембріону згідно схеми (рис. 46).
2. Після приготування даної системи переносять ембріони з середовища NCSU–23 в першу краплину PBS для відмивання від середовища.
3. Для зняття зони пелюциду поміщають ембріон в краплину 0,5 %-го розчину пронази. Після її розчинення ембріон негайно переносять послідовно в 3 краплини PBS з метою відмивання від попереднього розчину.
4. За допомогою мікропіпетки з $d=40-60$ мкм шляхом піпетування розділяють внутрішню клітинну масу на кластери клітин.
5. Переносять кластери у чашки Петрі із заздалегідь приготовленим фідерним шаром та середовищем для культивування ЕСК.
6. Культивування здійснюють в CO_2 -інкубаторі, при $t=37^\circ\text{C}$ та концентрації $\text{CO}_2=5\%$.

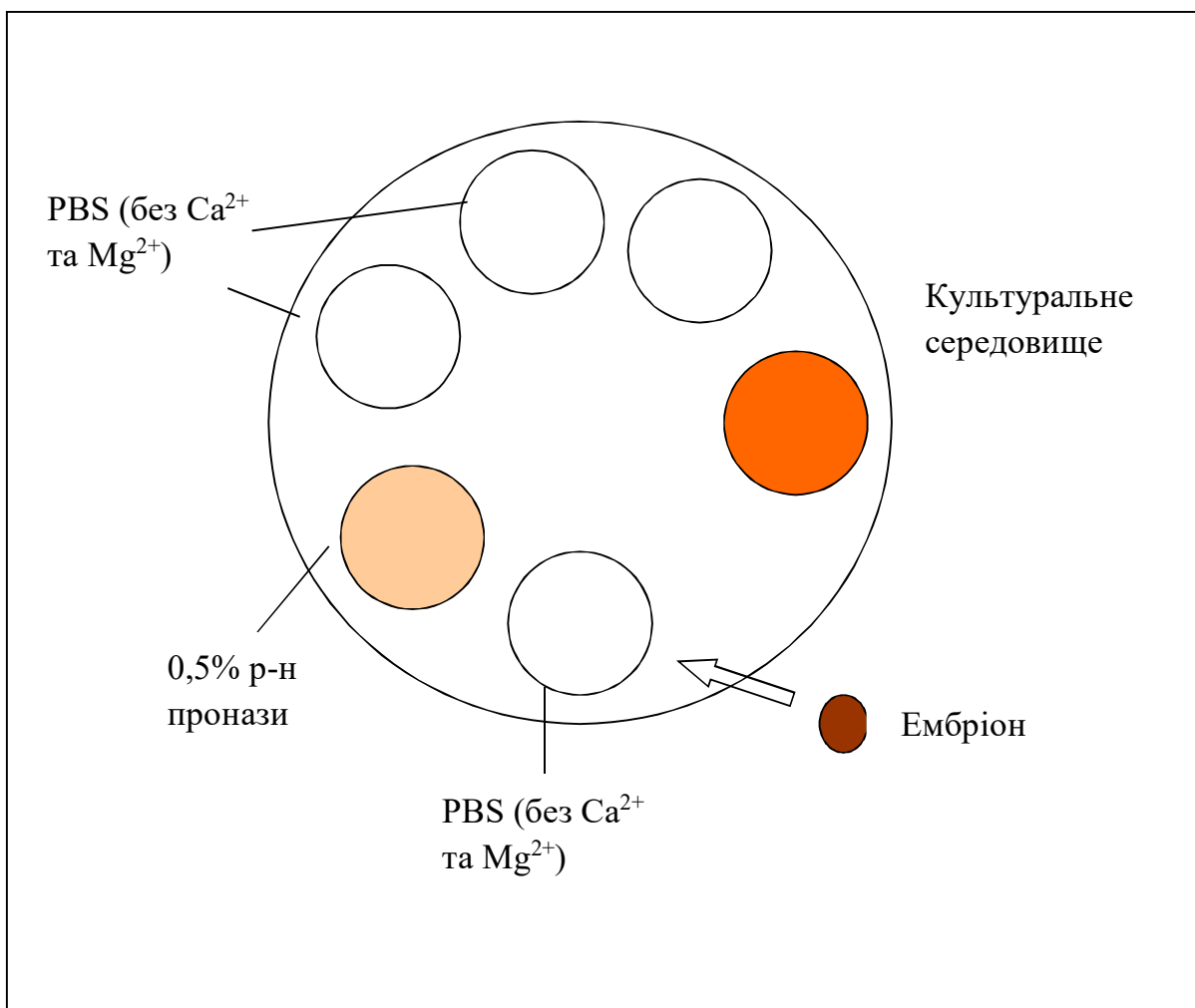


Рис. 49. Крапельна система для дисоціації клітин ембріона.

Таблиця 11. Хімічний склад середовища для отримання колоній ЕСК свиней

№ п/п	Компоненти
1	DMEM (оптимізований для культивування ЕСК)–78 %;
2	ЗЕС–20 %;
3	Глютамакс–1 %;
4	Незамінні амінокислоти–1 %;
5	bFGF–5 нг/см ³ ;
6	β-меркаптоетанол–0,055 мМ;
7	hLIF–20 нг/см ³ ;
8	Антибіотик-антимікотик– 100 мкл/см ³



Питання для самоконтролю:

1. Що найчастіше піддають кріоконсервуванню у ембріології?
2. Які види кріоконсервування ви знаєте?
3. Які види кріопротекторів розрізняють?
4. Який вид попереднього відбіру сперматозоїдів за статтю є найбільш ефективним?
5. Який матеріал найчастіше відбирають для передімплантаційної генетичної діагностики?
6. Які методи передімплантаційної генетичної діагностики існують?
7. Що таке ембріональні стовбурові клітини?
8. Як отримують ембріональні стовбурові клітини?

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Буркат В.П. Методики наукових досліджень із селекції, генетики та біотехнології у тваринництві / В.П. Буркат, М.Я. Єфіменко, Є.М. Рясенко, М.І. Бащенко [та ін.] // Науковий збірник, К.: Аграрна наука, 2005. – 248 с.
2. Ветеринарне акушерство, гінекологія та біотехнологія відтворення тварин з основами андрології. / За редакцією В. А. Яблонського та С. П. Хомина. Підручник. – Вінниця: Нова Книга, 2006 – 592 с.
3. Горбунов Л.В. Кріоконсервування ембріонів ссавців при пасивному охолодженні в горловині посудини Дьюара / Горбунов Л.В., Саліна А.С., Данильченко В.В.// Науково-технічний бюлетень ІТ НААН. 2013 - №110. – ст.25-33
4. Джакупов И.Т. Ветеринарное акушерство и гинекология. Учебное пособие. – Астана: Казахский агротехнический университет им. С. Сейфуллина, 2011 –167 с.
5. Джамалова Г.А. Биотехнология животных – Алмата: Маматай, 2004 - 304 с.
6. Мазуркевич А.Й., Ковпак В. В., Данілов В. Б. Клітинні технології у ветеринарній медицині: навч.посібник для студ. вищ. навч. закладів – К.: КОМПРИНТ – 2014. – 132с.
7. Новак В.П. Цитологія, гістологія, ембріологія: Навчальний посібник / В.П.Новак, А.П. Мельниченко// БлаЦерква, 2005. -256ст.
8. Оценка качества ооцитов и эмбрионов крупного рогатого скота: учеб.-метод. пособие / Л.В. Голубец и др. – Гродно : ГГАУ, 2011 – 68 с.
- a. П. А. Троцький Кріоконсервування ооцит-кумуляусних комплексів як метод збереження різноманіття сільськогосподарських тварин / П. А. Троцький // Розведення і генетика тварин. – 2010. – № 44.- ст.200-203.
- b. Рубан С. Ю. Нові підходи щодо використання сексованої сперми бугаїв у селекційному процесі / С. Ю. Рубан, С. І. Ковтун, К. В. Копилов, О. В. Дуванов// Розведення і генетика тварин. – 2010. – № 44. – ст.167-170
9. Студенцов А.П. Ветеринарное акушерство, гинекология и биотехника размножения / А.П. Студенцов, В.С. Шипилов, В.Я. Никитин, М.Г. Миролубов [и др.] // М.: Колос, 2000. – 494 с.
10. Хохлов А, М., Решетников В. И., Ячин В. М., Принцип построения и описание комплекта микроманипулятора КМ-1, «Цитология», 1971, т. 13, № 4.
11. Целищев Л.И. Практическая ветеринарная андрология / Л.И. Целищев // М.: Колос, 1982. – 176 с.
12. Цитологія, загальна гістологія та ембріологія: Практикум: Навч. посібник / В. К. Напханюк, В. А. Кузьменко, С. П. Заярна, О. А. Ульянцева; За ред. В. К. Напханюка. — Одеса: Одес. держ. мед. ун-т, 2002. — 218 с.
13. Шергин Н.П. Биохимия сперматозоидов сельскохозяйственных животных / Н.П. Шергин // М.: Колос, 1967. – 240 с.

14. Шипилов В.С. Практикум по акушерству, гинекологии и искусственному осеменению сельскохозяйственных животных / В.С. Шипилов, Г.В. Зверева, И.И. Родин, В.Я. Никитин // М.: Агропромиздат, 1988. – 335 с.
15. Яблонський В.А. Біотехнологія відтворення тварин / В.А. Яблонський // К.: Арістей, 2004. – 296 с.
16. Яблонський В.А. Ветеринарне акушерство, гінекологія та біотехнологія відтворення тварин з основами андрології / А.В. Яблонський, С.П. Хомин, Г.М. Калиновський, Г.Г. Харута [та ін.] // Вінниця: Нова книга, 2008. – 600 с.
17. Яблонський В.А. Практичне акушерство, гінекологія та біотехнологія відтворення тварин з основами андрології / В.А. Яблонський // К.: Мета, 2002. – 319 с.
18. A.N. Md. Aminoor Rahman, R.B. Abdullah and W.E. Wan-Khadijah, 2008. Recovery and Grading of Goat Oocytes with Special Reference to Laparoscopic Ovum Pick-up Technique: A Review. *Biotechnology*, 7: 612-622
19. Agarwal A., Gupta S., Sharma R. (2016) Hypoosmotic Swelling Test (HOS). *Andrological Evaluation of Male Infertility*. pp 93-96
20. Ashwood-Smith, M.J. (1986) The cryopreservation of human embryos. *Human Reproduction* 1, 319–332.
21. Crowe J et al. (1990) Are freezing and dehydration the same vectors? A comparison of modes of interaction of stabilising solutes with biomolecules. *Cryobiology* 27, 219- 231.
 - a. Culture of animal cells. A manual of basic technique // Edited by R.Ian. Freshney John Wiley 2005 – 642p.
22. Fahy G et al. (1984) Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology* 21, 407-426.
23. Fierro-González J. C. Cadherin-dependent filopodia control preimplantation embryo compaction / J. C. Fierro-González, M. D. White, J. C. Silva & N. Plachta // *Nature cell biology* - 2013. - №15. – P.1424–1433.
24. Franks F et al. (1977) Polymer cryoprotectants in the preservation of biological structure. 1. Low temperature states of aqueous solutions of hydrophilic polymers. *J of Microscopy* 110, 223-228.
25. <https://fertility.coopersurgical.com/ru/%d0%b2%d1%81%d1%8f-%d0%bf%d1%80%d0%be%d0%b4%d1%83%d0%ba%d1%86%d0%b8%d1%8f/#>
26. Jeyendran RS¹, Van der Ven HH, Zaneveld LJ. The hypoosmotic swelling test: an update. *Arch Androl.* 1992 Sep-Oct;29(2):105-16.
27. Karger S, Geiser B, Grau M, Burfeind O, Heuwieser W, Arlt SP. Prognostic value of a pre-freeze hypo-osmotic swelling test on the post-thaw quality of dog semen. *Anim Reprod Sci.* 2016;166:141-7.
28. Kishikawa H., Tateno H., Yanagimachi R. Chromosome analysis of BALB/c mouse spermatozoa with normal and abnormal head morphology // *Biol. Reprod.* 1999. V. 61. P. 809–812
29. Корас М. J., *Micromanipulators: principles of design, operation and application*, в кн.: *Physical techniques in biological research*, v. 5, N. Y. — L., 1964; eI-Badry

- H. M., *Micromanipulators and micromanipulation*, N. Y. — Vienna, 1963.
30. Lovelock J, (1954). The protective action of neutral solutes against haemolysis by freezing and thawing. *Biochem J* 56, 265-270.
 31. Mohammadi G., Mahdion H. Evaluation of membrane integrity of bull frozen-thawed sperm using water and hypo osmotic swelling test *Bas.J.Vet.Res.Vol.17, No.1, 2018. 38-51.*
 32. Rall W (1987) Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Cryobiology* 24, 387-402.
 33. *Stem Cells Handdbook/Edited by Stewart Seel.-Humana Pres Inc. Totawa, N.J.,2002 -256p.*
 34. Tao J. The neglected morula/compact stage embryo transfer / J. Tao, R. Tamis, K. Fink, B. Williams, T. Nelson-White, R../. *Craig // Hum Reprod. -2002. - № 17(6). – P.1513-8.*
 35. Wileman B. W., Thomson D. U., Reinhardt C. D., Renter D. G. Analysis of modern technologies commonly used in beef cattle production: Conventional beef production versus nonconventional production using meta-analysis. *Journal of Animal Science. 2009. – Vol. 87, № 10. – P. 3418–3426.*