

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ РОЗВЕДЕННЯ І ГЕНЕТИКИ ТВАРИН
ІМЕНІ М.В. ЗУБЦЯ**

**С. І. Ковтун, О. В. Щербак, П. А. Троцький, В. Ф. Стаховський,
О. Ю. Лизогуб, О. І. Метлицька, С. О. Сідашова**

**ОРГАНІЗАЦІЯ ПРОВЕДЕННЯ
БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ У ТВАРИННИЦТВІ
(методичні рекомендації)**

Чубинське, 2025

Рекомендовано до друку вченою радою Інституту розведення і генетики тварин імені
М.В. Зубця НААН (протокол № 8 від 26 червня 2025 р.).

Рецензенти:

Дзіцюк Валентина Валентинівна, д. с.-г. наук, завідувачка лабораторії генетики тварин ІРГТ ім. М.В. Зубця НААН;

Войтенко Світлана Леонідівна, д. с.-г. наук, провідний науковий співробітник лабораторії наукових досліджень з питань інтелектуальної власності та маркетингу інновацій Інституту свинарства і АПВ НААН;

Шаран Микола Михайлович, д. с.-г. наук, заступник директора з інноваційно-наукової діяльності Інституту біології тварин НААН.

Автори:

С. І. Ковтун, д. с.-г. н., професор, академік НААН, заступниця директора з наукової роботи ІРГТ ім. М.В. Зубця НААН;

О. В. Щербак, к. с.-г. н., ст. н. с., завідувачка лабораторії біотехнології відтворення тварин ІРГТ ім. М.В. Зубця НААН;

П. А. Троцький, к. с.-г. н., ст. н. с., ст. н. с. лабораторії біотехнології відтворення тварин ІРГТ ім. М.В. Зубця НААН;

В. Ф. Стаховський, к. с.-г. н., пров. н. с. лабораторії біотехнології відтворення тварин ІРГТ ім. М.В. Зубця НААН;

О. Ю. Лизогуб, аспірантка ІРГТ ім. М.В. Зубця НААН, завідувачка ембріологічної лабораторії клініки «IVMED»;

О. І. Метлицька, д. с.-г. н., ст. н. с., головний судовий експерт відділу біологічних досліджень та обліку Полтавського науково-дослідного експертно-криміналістичного центру МВС України;

С. О. Сідашова, к. с.-г. н., біотехнолог-консультант, сертифікований експерт-дорадник Національної асоціації с.-г. дорадчих служб України.

ISBN 978-617-8739-07-2

**Ковтун С. І., Щербак О. В., Троцький П. А., Стаховський В. Ф.,
К-56 Лизогуб О. Ю., Метлицька О. І., Сідашова С. О.** Організація проведення біотехнологічних досліджень у тваринництві (методичні рекомендації). Чубинське
: ІРГТ ім. М.В. Зубця НААН, 2025. 123 с.

У рекомендаціях узагальнено методичні підходи щодо ряду біотехнологічних та лабораторних методів, спрямованих на відтворювальну здатність корів-донорів. Узагальнено лабораторні методи оцінки якості сперми кнурів, запропоновано нові методи оцінки їх життєздатності.

Враховуючи подібність описаних експериментальних біотехнологічних досліджень для ссавців, рекомендовано для спеціалістів з біотехнології відтворення с.-г. тварин, науковців, викладачів, студентів, аспірантів та докторантів закладів вищої освіти, ембріологів, техніків з трансплантації ембріонів людини та тварин.

ISBN 978-617-8739-07-2

УДК 636.082.4:57.089.3:606

© С. І. Ковтун, О. В. Щербак, П. А. Троцький, В. Ф. Стаховський, О. Ю. Лизогуб,
О. І. Метлицька, С. О. Сідашова, 2025 р.

© Інститут розведення і генетики тварин імені М.В. Зубця НААН, 2025 р.

© Видавництво Ліра-К, 2025 р.

ЗМІСТ

Розділ 1. ФОРМУВАННЯ ГРУПИ КОРІВ-ДОНОРІВ ДЛЯ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ ЕМБРІОНІВ.....	6
1.1. Стан трансплантації ембріонів великої рогатої худоби та чинники, що впливають на її результативність.....	8
1.2. Контроль за перебігом отелень.....	10
1.3. Лабораторні методи контролю за перебігом інволюції матки.....	12
1.4. Діагностика прихованого ендометриту.....	13
1.5. Діагностика функціональної активності яєчників.....	15
1.6. Добір корів-донорів ембріонів.....	17
1.7. Одержання та трансплантація ембріонів для збільшення чисельності поголів'я.....	17
Висновки	23
Використані літературні джерела	24
Розділ 2. ДОБІР КОРІВ ЗА ПРОЯВОМ БІЛАТЕРАЛЬНИХ ОВУЛЯЦІЙ ДЛЯ РОЗШИРЕНОГО ВІДТВОРЕННЯ СТАДА	26
2.1. Поширеність білатеральних овуляцій серед корів молочних порід.....	27
2.2. Вплив генетичних і паратипових факторів на поширення білатеральних овуляцій у корів молочних порід.....	30
Висновки.....	34
Використані літературні джерела	34
Розділ 3. ОРГАНІЗАЦІЯ ТРЕНІНГУ З ДІАГНОСТИКИ СТАНУ ЯЄЧНИКІВ КОРІВ І ТЕЛИЦЬ ЗА ТРАНСПЛАНТАЦІЇ ЕМБРІОНІВ.....	36
3.1. Значення диференційної діагностики стану яєчників корів та телиць у програмах управління репродукцією молочного стада.....	37
3.2. Науково-методологічне обґрунтування методики візуалізації результатів ректальної діагностики функціонального стану яєчників корів і телиць.....	39
3.3. Методичний підхід до організації тренінгів із засвоєння методу візуалізації результатів ректальної діагностики яєчників корів та телиць.....	43
3.4. Підготовка до проведення процедур ректального Дослідження статевих органів корів та телиць.....	46

3.5. Візуалізація результатів диференційної діагностики Активного жовтого тіла яєчників телиць на 7–8 день статевого циклу.....	48
3.6. Візуалізація результатів диференційної діагностики жовтого тіла яєчників на 10–13 день статевого циклу телиць.....	54
3.7. Візуалізація результатів диференційної діагностики у телиць жовтого тіла яєчників у стадії лізису на 15–17 день статевого циклу.....	55
3.8. Візуалізація результатів диференційної діагностики стану яєчників корів та телиць в 0-й день статевого циклу за унілатеральної овуляції.....	56
3.9. Візуалізація результатів пальпаторної діагностики стану яєчників корів або телиць донорів ембріонів у контрольні терміни індукованого статевого циклу (0-й і 7–8 дні). Оцінка реакції утворення жовтих тіл і прогноз виходу ембріонів.....	60
Висновки.....	63
Використані літературні джерела.....	63
Розділ 4. ОЦІНКА ЯКОСТІ ПРИЗНАЧЕНОЇ ДО КРІОКОНСЕРВАЦІЇ СПЕРМОПРОДУКЦІЇ ТА СТРУКТУРНОЇ ЦІЛІСНОСТІ СПЕРМАТОЗОЇДІВ КНУРІВ.....	66
4.1. Методичні підходи до кріоконсервації сперми кнурів.....	66
4.2. Лабораторні методи оцінки якості сперми.....	68
4.2.1. Визначення концентрації сперматозоїдів за допомогою камери Горяєва.....	68
4.2.2. Визначення рухливості сперматозоїдів.....	71
4.2.3. Визначення тривалості виживаності сперматозоїдів поза організмом самця.....	72
4.2.4. Прискорений метод визначення виживаності сперматозоїдів (терморезистентна проба).....	75
4.2.5. Тест на термостресстійкість сперматозоїдів.....	75
4.2.6. Визначення структурної цілісності деконсервованих сперматозоїдів за допомогою гіпоосмотичного тесту.....	76
4.3. Практичне застосування лабораторних методів оцінки якості сперми кнурів.....	79
Додаток.....	85
Використані літературні джерела	86

Розділ 5. ПІДГОТОВКА ДЕКОНСЕРВОВАНИХ СПЕРМАТОЗОЇДІВ КНУРІВ ДО ЗАПЛІДНЕННЯ IN VITRO.....	89
5.1. Вилучення сперматозоїдів із еякуляту людини як модель для досліджень гамет ссавців.....	91
5.2. Використання для запліднення in vitro сперматозоїдів, отриманих різними методами.....	96
5.3. Вплив середовищ для флотації на деконсервовані еякульовані сперматозоїди кнура.....	99
Висновки.....	102
Використані літературні джерела	102
Розділ 6. ОПТИМІЗАЦІЯ ПІДГОТОВКИ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ СПЕРМАТОЗОЇДІВ КНУРІВ ДО ШТУЧНОГО ЗАПЛІДНЕННЯ.....	105
6.1. Стан збереження генофонду порід свиней та шляхи його вирішення.....	106
6.2. Використання методу ICSI для одержання ембріонів in vitro.....	108
6.3. Вплив середовищ з ПВП та ПВА на деконсервовані еякульовані сперматозоїди кнура та їх підготовки до запліднення.....	111
Висновки.....	118
Використані літературні джерела	119
Перелік умовних позначень, символів, одиниць, скорочень і термінів.....	122

Матеріали цього розділу автори присвячують світлій пам'яті
колег, кандидатів с.-г. наук,
визнаних фахівців з відтворення великої рогатої худоби
Григорія ШАРАПИ і
Степана ДЕМЧУКА

Memoria lucida...

Розділ 1.

ФОРМУВАННЯ ГРУПИ КОРІВ-ДОНОРІВ ДЛЯ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ ЕМБРІОНІВ

Низька природна плодючість великої рогатої худоби, мала кількість нащадків обмежують можливості створення нових порід та стад високопродуктивних корів. Основним методом удосконалення існуючих порід великої рогатої худоби є штучне осіменіння корів з використанням спермопродукції високопродуктивних бугаїв. Прискорення процесу тиражування корів з високими параметрами продуктивності забезпечує біотехнологічний метод трансплантації ембріонів. Науковці стверджують: отримати племінне стадо за рік і суттєво покращити продуктивність худоби можливо завдяки застосуванню трансплантації ембріонів великої рогатої худоби. Нова система селекційно-племінної роботи, що ґрунтується на біотехнологічних методах розмноження тварин, дає змогу максимально використовувати потенційні резерви репродуктивної функції, що не реалізуються за природного розмноження.

Із запровадженням у практику тваринництва методу штучного осіменіння стало можливим осіменяти за рік спермою одного бугая близько 100 тисяч корів і телиць. Однак за все своє життя корова народжує не більше 6–10 телят, і з них лише половина телички. Метод трансплантації ембріонів значно розширює ці рамки, дозволяючи одержувати від однієї високопродуктивної корови 100 і більше телят впродовж року.

Трансплантація ембріонів – це біотехнологічний метод відтво-

рення шляхом пересаджування ембріонів, отриманих від генетично високоцінних корів-донорів менш цінним гінекологічно здоровим телицям-реципієнтам. Він включає цілий комплекс клінічних, біотехнологічних та лабораторних методів, спрямованих на викликання суперовуляції у донорів, їх осіменіння, вимивання у них ембріонів та пересаджування їх реципієнтам, одержання від них телят-трансплантантів, які поєднують у собі високі племінні та продуктивні якості донора та плідника.

Ефективне відтворення маточного поголів'я є базовою складовою рентабельності молочного скотарства. За останні роки в молочному скотарстві відзначається суттєвий ріст продуктивності дійних стад, однак показники відтворення мають сталу тенденцію до зниження.

Ефективність застосування методу трансплантації ембріонів значною мірою залежить від клінічного та фізіологічного стану корів, їх здатності реагувати на екзогенні гонадотропіни та виділяти достатню кількість якісних зародків. Дослідженість анатомо-фізіологічних особливостей репродуктивної функції корів і телиць є фундаментальною засадою управління відтворенням стада і, врешті-решт, підвищення рентабельності всієї галузі скотарства.

На сучасному фоні суттєвих досягнень трансплантації у світі ембріонів великої рогатої худоби, як складової частини біотехнології репродукції, залишаються невирішеними питання вдосконалення методик добору тварин з технологічно високими та стабільними властивостями до продукування ранніх якісних ембріонів.

Сьогодні, не зважаючи на значні досягнення репродуктивних біотехнологій великої рогатої худоби, постає гостра проблема постійного зниження фертильності маточного поголів'я в усіх країнах з розвиненим молочним скотарством.

Найбільшого практичного використання серед біотехнологічних методів, пов'язаних з маніпуляціями ембріонів, набула їх трансплантація телицям-реципієнтам. Стримувальними чинниками інтенсифікації методу є недостатня кількість морфологічно придатних до трансплантації ембріонів, незначна або відсутня реакція суперовуляції у корів-донорів під час її стимуляції екзогенними гонадотропними гормонами. Тому удосконалення способів добору корів, у якості донорів ембріонів є актуальною, оскільки дає змогу підвищити економічну та селекційну ефективність методу трансплантації ембріонів.

1.1. Стан трансплантації ембріонів великої рогатої худоби та чинники, що впливають на її результативність

Цільовими параметрами стратегії розвитку тваринництва України до 2030 року визначено нарощування чисельності корів до 2,6 млн голів та істотне підвищення їх продуктивності до 7 600 кг у сільсько-господарських підприємствах («Тваринництво України: стан, проблеми, шляхи розвитку (1991–2017–2030 рр.)», 2017). Для досягнення таких показників, в тому числі завдяки власному відтворенню генетично цінних корів, трансплантації ембріонів необхідно надати перевагу та використовувати як один із шляхів збільшення високопродуктивного поголів'я.

Зважаючи на значну світову тенденцію поширення біотехнології трансплантації ембріонів великої рогатої худоби в країнах з розвинутим тваринництвом за останні роки, актуальність проблеми вивчення чинників, що впливають на результативність методики нехірургічного трансферу ембріонів реципієнтам суттєво зростає.

Обсяги виробництва ембріонів великої рогатої худоби у світі щорічно сягають у Європі – 140 тис. шт., Японія – 112 тис. шт., США – 255 тис. шт., Канада – 65 тис. шт., Австралія – 7 тис. шт., Африка – 4 тис. шт. Продаж ембріонів у світі на рівні 25 тис. шт. у рік. Найбільш вдалим прикладом державного підходу щодо реформування молочного скотарства є Бразилія. На зростання частки молочних корів голштинської породи у 200-мільйонному поголів'ї великої рогатої худоби переважно м'ясного напрямку, починаючи з 2005 року спрямована діяльність з ембріотрансплантації фірми «In vitro Brazil». Наразі фірма налічує 37 лабораторій, з яких 17 є філіалами за межами країни. Із щорічного одержання в останні роки 380 тис. ембріонів, 92% сформовані поза організмом і за собівартістю дешевші наполовину, порівняно із вилученими від корів-донорів. Імпорт нетелей вважається нераціональним і занадто дорогим для країни, яка бореться з бідністю, створює робочі місця та розвиває свою науку.

У цих країнах, в зв'язку з розвитком мобільного біотехнологічного сервісу, трансплантація ембріонів від кращих корів-донорів потрібної породи стала доступною процедурою для стада кожного фермера, чого поки що не можна сказати щодо країн пострадянського простору.

Під час добору донорів доцільно проводити разову індукцію поліовуляції у потенційних донорів з метою з'ясування реакції-відповіді яєчників на введення гонадотропіну, після чого робиться остаточний висновок щодо придатності тварини для використання в технології трансплантації.

Нині добір корів проводять на підґрунті прогнозування результатів суперовуляції після гормональної обробки донорів. Яєчники корів, як ключові органи репродуктивної системи, вивчають уже упродовж багатьох років. Одні автори вважають функцію парних гонад симетричною та взаємозамінною, інші наводять результати щодо анатомічної та морфологічної асиметрії гонад великої рогатої худоби, але дані різних джерел досить суперечливі.

Важливим додатковим діагностичним тестом для виявлення патології яєчників у корів з метою підвищення ефективності добору потенційних донорів ембріонів є внутрішньошкірне введення стероїдних гормонів (прогестерону, естрадіолу-дипропіонату і фолікуліну).

Розроблено значну кількість різних способів визначення морфофункціонального стану яєчників, що дає змогу прогнозувати реакцію тварин на введення гонадотропних гормонів. Так, добір донорів з концентрацією естрадіолу у крові на 6-й день статевого циклу на рівні 2,3 нг/мл і подальше його зниження на 7-й день у 1,5–4,5 рази є гарантією позитивних результатів суперовуляції.

У результаті досліджень встановлено, що корови-донори, у яких перед синхронізацією статевої охоти верхівка жовтого тіла виходила за межі яєчника на 0,5 см і більше, краще реагують на ГСЖК і в такому випадку від них можна отримати на 26–36% більше придатних до пересаджування ембріонів.

Запропоновані способи добору корів у донори потребують врахування функціонального стану яєчників, який оцінюють за динамікою статевих гормонів та алергічною реакцією на їх внутрішньошкірне введення. Ці трудомісткі способи потребують додаткових затрат та використання лабораторного обладнання.

Наразі не існує надійної методики відбору корів для ембріодонації, оскільки даний показник має значну індивідуальну відмінність. Чисельні фактори, що впливають на рівень ембріопродуктивності та якість ембріонів корів-донорів, вивчаються вже упродовж тривалого періоду, проте у корів залишаються допоки ще нез'ясованими чисельні біологічні закономірності процесу фолікуло-, лютео- та ембріогенезу,

розуміння яких може сприяти підвищенню результативності репродукції великої рогатої худоби, у т. ч. методами трансплантації ембріонів.

1.2. Контроль за перебігом отелень

Добір майбутніх корів-донорів ембріонів повинен розпочинатися уже з контролю за перебігом отелень. Адже відтворювальна здатність майбутніх корів-донорів в значній мірі залежить від їх перебігу, які у корів відбуваються під час найбільш несприятливих умов із-за непрямої умовної осьової лінії тазу. Крім цього для виведення за межі організму значної маси плоду та навколоплідних вод потребується реалізація багатьох енергетичних резервів організму. Вважається, що чим енергійніше відбувається акт родів, тим рідше виникають ситуації, що загрожують здоров'ю матері й плоду. При цьому потрібний координований перебіг отелень з досягненням у певні періоди необхідних якісних показників: до кінця першої стадії отелень – розкриття шийки матки та встановлення плоду, потім самостійне розривання плідних оболонок і максимальна скорочувальна діяльність матки. Особливо відповідальними періодами отелень є виведення плоду та посліду. Від їх тривалості багато в чому залежить характер відновлення статевих органів після отелення та подальша відтворна здатність породіллі. Важливо враховувати те, що отелення у корів триває 12–14 годин. Розпочинається воно періодичними занепокоєннями породіллі. Вони часто обмахуються хвостом, переступають з ноги на ногу, оглядаються. Корови лягають на бік, витягують ноги та голову. В результаті перейм і потуг появляється плідний міхур, який через деякий час розривається, після цього корова відпочиває приблизно 15–20 хвилин. Після появи голови теляти породіллям інколи надають допомогу (підтягують теля мотузками, накладеними на ноги). Допомогати корові можна лише під час потуг. Потрібно пам'ятати, що виведення плоду у корів може тривати від 15–30 хвилин до 3–4-х годин. В зв'язку з цим ні в якому разі не можна прискорювати отелення передчасною допомогою з насильницьким витягуванням плоду з родових шляхів. Таке некваліфіковане втручання призводить, як правило, до ушкодження родових шляхів та післяродових ускладнень. Надавати допомогу породіллі необхідно тільки тоді, коли процес родів не прогресує впродовж декількох годин після розривання навколоплідного міхура.

Тривалість родів визначається в основному характером та інтенси-

вністю скорочувальної функції матки в разі повної відповідності розмірів плоду та таза. Закінчується отелення відділенням посліду. У процесі отелення організм породіллі втрачає багато води. Тому для нормалізації водно-сольового балансу корові потрібно дати 1–1,5 відра теплої підсоленої води (50–60 г солі на відро води). Найкращим є проведення отелень в окремих денниках, куди корів переводять за 1–2 дні до ймовірного терміну отелення. Надалі в післяотельний період відбувається значна трансформація структур матки та яєчників, правильний хід якої забезпечує нормальну репродуктивну здатність та придатність до трансплантації ембріонів. Нижче наведено показники інволюції матки за нормального та патологічного перебігів післяродового періоду та лабораторні методи його контролю (табл. 1.1).

1.1. Показники інволюції матки у корів

Показники	Перебіг післяродового періоду	
	нормальний	патологічний
Строки виділення лохій	12–16 днів	17 днів і більше
Місцезнаходження матки та її розміри через місяць після отелення	Тазова порожнина	Черевна порожнина
Скорочувальна здатність матки під впливом масажу	Чітко виражена	Відсутня реакція на масаж
Якісна реакція на муко-полісахариди в лохіях та тічковому слизі	Негативна до 7–11 дня після отелення і позитивне далі	Негативна впродовж післяродового процесу
Кількісна оцінка насиченості організму корів естрогенами за каріопікнотичним індексом	Зростання величини каріопікнотичного індексу до 70% через місяць після отелення	Стабільно низькі (менше 50%) показники каріопікнотичного індексу

У післяотельний період відбувається відновлення функціональної здатності матки та активності яєчників з послідуєчим еструсом. У цей же час від корови отримують велику кількість молока, що, в свою чергу, може супроводжуватися негативним енергетичним балансом. Така сукупність одночасних фізіологічних процесів в організмі самки, у більшості випадків, викликає певну дисфункцію репродуктивної здатності.

1.3. Лабораторні методи контролю за перебігом інволюції матки

Реакція яєчників на гормональну обробку та якість ембріонів залежить від фізіологічного стану слизової оболонки матки, який можна контролювати за станом виділень після отелення або під час тічки. Ефективним і простим лабораторним методом є реакція на муцини (мукополісахариди) за І. С. Нагорним. Для її проведення відбирають вміст шийки матки за допомогою полістиролового катетера для ректоцервікального способу осіменіння довжиною 45 см та приєднаного до нього шприца 2 мл.

Пробу переносять у чисту пробірку і додають 2–5 мл однопроцентного розчину оцтової кислоти. Суміш струшують декілька хвилин і залишають відстоюватися на 10 хвилин. Реакцію вважають позитивною, коли в пробірці утворюється згусток, який не руйнується під час струшування, а осаджувана рідина залишається прозорою. Це свідчить про нормальну секреторну функцію слизової оболонки матки. Коли вміст пробірки розбивається на пластівці, то це вказує на відсутність муцинів. В разі запалення слизової оболонки матки відбувається руйнування білків до поліпептидів або навіть до амінокислот, тобто наявність у тічковому слизі амінокислот є непрямим показником запалення.

Підвищена кількість амінокислот у вмісті матки відбувається не тільки внаслідок посиленого їх синтезу та виділення, а і внаслідок дистрофії епітелію, розкладу тканин. Значна частина амінокислот, абсорбованих муцинами, залишається в захисному шарі слизу, який вкриває ендометрій. Ці амінокислоти згубно діють на сперматозоїди.

Проба на сірковмісні амінокислоти за Г. М. Калиновським виконується так: в пробірку до 4 мл 0,5% розчину оцтовокислого свинцю, струшуючи, додають краплями 20% розчин їдкого натрію до появи білого осаду гідрату окису свинцю та надалі до його розчинення. Потім в пробірку додають 1,5–2,0 мл лохій (рис. 1.1, 1.2) суміш нагрівають, не доводячи до кипіння. Позитивною вважають реакцію, коли реагуюча суміш потемніла, як 1% розчин іхтіолу.

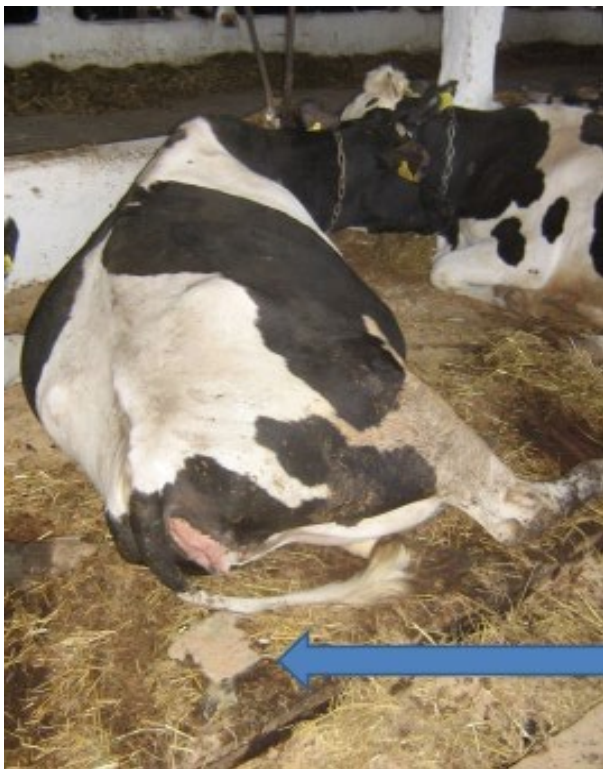


Рис. 1.1. Витікання густих лохій



Рис.1.2. Витікання лохій з домішками гною

1.4. Діагностика прихованого ендометриту

Використовувати в якості донорів потрібно тільки клінічно здорових корів або телиць. Але нерідко (до 12–18%) у корів, особливо в першу охоту після отелення, можуть бути приховані ендометрити. Осіменіння таких тварин не закінчується заплідненням. Більше того, це може стати причиною імунологічної неплідності в разі неодноразових осіменінь самки або хронічного ендометриту. Своєчасне виявлення запального процесу в матці, її санація під час охоти або лікування забезпечать швидке відновлення відтворної здатності тварини.

Існує декілька способів (клінічних, фізико-хімічних, бактеріологічних) діагностики прихованого ендометриту, але найпростішими для практичного застосування й ефективними є такі:

1. Клінічний спосіб полягає в пальпації стінки рогів матки та візуальній оцінці густоти та прозорості тічкового слизу. В разі наявності прихованого ендометриту роги матки гіпотонічні, слабо реагують на їх пальпацію через пряму кишку, їх стінка потовщена, тістуватої консистенції. Потрібно провести масаж матки та визначити прозорість слизу із рогів матки. В разі запалення він буде мутний, інколи з домішками ексудату.

2. В Інституті розведення і генетики тварин імені М.В.Зубця НААН розроблено **спосіб виявлення субклінічних форм ендометриту реакцією на триптофан** – незамінну гетероциклічну амінокислоту, що вивільнюється під час розпаду білків внаслідок запальних процесів. Ця реакція чутлива та проста. Принцип реакції оснований на тому, що сірчана кислота гідролізує сахарозу (полісахарид) до моносахаридів, які, зневоднюючись, перетворюються в оксиметилфурфурол, а останній з триптофаном дає червоне забарвлення. Для постановки реакції на чисте предметне скло або у флакон наносять краплю слизу із матки, додають краплю насиченого розчину сахарози або цукру, перемішують, а через 1–2 хв. вносять 2–3 краплини концентрованої сірчаної кислоти. В разі наявності триптофана, як показника розпаду білків, з'являється червоно-фіолетове забарвлення суміші, що вказує на приховане запалення. В разі відсутності продуктів запалення суміш слизу та реактивів залишається безкольоровою або буде злегка жовтуватого кольору. Як модифікацію цього способу можна використовувати паперові фільтри, попередньо насичені розчином цукру та висушені на повітрі за кімнатної температури. Після цього папір розрізають на смужки шириною 1 см і довжиною 3 см, вміщують в герметично закриті широкогорлі скляні баночки та витримують від 1 до 15 днів за кімнатної температури. Під час дослідження на паперові смужки наносять краплю слизу, а через 1–2 хв. – 2–3 краплини сірчаної кислоти. За наявності триптофану фільтр і його залишки забарвлюються в червоний колір різної інтенсивності. Реакцію проводять за кімнатної температури.

Проби слизу для аналізу потрібно брати із каналу шийки матки або із піхви біля шийки матки за допомогою стерильної полістиролової піпетки, з'єднаної з 10–20 мл шприцом чи пальцями руки в рукавиці. Якщо слизу мало, то потрібно провести масаж матки.

3. Спосіб Ю. М. Попова. Полягає в тому, що в пробірку до 2–3 мл тічкового слизу вносять 2 мл 4%-вого розчину натрію їдкого та нагрівають до кипіння. За наявності запалення суміш після охолодження має лимонно-жовтуватий колір. Якщо ж запалення ендометрію відсутнє, то колір суміші не змінюється.

4. Проба Катеринова. В пробірку наливають 3–4 мл дистильованої води та додають 1 мл цервікального слизу. Суміш кип'ятять 1–2 хвилини. За нормального стану матки рідина залишається прозорою, а в разі субінволюції матки або прихованому ендометриті вона стане мутною з пластівцями.

5. Біологічний спосіб. Оснований на тому, що під час змішування краплі слизу та сперми на предметному склі, під мікроскопом спостерігають швидку загибель і аглютинацію сперматозоїдів, якщо реакція позитивна.

Отже, процес відбору корів для використання в якості донорів ембріонів складається з багатьох компонентів. Для досягнення високих результатів трансплантації ембріонів під час відбору корів-донорів слід враховувати щонайбільше показників, які були вказані вище.

1.5. Діагностика функціональної активності яєчників

Заплідненість корів-донорів за їх осіменіння тісно пов'язана з анатомо-функціональним станом яєчників, повноцінністю статевого циклу самок. Г.С. Шарапа вважав, що морфо-фізіологічний стан яєчників корів можна визначити клініко-гінекологічним способом і прогнозувати перебіг статевого циклу. Через 10–12 днів після отелення яєчники знаходяться в стані відносного функціонального спокою. Вони частіше мають форму овалу або видовжено-сплющеного овалу величиною середньої або малої сливи. Величина одного з яєчників майже завжди більша, ніж іншого. У молодих корів (близько 75%) функціонуючим і більшим за розмірами є правий яєчник. Його консистенція майже однорідна, пружно-еластична, можна знаходити залишки жовтого тіла вагітності. Через 15–25 днів після отелення відбувається збільшення функціонуючого яєчника ($4 \times 3 \times 2$ см або $3 \times 2 \times 1$ см), його поверхня горбиста за рахунок фолікулів різного ступеня розвитку або жовтих тіл. В разі гіпофункції яєчників вони зменшені в розмірах, мають видовжену або плоску форму та поверхню, відсутня еластичність тканини. Г.С. Шарапа та ін. вважають, що найпростішим і досить об'єктивним способом діагностики функціональної активності яєчників є визначення каріопікнотичного індексу піхвових мазків самок під час еструсу, величина якого виражається в процентному співвідношенні кількості епітеліальних клітин слизової оболонки піхви з пікнотичними ядрами (невеликими, порушеними і забарвленими) до числа підрахованих клітин. Принцип цього методу ґрунтується на тому, що під дією естрогенів яєчників підвищується проліферація усіх тканинних структур статевих органів, в тому числі і поверхневого епітеліального шару піхви. При цьому відбуваються морфологічні зміни в ядрах епітеліальних клітин. Чим більше естрогенів і вища їх активність, тим сильніше

проявляються проліферативні процеси і тим більше клітин зі зміненими ядрами. Таким чином, з підвищенням естрогенної функції яєчників пропорційно збільшується каріопікнотичний індекс.

Піхвові мазки беруть з верхнього склепіння піхви з допомогою полістиролової піпетки довжиною біля 20 см, попередньо на одному з її кінців терпугом або ножем наносять кілька поперечних канавок і намотують тонкий шар білої гігроскопічної вати або марлі довжиною 1–2 см. Після підготовки зовнішніх статевих органів корови підготовлену піпетку вводять у піхву на глибину 12–15 см, обертаючи її в бік намотування вати, виймають із піхви і роблять мазок на чистому сухому предметному склі. Через 3–5 хв. мазок фарбують 0,5%-ним розчином генціанвіолету або фіолетовим чорнилом. Після висушування за кімнатної температури в мазках під мікроскопом за збільшення в 140–200 разів підраховують підряд 100 епітеліальних клітин, одночасно враховуючи клітини з пікнотичними ядрами (забарвленими), процентна частка яких і складає величину індексу. В період еструсу (під час осіменіння), повноцінного статевого циклу корови, каріопікнотичний індекс становить 48–60%. В разі морфо-функціональних порушень яєчників (гіпоплазія, гіпофункція, персистентне жовте тіло, кісти, склеротичні зміни) індекс не перевищує 30–40%. За фізіологічно нормальних умов перебігу статевого циклу величина індексу змінюється у відповідності зі змінами функції яєчників.

Функціональний стан яєчників і їх гормональну активність у корів і телиць можна визначати пробою на вміст глікогену в піхвовому епітелії під час тічки й охоти за глікогеновим індексом. Для цього на предметному склі роблять мазки-відбитки із слизової оболонки присінка піхви та висушують на повітрі. Потім їх фарбують 2–3 хв. розчином Люголя та висушують за кімнатної температури.

В клітинах з глікогеном протоплазма забарвлюється в темно-коричневий, коричневий або темно-жовтий колір. За допомогою мікроскопу підраховують 100 клітин і вираховують процентне відношення забарвлених клітин до загального числа підрахованих. Якщо у корів глікогеновий індекс під час осіменіння у межах 60–80% вони краще запліднюються. Вміст глікогену в піхвовому епітелії збільшується з наближенням овуляції, коли естрогенність організму стає найбільш високою. В разі гіпофункції яєчників і слабких проявах ознак тічки в мазках знаходиться 38–56% забарвлених клітин, переважно світло-коричневого та жовтого кольору.

1.6. Добір корів-донорів ембріонів

Для відбору корів-донорів ембріонів використовують тільки клінічно здорових тварин, яких попередньо досліджують на патологію статевих органів (матки, яйцепроводів та яєчників). Тварин зі змінами після запалень вказаних органів виключають з програм трансплантації ембріонів. Враховують також легкість отелень. Проміжки між ними в попередніх лактаціях повинні наближатися до 360–380 днів. Використовувати проблемних корів у селекційних планах із застосуванням трансплантації ембріонів недоцільно. Перед зарахуванням корів до групи донорів бажано впевнитися у легкості проникнення інструментів через канал шийки матки. Безпека донорів щодо інфекційних захворювань повинна бути підтверджена ветеринарним свідоцтвом із зазначенням дати досліджень на туберкульоз, бруцельоз, лейкоз, лептоспіроз та інші в залежності від епізотичної ситуації в регіоні.

Основним критерієм відбору корів-донорів ембріонів є рівень молочної продуктивності за найвищу лактацію (305 днів або вкорочену). Корів-донорів локальних або зникаючих порід відбирають виходячи із задач збереження генетичного різноманіття.

Процедуру відбору корів-донорів доцільно доповнювати дослідженням рівня прогестерону в крові, який повинен перевищувати 2 нг/мл. Оцінити придатність корови до суперовуляції можна за відношенням об'єму жовтого тіла до об'єму яєчника в процентах. За такого відношення менше 30% прогнозована кількість овуляцій становитиме 0–2 шт., 31–40% – 3–9 шт., 41–50% – 10–23 шт. Оскільки дослідити рівень прогестерону непросто, оцінити функціональну активність яєчників можна за рівнем каріопікнотичного індексу піхвових мазків, який опосередковано відображає насиченість організму корів естрогенами.

1.7. Одержання та трансплантація ембріонів для збільшення чисельності поголів'я

Процес трансплантації ембріонів розпочинається з етапу підготовки, що містить:

1. Визначення наявності племінної худоби з підтвердженим походженням.
2. Благополучний ветеринарно-санітарний стан господарства.
3. Забезпечення худоби повноцінною годівлею.

4. Наявність спеціалістів, що проходили стажування з трансплантації ембріонів.

5. Наявність майданчиків для виявлення корів у стані охоти.

6. Забезпеченість інструментами та препаратами для проведення трансплантації ембріонів.

Під час відбору корів-донорів необхідно керуватись не тільки показниками молочної продуктивності, але враховували тип тварин за комплексом селекційних ознак, легкості отелень, життєздатності приплоду тощо.

Згідно з методикою трансплантації гонадотропні гормони розпочинають вводити коровам з 8-го по 14-й день статевого циклу і лише за умови наявності на одному з яєчників жовтого тіла. Облік днів статевого циклу проводять від статевої охоти, день якої є нульовим. Тому у групі відібраних корів проводять стимуляцію статевої охоти з метою синхронізації статевих циклів, для чого тваринам уводять аналоги простагландину за умови наявності на яєчнику жовтого тіла.

Першу гормональну обробку п'яти корів української червоно-рябої породи для викликання у них суперовуляції фолікулостимулюючим гормоном (препарат «ФСГ-супер») ми виконували за 4,5-денною схемою. Для штучного осіменіння цих корів використовували сперму двох бугаїв голштинської породи Джорнадо 6108 та Різвий 7970. Осіменіння тварин здійснювали 2 рази подвійною дозою сперми з інтервалом у 12 годин.

Ефективність гормональної обробки значною мірою залежить від фізіологічного стану яєчників, тому проводилась їх пальпаторна діагностика на наявність жовтого тіла.

Ефективність методу трансплантації ембріонів залежить від способу вимивання ембріонів, кваліфікації спеціалістів, умілого використання інструментів, приладів.

Вимивання ембріонів проводили на 7–8 день після першого осіменіння з використанням нехірургічного методу (рис. 1.3). Одержані ембріони великої рогатої худоби промивали в середовищі Дюльбеко з додаванням 0,075 мг/мл канаміцину сульфату з 20% фетальної сироватки теляти. Контейнери із промивною рідиною відстоювали (20–30 хвилин) і за принципом сифону видаляли верхній шар рідини, залишаючи 70–90 мл з осілими на дно ембріонами, потім під мікроскопом МБС-9 за збільшення у 28 і 56 разів виконували пошук, оцінку та інші маніпуляції з ембріонами.

Для нехірургічної трансплантації ембріонів використовували інструменти й обладнання фірми «Minitube». В паєту набирають свіже поживне середовище (1,0–1,3 см), потім повітря (0,5 см) і далі під контролем мікроскопу – основний об'єм середовища з ембріоном (2–3 см). Після цього засмоктують невелику кількість повітря (0,5 см) та поживне середовище (1,0–1,5 см).

В якості реципієнтів було відібрано 24 телиці, які є менш цінними в племінному відношенні. Телиці-реципієнти мали нормально розвинені та добре функціонуючі органи відтворення, були клінічно здоровими, мінімальний вік телиць – 18 міс., жива маса – не менше 380 кг.



Рис. 1.3. Вимивання та оцінка ембріонів великої рогатої худоби

Важливою умовою високого приживлення ембріонів є синхронність в прояві еструсу у донора і реципієнта, а також своєчасне та кваліфіковане виявлення тварин в охоті. Найрезультативнішим є синхронний прояв охоти у донора та реципієнта за різницею у часі ± 12 годин.

Статевий цикл телиць-реципієнтів було синхронізовано зі статевим циклом корів-донорів за рахунок введення їм простагландину упродовж 5 днів. Перед початком пересаджування було проведено ректогенітальну пальпацію яєчників у телиць. При цьому оцінювали наявність або відсутність жовтого тіла статевого циклу та фіксували на якому яєчнику воно сформовано. Також визначали якість жовтого тіла. Тваринам із патологією яєчників ембріони не пересаджували.

Тваринам, які показали позитивну реакцію на дію гормону, проводили епідуральну анестезію для сакральної анестезії. Для цього ін'єктували 5 мл 2%-го розчину новокаїну.

Діагностику тільності реципієнтів проводили ректальним методом через 2 місяці після пересаджування ембріонів.

Цитогенетичний аналіз непридатних для трансплантації ембріонів виконували після приготування з них препаратів за модифікованим методом А. Тарковського (1966). Препарати фарбували з використанням 2%-го розчину барвника Гімза і аналізували їх під світловим мікроскопом «Carl Zeiss».

Ефективність методу трансплантації значно залежить від способу вилучення ембріонів. Нами було застосовано нехірургічний метод отримання ембріонів через шийку матки за допомогою спеціального обладнання фірми «Minitube». Цей спосіб відносно простий і надійний, дозволяє успішно одержувати ембріони безпосередньо на тваринницькій фермі, використовуючи донора багаторазово майже без зниження його відтворювального потенціалу. Для трансплантації можна використовувати ранні бластоцисти, тому ембріони вимивають через 7–8 діб після першого штучного осіменіння. Саме на цій стадії розвитку найкраще одержувати і пересаджувати ембріони. Крім того, на цій стадії розвитку ембріони добре переносять заморожування-розморожування.

Але на основі морфологічної оцінки ембріонів неможливо зробити остаточний висновок про їх життєздатність. Все залежить від багатьох факторів, зокрема, від їх розвитку в процесі культивування і приживлення в матці телиці-реципієнта.

У наших дослідженнях серед п'яти гормонально оброблених високопродуктивних корів у групу донорів відібрано три (Німфа 9025, Мелодія 3142, Ріка 8607), оскільки лише у них, поряд із позитивною реакцією на суперовуляцію, одержано в середньому 12,7 ембріонів за перше вимивання (табл. 1.2, рис. 1.4).

Також високий вихід придатних для трансплантації ембріонів

(всього 38 шт.) на рівні 86,8% підтверджує використанням їх як донорів. Одержані результати ембріопродуктивності вказаних вище корів узгоджуються з результатами досліджень інших авторів. Хоча у наших дослідженнях наразі лише три корови є ефективними донорами ембріонів, але середня кількість одержаних ембріонів, які є придатними для трансплантації на рівні 11% є досить високою.

1.2. Ефективність вимивання ембріонів у лактуючих корів за використання препарату «ФСГ-супер»

Показники	Лактуючі корови
Оброблено корів, гол.	5
Реагувало на суперовуляцію, гол. (%)	3 (60,0)
Позитивних вимивань ембріонів, гол. (%)	3 (100,0)
В середньому на одного донора одержано ембріонів, шт., $M \pm m$	$12,7 \pm 4,98$
в тому числі, придатних для трансплантації, стадія розвитку – пізні морули – пізні бластоцисти, шт., $M \pm m$	$11,0 \pm 4,58$
Вихід придатних для трансплантації ембріонів, %	86,8

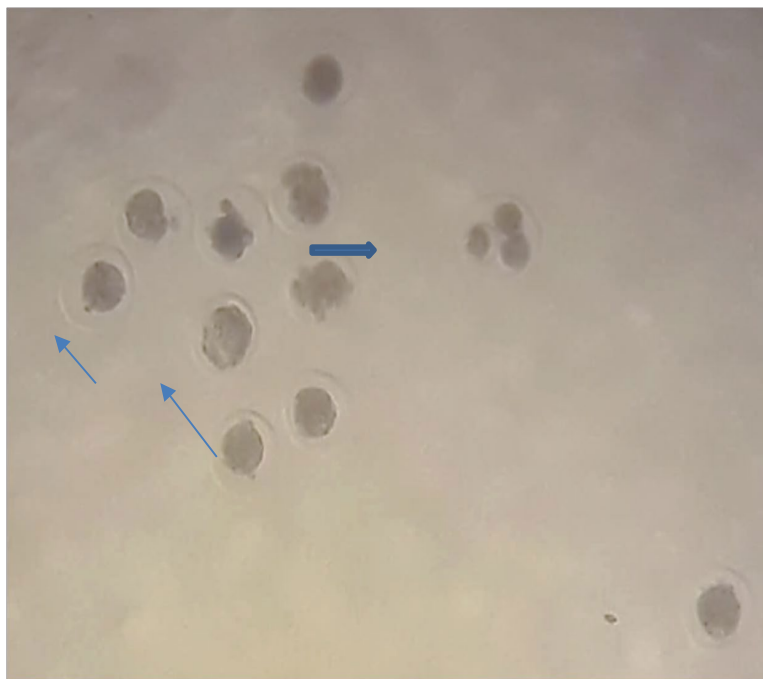


Рис. 1.4. Ембріони донора Мелодія №3142 під мікроскопом.

В деяких помітні порушення нормального розвитку:

— дегенерація окремих бластомерів

— зупинка дроблення

(збільшення у 28 разів) (фото із архіву авторів)

За кінцевими результатами такі показники зумовлені оптимальною підготовкою донорів до суперовуляції та їх клінічним здоров'ям. Одержана нами ефективність вимивання є досить високою. Зменшення цього показника можливе через недостатню кваліфікацію техніки. Крім того вважають, що деяка кількість яйцеклітин при великому збільшенні яєчників не потрапляє у воронку яйцепроводу.

В ході наших досліджень встановлена висока ембріопродуктивність корів-донорів (табл. 1.3).

Це підтверджується не лише тим, що майже 86,8% вимитих ембріонів оцінено як придатні для трансплантації, а також і тим, що за одне вимивання реакція на суперовуляцію є рекордною – 22 ембріони. Хоча відомі випадки одержання за одне вимивання 40–60 ембріонів та яйцеклітин, що свідчить про значний репродуктивний потенціал яєчників корів. В наших дослідженнях 22 ембріони від донора Мелодія 3142 та народження 6 теличок-трансплантантів свідчать про правильність обраної схеми впровадження трансплантації ембріонів. Важливо зазначити, що 33 повноцінні ембріони були трансплантовані 24 реципієнтам, тільність їх на рівні 45,8% і народилось 10 теличок-трансплантантів.

1.3. Кількісні і якісні характеристики корів-донорів за трансплантації ембріонів

Кличка №	Одержано ембріонів		Реципієн- тів, гол.	Тільних реципієн- тів, гол. (%)	Телят-транс- плантантів***, гол.
	всього, шт.	придатних для трансплантації, шт. (%)			
Німфа 9025	11	8 (72,7)	7*	3 (42,8)	3
Мелодія 3142	22	20 (90,9)	12**	6 (50,0)	6
Ріка 8607	5	5 (100,0)	5	2 (40,0)	1

* – одній телиці-реципієнту трансплантовано два ембріони;

** – восьми телицям-реципієнтам трансплантовано по два ембріони;

*** – всі народжені телята – телички.

Необхідно зазначити, що корова-донор Німфа 9025 (28.04.2010 р. н.) з продуктивністю за найвищу лактацію 8 801 кг, мала одну теличку та чотири бугайці. За допомогою трансплантації ембріо-

нів лише у 2018 році від неї одержано три телички і подальше одержання ембріонів від цієї корови-донора буде продовжено.

Перспективною як донор ембріонів є корова Мелодія 3 142 (07.01.2009 р. н., продуктивність – 5 747 кг молока). За одержання від неї 20 повноцінних ембріонів за одне вимивання і 50%-ї тільності реципієнтів було одержано шість телят-трансплантантів. Хоча відсоток народженого потомства від кількості пересаджених ембріонів не перевищує 30% (жодної двійні не одержано), всі народжені телята є теличками. За час використання цієї корови у господарстві за чотири лактації від неї одержано було лише одну теличку.

Хоча наразі у світі стрімкого поширення набуває використання для трансплантації одержаних поза організмом (*in vitro*) ембріонів великої рогатої худоби (наприклад, у 2018 році де одержано *in vitro* 1 029 400 шт. проти 469 967 шт. вимитих від корів-донорів, ми у своїх дослідженнях застосовували вимивання їх від корів з метою удосконалення цього методу та підвищення ефективності його використання. У країнах Європи у 2018 році традиційний метод одержання ембріонів від корів-донорів був застосований на рівні 79,3%.

Як вказано вище, із 38 одержаних ембріонів 33 були трансплантовані реципієнтам, а із решти п'яти непридатних для трансплантації було виготовлено цитогенетичні препарати та проаналізовано стан їх хромосомного апарату. Такий цитогенетичний аналіз необхідний для ідентифікації хромосомних порушень, допомагає визначитись із етапами розвитку ембріонів. В наших дослідженнях аналіз цитогенетичних препаратів підтвердив, що один ембріон зупинив свій розвиток на стадії трьох клітин, решта чотири – від 16-ти до 32-х клітин. Ядра майже всіх клітин ембріонів були дегенеровані, вони характеризувалися ущільненим хроматином і неможливістю ідентифікувати ядерця.

ВИСНОВКИ

1. Трансплантація ембріонів є незамінною для отримання плідників та збільшення поголів'я бугайців від матерів із рекордною молочною продуктивністю. У США і Канаді понад 70% бугаїв-плідників, які працюють на станціях штучного осіменіння, отримані таким методом. Крім цього, отримані в результаті замовних спаровувань телички-трансплантанти є вдалим селекційним матеріалом для вибору серед них рекордисток нового покоління і використання їх як матерів бугаїв.

2. Необхідно підвищувати ефективність трансплантації ембріонів

з огляду на те, що це збільшує ефективність селекційної роботи. За штучного осіменіння корів теля успадковує лише частину корисних властивостей бугая і перевагу має успадковуваність ознак від корови, а за трансплантації ембріонів вплив реципієнтів на потомство практично відсутній.

3. Перевага трансплантації ембріонів також полягає в тому, що в разі виведення нових порід або поліпшення існуючих застосовується міжнародний обмін тваринами. Обмін ембріонами здешевлює і спрощує проблему транспортування тварин. В цьому випадку майже повністю відпадає необхідність складних карантинних ветеринарних вимог, оскільки ембріони практично вільні від бактерій і грибків внаслідок багаторазової процедури промивання в стерильних середовищах, збагачених антибіотиками.

4. Трансплантація ембріонів є ефективним методом акліматизації тварин. Велике значення цей метод має для оздоровлення стад молочної худоби від захворювань на лейкоз, інфекційний ринотрахеїт, вірусну діарею великої рогатої худоби, оскільки віруси цих хвороб не передаються через ембріони.

ВИКОРИСТАНІ ЛІТЕРАТУРНІ ДЖЕРЕЛА

1. Бугров О. Д., Хмельков В. М. Рання доімплантаційна ембріональна смертність у телиць та корів. *Науково-технічний бюлетень*. Харків, 2014. № 113. С. 5257.

2. Гуменний О. Г., Сідашова С. О., Горобей О. О. Вплив тканинного препарату Пульмолізату на морфогенез яєчників телиць-реципієнтів. *Науковий вісник ветеринарної медицини*. Біла Церква, 2017. Вип. 1. С. 16–25.

3. Дуванов О. В. Морфологічна характеристика жовтих тіл яєчників і ефективність стимуляції поліовуляції корів-донорів. *Розведення і генетика тварин*. Київ, 2011. Вип. 45. С. 63–68.

4. Емброзе Дж. Фактори, що впливають на плідність корів. *Ветеринарна практика*. 2015. № 4. С. 38–46.

5. Кошовий В. П. Акушерсько-гінекологічні патології у корів. Харків : Золоті сторінки, 2011. 154 с.

6. Кузєбний С. В., Шарапа Г. С., Демчук С. Ю. Методологічні аспекти оцінки відтворювальної здатності корів. *Розведення і генетика тварин*. Київ, 2018. Вип. 55. С. 201–209.

7. Мельник В. О., Сідашова С. О. Акушерство, гінекологія і біотехнологія відтворення тварин : конспект лекцій. Миколаїв : МНАУ, 2013. 140 с.
8. Спосіб відбору корів-донорів і телиць-реципієнтів : пат. на корисну модель 41798 Україна № u200814844 ; заявл. 23.12.2008 ; опубл. 10.06.2009, Бюл. № 11, 2009. 4 с.
9. Спосіб добору корів у донори ембріонів для трансплантації : пат. на корисну модель № 57835 Україна. № u201011090 ; заявл. 15.09.2010 ; опубл. 10.03.2011, Бюл. № 5. 3 с.
10. Рубленко М. В., Власенко С. А. Проблеми забезпечення здоров'я високопродуктивних корів. *Ветеринарна медицина*. Харків, 2011. № 95. С. 397–400.
11. Сідашова С. О. Анатомічні і функціональні зміни яєчників самок великої рогатої худоби. *Розведення і генетика тварин*. Київ, 2011. Вип. 45. С. 236–246.
12. Сідашова С. О. Вплив тканинного імуностимулюючого препарату на нормалізацію статевої циклічності телиць в лютеальну фазу. *Розведення і генетика тварин*. Київ, 2014. Вип. 48. С. 244–252.
13. Сідашова С. О. Оцінка лактуючих корів бути придатними донорами- реципієнтами доїмплантаційних ембріонів. *Вісник Полтавської державної аграрної академії*. 2013. № 2. С. 61–63.
14. Сідашова С. О. Результативність відтворення дійного стада і функціональна асиметрія яєчників корів. *Вісник Дніпропетровського державного аграрно-економічного університету*. 2014. № 2. С. 175–181.
15. Шеремета В. І., Вергелес О. П., Себа М. В. Новий спосіб добору корів у донори ембріонів для трансплантації. *Вісник аграрної науки*. 2010. № 12. С. 34–35.
16. Юлевич О. І., Ковтун С. І., Гиль М. І. Біотехнологія. Миколаїв : МНАУ, 2012. 476 с.
17. Шарапа Г. С., Бойко О. В., Демчук С. Ю. Репродуктивна здатність і продуктивність корів за три лактації залежно від віку запліднення телиць. *Розведення і генетика тварин*. Київ, 2022. Вип. 63. С. 185–190.

Розділ 2.

ДОБІР КОРІВ ЗА ПРОЯВОМ БІЛАТЕРАЛЬНИХ ОВУЛЯЦІЙ ДЛЯ РОЗШИРЕНОГО ВІДТВОРЕННЯ СТАДА

Відтворення дійного стада обумовлюється особливостями статевої функції корів. Основна роль у забезпеченні відтворення великої рогатої худоби, в тому числі маточного поголів'я, належить яєчникам. Вивченню анатомо-фізіологічних особливостей яєчників корів присвячені численні дослідження упродовж тривалого часу, а особливу увагу вітчизняними та зарубіжними дослідниками було приділено діяльності яєчників за розробки та впровадження у виробництво способів штучного осіменіння корів і телиць. Зважаючи на те, що в усіх країнах з розвиненим молочним скотарством за останні роки відмічено суттєве зниження рівня заплідненості поголів'я, необхідно приділяти значну увагу вивченню цієї проблеми.

Дослідження анатомо-фізіологічних особливостей репродуктивної функції корів і телиць є фундаментальною засадою управління відтворенням стада і підвищення рентабельності всієї галузі скотарства. Наразі гострою проблемою є зниження фертильності маточного поголів'я в усіх країнах з розвиненим молочним скотарством. У великих молочних комплексах промислового типу вже стало закономірністю закупівля нетелей в інших підприємствах для ремонту стада, оскільки це не вдається зробити за рахунок відтворення власного маточного поголів'я. Крім зниження економічних показників, така практика значно погіршує ефективність племінної роботи.

Зниження репродуктивної здатності корів є результатом цілого комплексу розладів в організмі за дозрівання фолікулів, овуляції, формування жовтих тіл та порушення розвитку плоду. Для ліквідації та профілактики таких порушень запропоновано різні методичні та практичні підходи, але це не вирішує проблему в цілому.

Яєчники корів є статевими органами з великою мінливістю структурної організації та поліфункціональною циклічною дією, яка поєднує гормональну та репродуктивну функції. У зв'язку з цим визначення морфогенезу яєчників корів молочних порід є важливим завданням. У літературних джерелах наведені результати вивчення фолікулярної фази статевого циклу корів, які характеризують активність яєчни-

ків у переважній більшості випадків проявом одиночної овуляції на одному з яєчників, як виключення наводяться приклади подвійної овуляції дозрілих фолікулів, але дослідження щодо поширеності цього явища, його фізіологічного значення відсутні.

2.1. Поширеність білатеральних овуляцій серед корів молочних порід

Господарства України з розведення великої рогатої худоби часто мають проблему низького рівня відтворювальної здатності корів. Наразі від рівня відтворення поголів'я залежать основні завдання ведення галузі скотарства, а саме – отримання молока та приплоду. Відтворення є одним з головних чинників, що визначають економічну ефективність молочного скотарства. Саме тому однією з основних цілей у тваринництві є досягнення високого рівня відтворення. Дослідження поширення білатеральних овуляцій у корів молочних порід та визначення їх впливу на рівень заплідненості самиць є актуальним. Важливе значення для фізіологічних процесів в організмі тварин мають своєчасне виявлення корів з ознаками статевого збудження та проведення диференційної пальпаторної діагностики яєчників перед проведенням штучного осіменіння (ШО) корів з наступним контролем тільності (ректальна пальпація і УЗД) та фактичного отелення.

Робота була проведена упродовж декількох років у різних молочних господарств України. Стисла характеристика господарств, де утримувалось поголів'я, наведена в таблиці 2.1.

Умови утримання й експлуатації поголів'я в обстежених господарствах були різні, але методичний підхід досліджень – аналогічним. Все дійне поголів'я мало добру вгодованість і стабільну кормову базу, крім корів господарства ФГ «Роднік», у яких відмічались порушення метаболізму внаслідок дефіциту раціону за макро- та мікроелементами.

Формування дослідних груп проводили за принципом «мале стадо» (дійні корови 1–7 лактацій, крім господарства ПрАТ «Агро-Союз», де високопродуктивне дійне стадо мало тільки 1–4 лактації), оцінювання корів проводили в умовах вигульних майданчиків (ТОВ «Росія», ТОВ АТФ «Зоря», ПАТ «Полтаваплемсервіс», ТОВ «Промінь-Лан», СТОВ «Надія», ДП «ДГ ім. Декабристів Інституту свинарства і АПВ НААН», СТОВ «Агрофірма Петродолинське») або в межах безприв'язних секцій (господарства ПрАТ «Агро-Союз», ПП «Агроекологія», СПП «РВД-Агро», СТОВ «Богоявленський»,

ФГ «Роднік»). Виявлення корів у стадії збудження статевого циклу проводили візуально-клінічним способом з наступним уточненням часу ШО ректальною пальпацією домінантних фолікулів за загальноприйнятою методикою. Контроль овуляції проводили з інтервалом 3–12 годин.

2.1. Характеристика поголів'я молочних господарств, в яких проводились дослідження

Назва господарства	Область	Порода	Середня продуктивність, корів за лактацію, кг
СТОВ «Богоявленський»	Донецька	УЧР	5 900
ТОВ АТФ «Зоря»	Донецька	ЧС	4 500
ФГ «Роднік»	Донецька	УЧР	4 200
ТОВ «Росія»	Донецька	ЧС*	4 600
ПрАТ «Агро-Союз»	Дніпропетровська	Г*	10 000
СТОВ «Агрофірма Петродолинське»	Одеська	УЧМ	5 000
ПП «Агроекологія»	Полтавська	УЧеР	6 500
ДП ДГ ім. Декабристів Інституту свинарства і АПВ НААН	Полтавська	А*	6 000
СТОВ «Надія»	Полтавська	УЧеР	5 000
ПАТ «Полтаваплемсервіс»	Полтавська	Г	9 000
ТОВ «Промінь-Лан»	Полтавська	УЧР	4 400
СПП «РВД-Агро»	Черкаська	УЧР	6 000

Примітка: * – чистопорідні стада

Для деталізації досліджень було проведено ШО корів господарств ДП «ДГ ім. Декабристів Інституту свинарства і АПВ НААН» та ТОВ «Агрофірма Петродолинське» ректо-цервікально одноразово (застосовано сперму бугаїв відповідно до селекційного плану господарства) в оптимальний термін щодо овуляції домінуючого фолікула. Контроль тільності проводили ректальним способом через 50–60 діб після ШО з наступною фіксацією фактичного отелення корів (ТОВ «Агрофірма Петродолинське») або УЗД через 35–40 діб після ШО (ДП «ДГ ім. Декабристів Інституту свинарства і АПВ НААН»).

Всі процедури ШО та пальпаторного дослідження були проведені одним оператором, дані фіксували відповідно до уніфікованого формату, що виключало вплив неоднозначного трактування результатів. ШО проводили в умовах виробничих приміщень, для фіксації тварин

застосовували станки для ветеринарних процедур. Поголів'я піддослідних корів було забезпечене плановими протиєпізоотичними заходами, зокрема, вакцинаціями проти інфекційних хвороб.

За результатами досліджень 1 255 статевих циклів корів встановлено наявність білатеральних овуляцій у 8,7% тварин (рис. 2.1). Слід відмітити, що у трьох з 12-ти стад це явище було відсутнє, а в чотирьох – рівень дозрівання одночасно обох яєчників складав більше 10,0% (табл. 2.2).

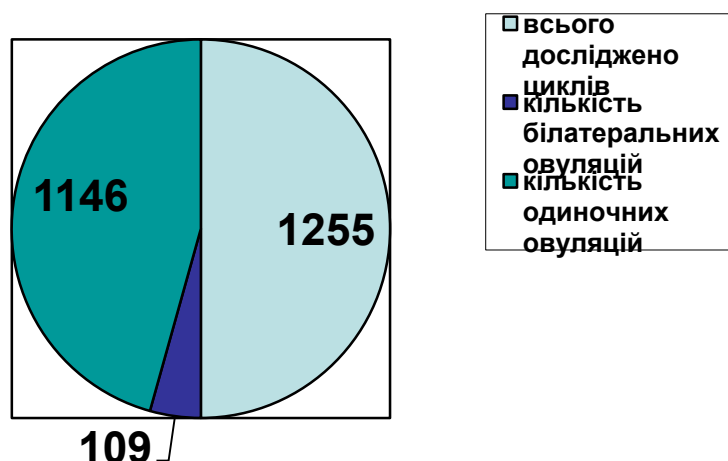


Рис. 2.1. Поширеність білатеральних овуляцій серед дійного поголів'я корів

2.2. Кількість білатеральних овуляцій у корів молочних порід

Назва господарства	Всього досліджено корів в 0-й день фолікулярної фази циклу		
	циклів, n	в т.ч. білатеральна локалізація овуляції, циклів,	
		n	%
ПАТ «Полтаваплемсервіс»	15	0	0
ПП «РВД-Агро»	43	0	0
ПП «Богоявленський»	65	0	0
ПП «Агроекологія»	163	2	1,2
ПрАТ «Агро-Союз»	156	6	3,8
ТОВ «Зоря»	149	9	6,0
СФГ «Роднік»	62	6	9,7
СТОВ «Промінь-Лан»	102	10	9,8
ДП «ДГ ім. Декабристів Інституту свинарства і АПВ НААН»	130	15	11,5
СТОВ «Надія»	17	2	11,8
СТОВ «Росія»	241	38	15,8
ТОВ «АФ «Петродолинське»	112	23	20,5
Всього	1 255	109	8,7

2.2. Вплив генетичних і паратипових факторів на поширеність білатеральних овуляцій у корів молочних порід

На основі отриманих результатів досліджень проведено аналіз залежностей між проявом білатеральних овуляцій і генетичними та паратиповими факторами: рівнем молочної продуктивності, породної належності, чистопорідності, генетично закріпленої масті.

Зважаючи на те, що в умовах реального виробництва всі фактори довкілля та генотипові фактори впливають на тварин взаємопов'язано, визначені в ході дослідження чинники умовно структурували за фактичною ієрархією впливу. Дослідження тиску найбільш значимого фактору для виробництва, а саме – молочної продуктивності дійного поголів'я, показано на рисунку 2.2.

Встановлено достовірну різницю між стадами з високою і низькою молочною продуктивністю корів за рівнем активності яєчників у фолікулярну фазу статевих циклів: 4,02% білатеральних овуляцій і 12,88%, відповідно (табл. 2.3). Причому серед корів з середньою продуктивністю були стада з 20,54%; 15,77 і 11,76% білатеральних овуляцій (відповідно СТОВ «Агрофірма Петродолинське», ТОВ «Росія» і СТОВ «Надія»).

Слід відмітити, що чистопорідні корови айрширської породи (середня продуктивність 6 000 кг за лактацію) теж показали високий рівень білатеральності яєчників у фолікулярну фазу – 11,54% (рис. 2.2), тому наступним етапом аналізу було структурування даних з врахуванням методу розведення худоби в господарствах з високопродуктивними стадами (більше 5 900 кг молока за лактацію).

Встановлено, що чистопорідні стада (ПрАТ «Агро-Союз», ДП «ДГ ім. Декабристів Інституту свинарства і АПВ НААН» та ТОВ «Росія») мали більш виражену активність одночасно обох яєчників у фолікулярну фазу – 11,2%, ніж помісні тварини (ФГ «Роднік», ТОВ «Промінь-Лан», ТОВ АТФ «Зоря», СТОВ «Надія», СТОВ «Агрофірма Петродолинське», ПП «Богоявленський», ПП «РВД-Агро», ПАТ «Полтаваплемсервіс» та ПП «Агроекологія»), відповідно 6,6%.

Узагальнене порівняння поширеності білатеральних овуляцій серед чистопорідних та помісних корів червоної і чорної масті, яке наведено на рисунку 2.3, окреслює рівень генетичного впливу на морфологічну та фізіологічну активність яєчників ($p < 0,001$).

2.3. Кількість білатеральних овуляцій у корів молочних порід залежно від продуктивності

Назва господарства	Всього досліджено корів в 0-й день фолікулярної фази циклу		
	циклів, n	в т.ч. білатеральна локалізація овуляції, циклів	
		n	%
Середньо- і низькопродуктивні стада (4 200–5 000 кг молока за лактацію)			
СТОВ «Надія»	17	2	11,76
ФГ «Роднік»	62	6	9,68
ТОВ АТФ «Зоря»	149	9	6,04
ТОВ «Промінь-Лан»	102	10	9,80
СТОВ «Агрофірма Петродолинське»	112	23	20,54
ТОВ «Росія»	241	38	15,77
Разом	683	88	12,88 ^a ±5,15
Високопродуктивні стада (6 000–10 000 кг молока за лактацію)			
ПАТ «Полтаваплемсервіс»	15	0	0,00
СПП «РВД-Агро»	43	0	0,00
СТОВ «Богоявленський»	65	0	0,00
ПП «Агроекологія»	163	2	1,23
ПрАТ «Агро-Союз»	156	6	3,85
ДП «ДГ ім. Декабристів Ін- ституту свинарства і АПВ НААН»	130	15	11,54
Разом (M±m)	572	23	4,02 ^b ±4,52

Примітка: a:b – $p < 0,01$, критерій Стьюдента.

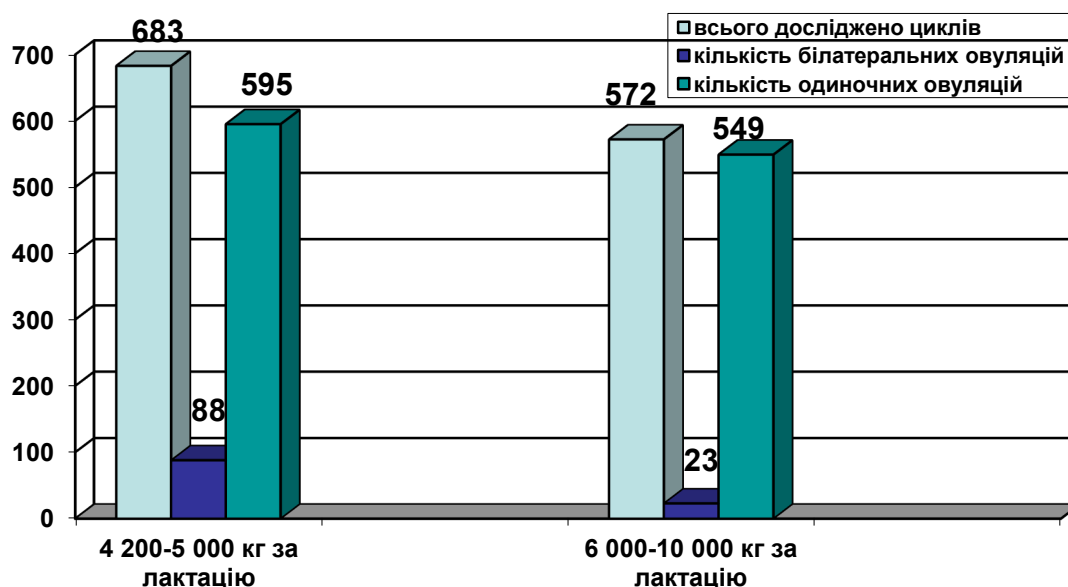


Рис. 2.2. Кількість білатеральних овуляцій у корів за різного рівня молочної продуктивності

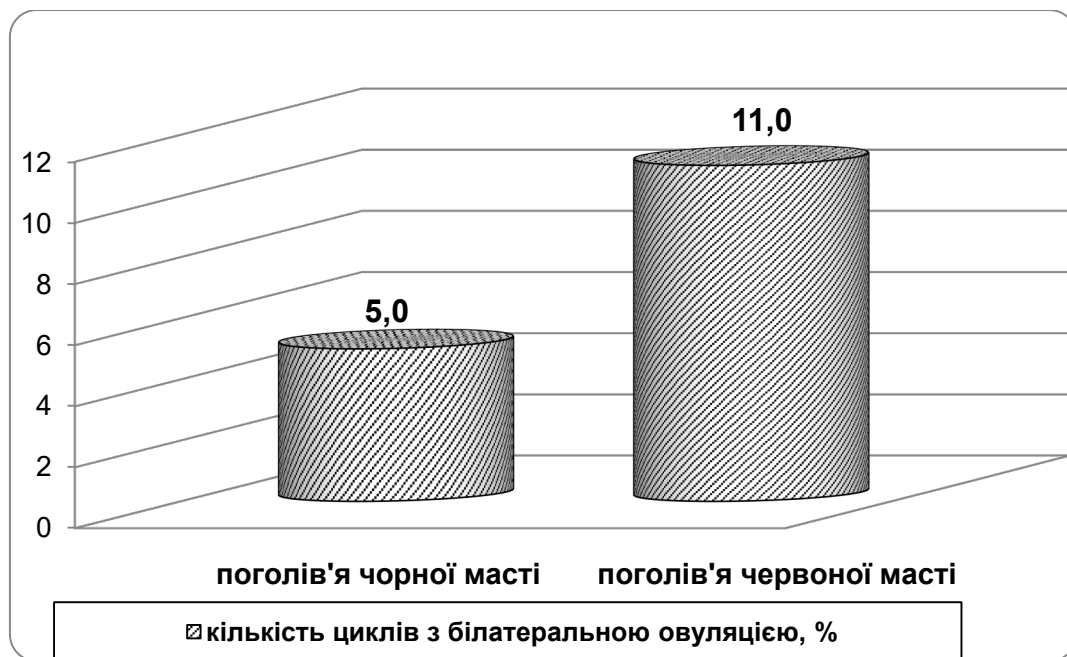


Рис. 2.3. Поширеність білатеральних овуляцій серед корів чорної та червоної масті

Нами висвітлено морфологічні особливості функціонування яєчників корів молочних порід як біологічної основи для удосконалення біотехнологічних методів відтворення великої рогатої худоби. Результати проведеного осіменіння корів у двох стадах (ДП «ДГ ім. Декабристів Інституту свинарства і АПВ НААН» – корів айрширської породи, СТОВ «Агрофірма Петродолинське» – помісне поголів'я УЧМ породи різної кровності за імпорнтними червоно-рябими голштинами) виявляють біологічне значення білатеральних овуляцій. Серед корів у 0-й день статевого циклу під час осіменіння зафіксовано 11,54% і 29,76% білатеральної локалізації домінантних фолікулів і овуляції, відповідно (табл. 2.4). А в ході діагностики відмічено, що настання тільності серед цих же груп на білатеральну активність яєчників припадало 73,33% і 44,00% плідних циклів відповідно. Серед корів з подвійними овуляціями стали тільними в стаді чистопорідних айрширів в 1,37 рази більше, а серед корів УЧМ породи – відповідно в 2,28 рази.

Отже, дозрівання двох яйцеклітин у корів під час стадії статевого збудження (як в правому, так і в лівому яєчниках) підвищує результативність запліднення та збереження тільності в умовах молочних ферм промислового типу. Слід зауважити, що в обстежених корів упродовж лютеїнової стадії статевих циклів не встановлено наявності білатеральних жовтих тіл з типовою морфологією.

2.4. Вплив білатеральності домінуючих фолікулів яєчників корів на рівень ефективності штучного осіменіння

Локалізація домінантних фолікулів та овуляцій в 0-й день циклу	ДП «ДГ ім. Декабристів Інституту свинарства і АПВ НААН»				СТОВ «Агрофірма Петродолинське»			
	всього ШО		стали тільними		всього ШО		стали тільними	
	гол., п	%	гол., п	% до виявлених в 0-й день	гол., п	%	гол., п	% до виявлених в 0-й день
Одиночні *	115	88,46	75	65,22	84	77,06	31	36,90
Білатеральні	15	11,54	11	73,33	25	29,76	11	44,00
Разом (М ± m)	130	100	86	66,15 ± 5,73**	109	100	42	38,53 ± 5,02***

Примітка: * – право- або лівостороння локалізація одиночних овуляцій;

** – за даними УЗД; *** – за даними фактичних отелень (враховано вибуття тільних, аборти)

Таким чином, упродовж тривалого дослідження на великому масиві корів різних молочних порід встановлено ряд закономірностей фолікулярної активності яєчників як парних органів та особливості їх латерального морфогенезу. Експериментальним шляхом висвітлено біологічний сенс білатеральних овуляцій як морфологічного резерву підвищення репродуктивного потенціалу лактуючих корів, на який впливають генетичні фактори, що має підтвердження в дослідях вітчизняних науковців. Вірогідно окреслена закономірність є проявом стабілізуючого відбору в популяціях сучасних молочних порід. Як встановлено нашими дослідженнями функціональної асиметрії яєчників корів, білатеральність як структурний елемент латерального диморфізму органів окреслює межі гармонізації репродуктивної функції за рахунок структурно-морфологічних резервів парних гонад.

Вивчення умов, які сприяють дозріванню двох яйцеклітин за один статевий цикл у племінних корів, висвітлює практичне значення білатеральних овуляцій в технології штучного осіменіння.

ВИСНОВКИ

1. Експериментально встановлено, що серед поголів'я корів молочних порід білатеральні овуляції становлять у середньому 8,7%, що збільшує кількість придатних до запліднення дозрілих яйцеклітин.

2. Статистичний аналіз результатів диференційної пальпаторної діагностики парних яєчників корів виявив значні коливання кількості білатеральних овуляцій у різних молочних стадах за впливу чинників генетичного і паратипового характеру.

3. Встановлено негативний вплив підвищення молочної продуктивності на кількість білатеральних овуляцій впродовж перебігу статевих циклів: з середнім надоем не більше 5 000 кг молока за лактацію відмічено 12,88% білатеральних овуляцій, а в стадах з надоем від 6000 до 10 000 кг молока, цей показник в середньому становив 4,02%.

4. Експериментально встановлено фізіологічне значення білатеральних овуляцій у корів для забезпечення біологічної адаптації до змін середовища і стабілізації репродуктивної функції молочного поголів'я за рахунок дозрівання другої яйцеклітини впродовж одного статевого циклу.

5. Експериментально встановлено, що рівень тільності після штучного осіменіння у корів з білатеральними овуляціями на 7,61% вище, порівняно з овуляції одного фолікула.

6. Необхідно добирати корів, схильних до білатеральних овуляцій. Це є додатковим фізіологічним фактором підвищення рівня відтворення поголів'я.

7. Вищий рівень заплідненості у корів з білатеральними овуляціями свідчить про необхідність диференційної діагностики морфофункціональних утворень яєчників для добору тварин-реципієнтів для трансплантації ембріонів.

ВИКОРИСТАНІ ЛІТЕРАТУРНІ ДЖЕРЕЛА

1. Бугров О. Д. Виявлення і вибірка корів і телиць у статевій охоті : метод. рек. Харків : НААН, Ін-т тваринництва, 2014. 114 с.

2. Давидова Ю. Ю. Вплив морфометричних показників на розмір та кількість функціональних утворень яєчника. *Науково-технічний бюлетень*. Харків, 2006. № 94. С. 121–124.

3. Давидова Ю. Ю. Морфологічні зміни фолікулів та жовтих тіл у природному статевому циклі у корів. *Науково-технічний бюлетень*. Харків, 2006. № 92. С. 32–38.

4. Дуванов О. В. Морфологічна характеристика жовтих тіл яєчників і ефективність стимуляції поліовуляції корів-донорів. *Розведення і генетика тварин*. Київ, 2011. Вип. 45. С. 63–68.
5. Емброзе Дж. Фактори, що впливають на плідність корів. *Ветеринарна практика*. 2015. № 4. С. 38–46.
6. Мельник В. О., Сідашова С. О. Акушерство, гінекологія і біотехнологія відтворення тварин. Конспект лекцій. Миколаїв : МНАУ, 2013. 140 с.
7. Передрій М. М., Дзіцюк В. В. Каріотипова мінливість корів української червоно-рябої молочної породи з різною відтворною здатністю. *Розведення і генетика тварин*. Київ, 2017. Вип. 53. С. 235–240.
8. Прітикін М. УЗД замість пальпації. *Farmer*. 2012. № 11. С. 118–119.
9. Сідашова С. О. Анатомічні і функціональні зміни яєчників самок великої рогатої худоби. *Розведення і генетика тварин*. Київ, 2011. Вип. 45. С. 236–246.
10. Сідашова С. О. Результативність відтворення дійного стада і функціональна асиметрія яєчників корів. *Вісник Дніпропетровського державного аграрно-економічного університету*. 2014. № 2 (34). С. 175–181.
11. Сідашова С. О., Сагло О. Ф. Функціональна асиметрія гонад самиць свиней і ВРХ: методологія вивчення, фундаментальні і прикладні аспекти. *Свинарство*. Полтава, 2014. Вип. 64. С. 91–105.
12. Сідашова С. О. Енантіоморфно-домінантний принцип організації функціональної асиметрії гонад корів і телиць. *Біологічні аспекти технології тваринництва і виробництва продукції* : матеріали IV між-нар. наук.-практ. конф. Миколаїв, 2017. С. 49–63.
13. Юлевич О. І., Ковтун С. І., Гіль М. І. Біотехнологія. Миколаїв : МДАУ, 2012. 476 с.
14. Яблонський В. А. Ветеринарне акушерство, гінекологія та біотехнологія відтворення тварин з основами андрології : підручник / за ред. В. А. Яблонського. Вінниця : Нова книга, 2011. 608 с.

Розділ 3.

ОРГАНІЗАЦІЯ ТРЕНІНГУ З ДІАГНОСТИКИ СТАНУ ЯЄЧНИКІВ КОРІВ І ТЕЛИЦЬ ЗА ТРАНСПЛАНТАЦІЇ ЕМБРІОНІВ

На сучасному етапі розвитку молочної галузі велике значення належить ефективному застосуванню науково-обґрунтованих способів управління репродукцією маточного поголів'я великої рогатої худоби. У збільшенні сталого виробництва продукції скотарства в умовах промислових технологій зростає значення прискореного розмноження високопродуктивних корів для окупності праці, кормів, вартісного обладнання.

Особливу вагу ефективно відтворення набирає у випадках застосування високопродуктивних корів як донорів ембріонів, що є цінним генетичним ресурсом сучасного скотарства.

Основними методами підвищення продуктивності худоби є використання племінних і товарних стад, що комплектуються з тварин сучасних спеціалізованих молочних порід з високим генетичним потенціалом. Репродуктивні біотехнології – штучне осіменіння корів і телиць кріоконсервованою спермою кращих плідників, застосування сортованої за статтю сперми та нехірургічна трансплантація ембріонів реципієнтам від тварин з рекордною продуктивністю стають ключовими структурно-організуючими ланками сучасних промислових молочних підприємств у всіх провідних країнах світу з розвиненим скотарством.

Успішне проведення штучного осіменіння або трансплантації ембріонів з вибором точного часу для біотехнологічних процедур залишаються в ряду найважливіших факторів рентабельного ведення підприємства, а ріст концентрації поголів'я та капіталоемності ферм тільки все більш актуалізує ці завдання.

Сучасні знання про статевий цикл, науково-обґрунтовані гормонограми, ритм вибірки корів і телиць в стадії статевого збудження й оптимальний час проведення штучного осіменіння (ШО) та інших біотехнологічних процедур забезпечують своєчасний і високий рівень фертильності маточного поголів'я.

Метою рекомендацій з організації тренінгу з діагностики стану яєчників корів і телиць було розширення можливостей такої діагностики

для регуляції відтворення молочного стада з допомогою методики візуалізації даних ректальної діагностики яєчників. Це базується на сучасних уявленнях про анатомо-фізіологічні особливості статевих органів корів і телиць, нейрогуморального статусу їх статевого циклу у взаємозв'язку з особливостями етології тварин в умовах промислових ферм.

Практичне оволодіння способами візуалізації даних ректальної діагностики яєчників є основою ефективного узагальнення оперативної інформації стану стада та розуміння особливостей відтворення тварин в умовах інтенсивного виробництва для зооветеринарних спеціалістів, операторів штучного осіменіння та трансплантації ембріонів великої рогатої худоби, студентів зооветеринарного та біологічного профілів.

3.1. Значення диференційної діагностики стану яєчників корів та телиць у програмах управління репродукцією молочного стада

Огляд літературних джерел та багаторічний моніторинг стану відтворення поголів'я великої рогатої худоби в господарствах різних форм власності України свідчить про необхідність підвищення кваліфікації зооветспеціалістів з врахуванням умов утримання та технологій експлуатації спеціалізованих молочних порід.

Технологія репродукції корів та телиць базується на біологічних особливостях їх відтворення, що склались за тривалий період еволюції тваринного світу та мають досить сталий прояв закономірностей. Але за останні роки, в результаті переходу тваринницької галузі на промислові інтенсивні технології, суттєво змінились умови утримання, вирощування, годівлі, експлуатації молочної худоби. Тиск техногенних стресів не може не відбиватися на функціонуванні систем забезпечення життєдіяльності тварин в умовах промислових комплексів, в тому числі на діяльності органів репродуктивної системи.

Загальновідомо, що у корів та телиць початок статевої активності формується в головному мозку, а саме – гіпоталамусі, шляхом акумуляції зовнішніх відчуттів, отриманих з довкілля (зорових, нюхових, слухових, тактильних тощо). Під впливом їх інтегрованої дії у організмі самиць утворюється певний гормональний фон. Зокрема, в гіпоталамусі продукується та періодично виділяється у кров гонадотропін-релізінг-гормон, що спонукає в гіпофізі секрецію фолікулостимулюючого гормону. Останній, після надходження з кров'ю в яєчники, викли-

кає в них ріст і дозрівання одразу декількох фолікулів (початок фолікулярної фази статевого циклу). У процесі дозрівання в порожнині фолікулів накопичуються інші статеві гормони – естрогени (естрон, естрадіол, естріол та ін.). Досягнувши певного рівня концентрації у крові, естрогени зумовлюють статеве збудження з відповідними морфо-функціональними процесами в органах розмноження й етологічними проявами.

Статева поведінка корів та телиць має інстинктивний характер, а інстинкт розмноження в своїй біологічній основі є парним. В умовах вирощування та утримання корів та телиць великими одностатевими групами, їх поведінка, залишаючись за зовнішньою формою такою ж, як у різностатевому стаді, набуває іншого змісту. Відсутність бугая, контакт з яким є пусковим фізіологічним механізмом синхронності перебігу різних етапів стадії збудження статевого циклу, формує несинхронність у прояві певних зовнішніх ознак статевих рефлексів і процесів дозрівання фолікулів з наступною овуляцією з кореляцією невідповідності до гормонального фону. Статева циклічність корів і телиць в умовах більшості господарств промислового типу формується як штучно неповноцінна, тобто – алібідна, з причини відсутності в переважній більшості стад бугая-пробника, як біологічного сигналу запуску та перебігу синхронного прояву стадії їх статевого збудження.

Опорним показником для проведення біотехнологічних процедур з відтворення корів та телиць є чітка діагностика функціонального стану морфологічних утворень яєчників, визначених спеціалістом. Стосовно визначеного строку шляхом пальпаторної діагностики терміну початку або закінчення овуляції домінантного фолікулу, стадії розвитку жовтого тіла (ЖТ) циклу можливо своєчасно планувати їх штучне осіменіння (ШО) або трансплантацію ембріонів (ТЕ) з ефективним отриманням тільності.

Узагальнення даних анонімного тестування зооветспеціалістів, відповідальних за відтворення великої рогатої худоби в господарствах різних форм власності, яке ми проводили впродовж тривалого терміну (з 2005 до 2018 року), засвідчило, що переважна більшість з них невпевнено орієнтується у визначенні стадії статевого циклу, має неточні уявлення щодо морфометричної і морфо-функціональної видової норми яєчників. Навички ректального дослідження у більшості опитаних є поверхневими, а широкі впровадження в сучасних молочних проми-

слових підприємствах УЗ-сканерів різної конструкції в більшості випадків не покращувало показники відтворення стада. Більше того, відмічено підвищення неточності у сприйняття візуалізованої за допомогою ультразвукового монітору картини фізіологічного або патологічного стану яєчників корів та телиць внаслідок викривлення первинної інформації, що попередньо пройшла складну апаратну обробку.

3.2. Науково-методологічне обґрунтування методики візуалізації результатів ректальної діагностики функціонального стану яєчників корів і телиць

Стислий теоретичний курс щодо анатомо-фізіологічних особливостей репродуктивної системи корів та телиць надається стажерам перед початком проведення практичних тренінгів, особливу увагу приділяють інформації щодо функціонування яєчників, як ключових органів, в наступних технологічних операціях з регуляції статеві циклічності тварин і планування відтворення всього стада.

В склад статевих органів корів та телиць входять: статеві губи, пристінок піхви, клітор, піхва (вагіна), матка та роги матки, яйцепроводи й яєчники.

Яєчники (*ovarium, s. oophoron*) – це парні статеві органи, у яких утворюються, розвиваються та дозрівають яйцеклітини. Одночасно гонади виконують функцію статевих залоз, де утворюються статеві гормони – естрадіол, естрон, естріол (фолікулярний гормон) і гормон жовтого тіла – прогестерон.

Зовні яєчник вкритий зародковим епітелієм із кубічних клітин. Внутрішня частина поділяється на зони: зовнішню – коркову (фолікулярна, паренхіматозна) і центральну – мозкову частину (судинну), що складається з пухкої сполучної тканини, судин, нервів і м'язових волокон.

Яйцеклітини дозрівають в яєчниках із клітин зародкового епітелію в процесі овогенезу. Послідовність овогенезу передбачає етапи поділу, росту та дозрівання. Клітини зачаткового епітелію посилено розмножуються типовим мітозом, відщеплюються від епітелію та поступово врастають вглиб. Одна з цих клітин розвивається у ооцит, а інші – у фолікулярні клітини. В ооцитах зберігається парне число хромосом на стадіях оогонії та ооцитів першого порядку.

Після настання статевої зрілості й статевої циклічності ооцит першого порядку вступає в період великого росту або вітелогенезу. У цей

період інтенсифікується ріст ооплазми та змінюється ядерно-цитоплазматичне співвідношення. Ооплазма збільшується за рахунок екстрагонадного типу харчування (за допомогою фолікулярних клітин, що оточують ооцит першого порядку). Функція фолікулярних клітин полягає у забезпеченні надходження в ооцит живильних речовин, синтез яких здійснюється в організмі самиці поза яєчником. З крові поживні речовини можуть надходити в ооцит тільки після проходження бар'єру з фолікулярних клітин.

Ооцит, який досяг в період вітелогенезу найбільшого розміру, ще не має структури та функцій яйцеклітини, здатної до запліднення, досягаючи стадії метафази I мейозу. Для того, щоб сформувалась здатність до запліднення, ооцит повинен пройти стадію дозрівання з двома розподілами мейозу. При першому з ооциту першого порядку утворюються дві клітини. В одну з них (перше полярне тільце) відходить незначна частина цитоплазми, а вся інша – в другу, яка стає ооцитом другого порядку.

Під час поділу ооциту другого порядку з'являється одна мала клітина – друге направляюче тільце й велика клітина – гамета або яйцеклітина, яка містить гаплоїдну кількість хромосом. У ссавців ооцит другого порядку ділиться після овуляції, а з кожного ооцита першого порядку утворюється одна яйцеклітина та три полярних тільця. Увесь період мейозу, починаючи від перетворення ооцита першого порядку та закінчуючи другим дозріваючим поділом і утворенням зрілої яйцеклітини, становить 24–27 годин. В цей час відбувається групування хромосом, які визначають генотип майбутнього організму з материнського боку.

З утворенням ооцита першого порядку фолікулярні клітини розмножуються та утворюють навколо ооцита одношарову оболонку, що формує в цілому первинні (примордіальні) фолікули. За подальшого розвитку фолікулярні клітини розмножуються, оточують ооцит багатшаровою оболонкою й утворюють порожнину, яка поступово збільшується та заповнюється фолікулярною рідиною, відтискаючи фолікулярні клітини до периферії фолікулу. Фолікули з появою другого шару фолікулярних клітин і до утворення в них порожнини мають назву вторинних. По мірі дозрівання фолікул зростає, збільшується в розмірах, виступає на поверхні яєчника у вигляді горбика.

Зрілий фолікул покритий сполучнотканинною оболонкою, що складається з трьох шарів: зовнішня – фіброзна, внутрішня – судинна,

між ними розташована тонка базальна оболонка, що прилягає до багатошарового фолікулярного епітелію. На вирості епітелію в середині фолікула – яйценосному горбику – перебуває ооцит другого порядку під час розвитку. Фолікули, що розвиваються, з моменту утворення в них порожнини до овуляції мають назву третинних (везикулярних).

Процес розриву фолікула з одночасним виходом яйцеклітини називається овуляція. Під час овуляції внаслідок дії ферменту гіалуронідази багатошаровий епітелій (гранульоза) фолікула розпушується, яйцеклітина разом з яйценосним горбиком відокремлюється від стінок фолікула, його стінки тоншають і руйнуються, через що утворюється отвір у оболонці. Ооцит другого порядку виходить разом з фолікулярною рідиною та клітинами фолікулярного епітелію, ділиться й утворює яйцеклітину на стадії метафаза II, що придатна до запліднення.

У фолікулі, що зростає та розвивається, утворюється фолікулярний гормон (естрадіол). Під його впливом відбуваються складні зміни в статевих органах і поведінці корів і телиць – тічка, статеве збудження, статевий пошук та охота.

Після овуляції яйцеклітина разом із рідиною фолікула потрапляє в лійку яйцепроводу, в просторі якого пересувається за допомогою коливань миготливого епітелію до рогів матки. На місці фолікула, що овулював, утворюється тимчасова залоза внутрішньої секреції – ЖТ, яке виробляє статевий гормон – прогестерон. Цей гормон забезпечує нормальний процес імплантації ембріону та збереження тільності упродовж перших місяців вагітності самиці. Прогестерон гальмує розвиток фолікулів, прояв тічки та статевого збудження, сприяє розвитку матки під час вагітності, забезпечуючи відповідні умови для розвитку і живлення плоду.

Як відомо, ЖТ формується впродовж 3–5 днів на місці овульованого фолікула, із складок його стінки. У гранульозну тканину часточкових структур ЖТ проростають спочатку капіляри: від краю розриву ростуть центрипетально і разом з лютеоцитами утворюють верхівку ЖТ, яка на часточки не розділяється. Після овуляції устанавлюються дві мікроциркуляції: внутрішня синусоїдальна капілярна сітка на дні фолікула та розташована зверху неї наново утворена капілярна сітка ЖТ.

ЖТ утворюється під впливом лютеїнізуючого гормону за рахунок лютеїнізації клітин теки та гранульози. З клітин гранульози утворюються великі клітини раннього циклюючого ЖТ, а більшість малих – з

клітин теки інтерна. Малі клітини перетворюються у великі, в міру дозрівання ЖТ. За даними українських науковців, співвідношення великих і малих лютеоцитів динамічне, і визначає в перебігу термінів лютеїнової фази циклу величину та характерну морфологію ЖТ від ростучого до зрілого, а потім регресованого (у стадії лізису).

За даними чисельних досліджень яєчники корів мають в середньому наступні морфометричні параметри: довжина – 2–4 см, ширина – 1–2, товщина – 1,5–2 см. За формою частіше всього зустрічаються яєчники овально-подовженої форми, наближеної до округлої, але багаточисельні дослідники відмічають як біологічну особливість анатомії гонад самиць великої рогатої худоби – дуже велику варіабельність у розмірах і будові яєчників, що, безсумнівно, впливає на точність діагностики як пальпаторно, так і з використанням апаратних методів, наприклад, ультразвукових сканерів різної конструкції.

Застосування методики візуалізації даних пальпаторної діагностики яєчників оптимізує процес визначення морфо-функціонального стану корів та телиць залежно від фізіологічного періоду тварини, фази статевого циклу, наявності функціональних або патологічних відхилень і дозволяє зробити більш точний прогноз очікуваного запліднення залежно від прийнятого в господарстві способу відтворення тварин (ШО або ТЕ).

Враховуючи вказане вище, ми розробили оптимізований, ефективний, доступний та надійний спосіб засвоєння навичок диференційної діагностики фізіологічного або патологічного стану яєчників корів і телиць з врахуванням поліморфності анатомічної будови корів та телиць, закономірних або патологічних змін статевих органів. При цьому брались до уваги особливості самої діагностики тварин в режимі реального часу, коли не всі процедури та практичні навички можуть мати формальне пояснення. Методологічною інноваційною особливістю розробленого способу візуалізації результатів ректального дослідження яєчників корів і телиць є внесення в навчальний процес закріплених знань – виготовлення візуалізованої наочної моделі даних пальпаторної діагностики яєчників із обов'язковим чітким виконанням фізіологічної і технологічної поетапності.

Візуалізація та простота виготовлення отриманих пальпаторно даних в режимі реального часу у вигляді моделі (з дотриманням реальних розмірів, об'єму, анатомічних і морфологічних деталей), дозволяє забезпечити єдине бачення для групи стажерів і інструктора. У підсумку

можна коригувати, прогнозувати та вибирати варіанти розвитку фізіологічних процесів, що стосуються розвитку яєчників, спираючись на попередній досвід і зафіксовані в моделях варіанти морфології гонад.

Зважаючи на складнощі вербалізації тактильних відчуттів, об'ємна модель яєчників, зроблена відповідно до бачення кожного учасника процедури ректальної пальпації, відбиває як індивідуальне розуміння фізіологічних процесів, що проходять наразі в організмі корів та телиць, так і можуть бути узагальнені та інтегровані в спільний висновок і прогноз групи спеціалістів та експертів.

Розроблена методика включає елементи сучасної педагогічної супервізії, що значно оптимізує процеси практичного засвоєння базових діагностичних знань і навичок, потрібних для щоденної зооветеринарної діяльності спеціалістів з відтворення ВРХ.

3.3. Методичний підхід до організації тренінгів із засвоєння методу візуалізації результатів ректальної діагностики яєчників корів та телиць

Інтегровані теоретично-практичні заняття проводяться в умовах виробництва на робочому місці спеціалістів зі ШО або ТЕ. В організаційній структурі тренінгів застосовано модульний принцип, що забезпечує пластичність доведення матеріалу та можливість використання цільових підходів для вирішення виробничих завдань в процесі навчання.

На початку тренінгів група стажерів ознайомлюється з правилами дотримання безпеки поведінки на робочому місці та охорони праці. Всі процедури з тваринами проводяться в спеціальному станку, під час процедур тваринам не завдається болю та шкоди їх здоров'ю.

Загальна організаційна схема проведення занять складається з наступних етапів:

- теоретична підготовка;
- добір групи тварин з попередньо визначеним функціональним станом яєчників і чіткими морфологічними ознаками будови гонад, відповідно до стадії статевого циклу та врахуванням поліморфізму будови статевих органів;
- вибір матеріалів для виготовлення об'ємних моделей яєчників;
- організація групового проведення ректальної діагностики корів та телиць в умовах господарства;

- відпрацювання стажерами навичок диференційної ректальної діагностики на коровах та телицях з наступним виготовленням моделей за отриманими даними пальпації;
- обговорення особливостей сприйняття тактильної інформації різними стажерами, порівняння моделей, уточнення варіантів візуалізації характерних морфо-функціональних утворень яєчників, діагностованих різними стажерами та інструктором;
- аналіз даних, отриманих тактильною та зоровою системами різних людей і визначення типових помилок та шляхів їх уникнення.

Для виготовлення моделей добирають доступний пластичний матеріал, наприклад: пластилін, синтетичні (акрилові) речовини, моделін (рис. 3.1); можливе використання іншої сировини. Кожна людина, згадуючи свій шкільний досвід роботи з пластичними матеріалами, здатна до формування з пластиліну або моделіну зразку об'ємної моделі яєчника, який тільки попередньо було пропальповано під керівництвом інструктора.



Рис. 3.1. Пластичні матеріали, що використовуються для виготовлення об'ємних моделей яєчників: зліва – пластилін, справа – моделін

Відповідно до конкретних завдань виробництва та умов проведення тренінгів, доцільно підключати до суми діагностичних параметрів показники, отримані за допомогою УЗ-сканерів різної конструкції та додаткову інформацію від огляду розтинів з контрольних діагностичних забоїв тварин.

На відміну від інших методів вивчення морфологічної структури яєчників корів та телиць, сукупність даних, отриманих способом «ректальна діагностика + візуалізація результатів за допомогою виготовлення моделей яєчників + групове обговорення результатів» дає більш

цілісну та достовірну картину функціонування цих складних органів, що мають одночасно генеративну та гормонально-секреторну функцію.

До переваг пропонованої методики можна віднести наступне:

- засвоєння навичок візуалізації даних ректальної діагностики суттєво стимулює здібності стажерів у розумінні фізіологічних або патологічних особливостей перебігу статевої циклічності, що змінюються залежно від умов утримання та експлуатації;
- отримання узагальненої інтегрованої сукупності даних щодо будови і функції яєчників за допомогою тактильного та зорового сприйняття інформації;
- отримання інформації без викривлення апаратними фільтрами, безпосереднє визначення та порівняння морфометричних показників;
- можливість оцінити візуально (на моделях) одразу лівий і правий яєчники кожної самиці, а також зробити порівняльний аналіз яєчників різних тварин залежно від їх фізіологічного стану та стадії статевого циклу;
- визначення функціональної асиметрії яєчників даної популяції та динаміку цього процесу;
- чітко встановити кількість іпсилатеральних варіантів ЖТ для ТЕ;
- накопичення даних в колекції і долучення колективного обговорення групи стажерів для аналізу результатів та корекції відхилень від реальної морфологічно-функціональної картини стану яєчників корів або телиць.

Серед недоліків методики потрібно відмітити випадки індивідуальних особливостей тактильної сенсорики різних людей і важкість для них оцінки інформації, отриманої різними каналами відчуттів. Для зменшення важкості засвоєння методики в проведенні курсу приділяється увага індивідуальній роботі зі стажерами та залучення колективного аналізу візуалізації результатів ректального дослідження яєчників різних тварин, що упорядковує отриману інформацію для розуміння фізіологічних процесів, які проходять в репродуктивній системі.

З метою полегшення навчального процесу для групи стажерів-початківців бажано добирати для тренінгу телиць, тому що у них фізіологічна норма будови статевих органів найбільш близька до видової. Для стажерів з досвідом роботи, найбільш цікавими є варіанти анатомічної будови яєчників корів.

Після закріплення у стажерів практичних навичок за схемою **«пальпація – візуалізація даних – моделювання – корекція моделі – вірний прогноз»** (рис. 2) в сигнальні терміни нормального фізіологічного статевого циклу, що входить в базовий курс-тренінг, надаються подальші практичні рекомендації до діагностики більш складних фізіологічних змін в морфології гонад або диференційна діагностика відхилень. Накопичена впродовж курсу колекція моделей яєчників обстежених тварин в різні строки статевої активності або статевого спокою дозволяє узагальнити та проаналізувати діагностичний процес в динаміці та показати ріст діагностичної кваліфікації стажерів.

Викладені в даному посібнику рекомендації актуалізують принципи концепції дуальної освіти шляхом професійно-орієнтованої організації навчання спеціалістів зооветеринарного профілю та підвищення кваліфікації спеціалістів діючих підприємств молочної галузі.

3.4. Підготовка до проведення процедур ректального дослідження статевих органів корів та телиць

Відповідно до діючого законодавства України та чинних положень щодо організації роботи з охорони праці в тваринництві, що викладені в «Інструкції зі штучного осіменіння корів і телиць», а також в «Інструкції з трансплантації ембріонів великої рогатої худоби», перед початком практичних тренінгів (рис. 3.2) відповідальна особа господарства для стажерів проводить вступний інструктаж для засвоєння загальноприйнятих безпечних прийомів роботи під час відповідних біотехнологічних і діагностичних маніпуляцій.

На конкретній ділянці, де проводиться тренінг, відповідальний співробітник господарства проводять для стажерів інструктаж на робочому місці. У програму цього інструктажу входять: ознайомлення з технологічним процесом на даній ділянці, правилами фіксації тварин та поводження обслуговуючого персоналу, користування небезпечними зонами та запобіжними пристроями, інвентарем і обладнанням, що застосовується під час роботи, підготовкою до роботи обладнання, тварин, приведенням у порядок спецодягу та індивідуальних захисних засобів тощо. Також стажерів ознайомлюють з безпечними методами фіксації тварин, проведення процедур з діагностики та біотехнологічних операцій, користуванням фармакологічними засобами й їх дозуванням для забезпечення нерухомості тварин під час проведення прийомів.

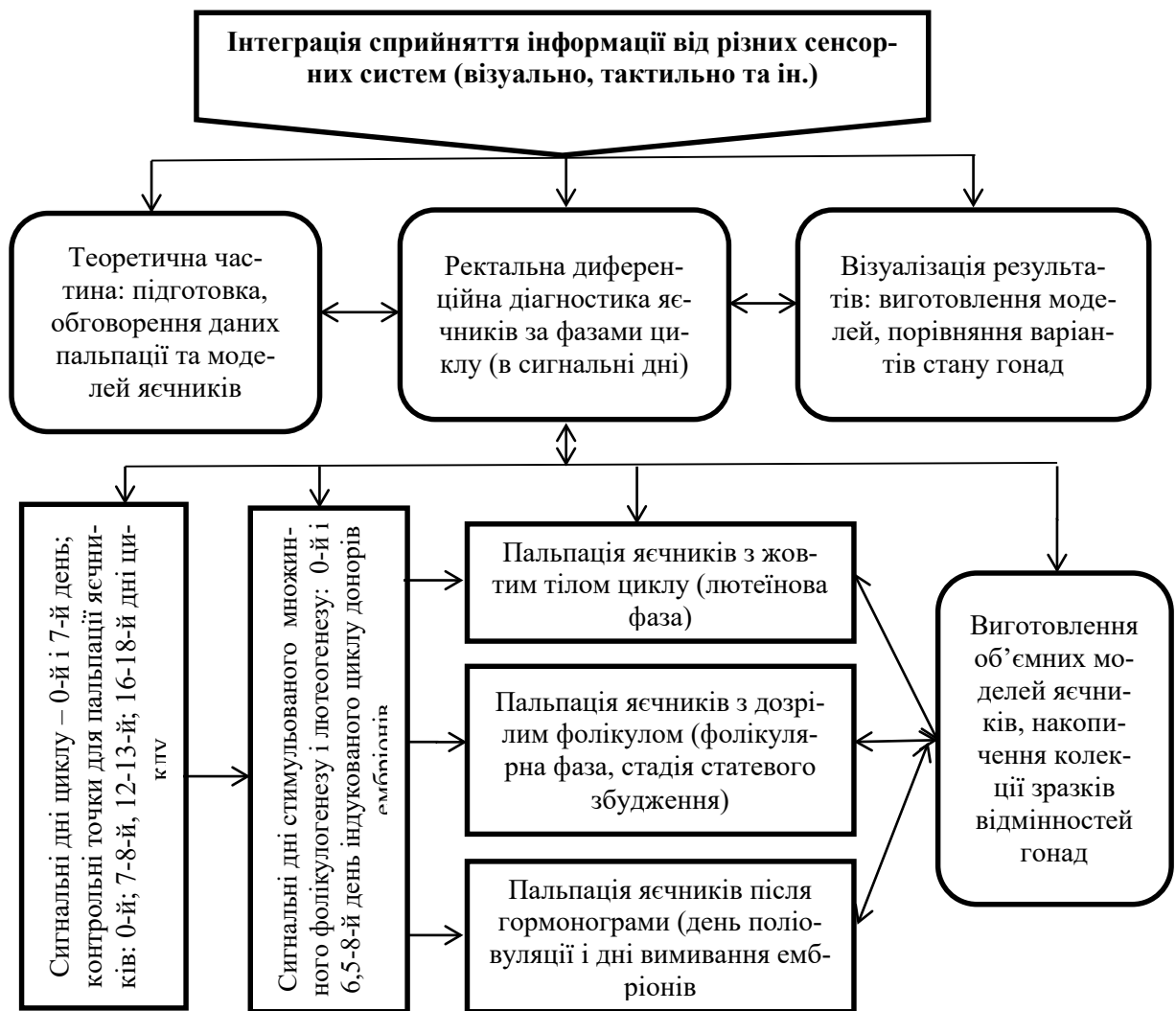


Рис. 3.2. Загальна організаційна схема проведення практичних тренінгів з освоєння методики візуалізації за допомогою об'ємних моделей результатів ректальної діагностики яєчників корів та телиць

Ділянка проведення тренінгу повинна відповідати загальним санітарно-гігієнічним вимогам, всі учасники тренінгу забезпечуються відповідним спецодягом і взуттям.

Всі діагностичні прийоми під час тренінгу проводяться на клінічно здорових тваринах, яких фіксують у спеціальному станку, під час маніпуляцій тварині не завдають болю та не допускають нанесення шкоди їх здоров'ю.

3.5. Візуалізація результатів диференційної діагностики активного жовтого тіла яєчників телиць на 7–8 день статевого циклу

Завдання 1. Провести ректальне дослідження групи телиць парувального віку, що перебувають в стадії статевого спокою, для визначення розмірів і морфологічних особливостей будови жовтого тіла яєчників з метою засвоєння прийомів добору телиць-реципієнтів для трансплантації їм ембріонів.

Спочатку інструктор за списком з попередньо отриманими даними обліку статевої циклічності групи ремонтних телиць («Журнал штучного осіменіння корів і телиць Ф-10 мол» або комп'ютерна база даних підприємства) проводить ректальне обстеження телиць, у яких було зафіксовано статеве збудження за 7–9 днів до цього. Рекомендовано попередньо провести гормональну синхронізацію групи незапліднених телиць парувального віку препаратами синтетичних аналогів простагландинів ПГ 2α (Естрофан, Ензапрост та ін.) і проводити тренінг у фіксований день. Після пальпаторного встановлення наявності функціонального ЖТ, морфометрично та морфологічно типового щодо стадії 7–8 дня лютеогенезу телиць, їх ректально досліджують стажери, вносячи у список дані відповідно до попередньо узгодженого переліку та формату скорочених записів.

Наступним кроком є надання для ректальної пальпації стажерам тварин з яєчниками, які не відповідають фізіологічним нормативам розвитку 7–8 дня статевого циклу (лізовані ЖТ, патологічні – кістозні), що створює виразне уявлення щодо різниці у розмірах, морфології, консистенції, контурах тимчасового органу за функціональних відхилень або патології порівняно з нормою.

Під час ректальної діагностики фіксуються наступні параметри: морфометричні (розмір в довжину, ширину, висоту правого та лівого яєчників кожної телиці), розмір і контури ЖТ, його консистенцію за тактильними відчуттями з особливостями анатомічної будови, яку можливо відчути (контур, що відокремлює ЖТ від фолікулярного шару яєчника, центральну частину з отвором).

Завдання 2. Виготовити моделі яєчників ремонтних телиць-потенційних реципієнтів з пластичного матеріалу. Провести колективне обговорення результатів пальпаторної діагностики.

Після закінчення ректального дослідження чотирьох-семи ремонтних телиць, стажери переходять в аудиторне приміщення та виготовляють об'ємні моделі яєчників, які вони обстежували, відповідно до

отриманих даних. Виготовлені моделі різних авторів розглядаються й оцінюються відносно моделей, зроблених інструктором. В процесі обговорення знаходяться типові помилки, уточнюються складні діагностичні питання, поглиблюються знання стажерів з анатомії, морфології, фізіології статеві циклічності самиць великої рогатої худоби на прикладі отриманих даних морфо-функціонального стану яєчників телиць на 7–8 день після статевих збудження.

На основі порівняння виготовлених моделей яєчників треба зробити обґрунтований висновок щодо придатності конкретних тварин в якості реципієнтів, а також провести аналіз причин виникнення функціональних або патологічних відхилень у діяльності статевих органів телиць, які за результатом діагностики виявились непридатними для трансплантації їм ембріонів.

Найбільш цікаві варіанти моделей яєчників занести до архіву або зафіксувати на фото (рис. 3–6), для наступного порівняння з даними пальпації в подальші строки статевих циклу цих же телиць або з даними від інших тварин.

Диференційна ректальна діагностика яєчників (рис. 3.3) ремонтних телиць, які були попередньо оброблені препаратом синтетичного простагландину ПГ 2 α (Естрофан 1,0 мл) для виклику статевих збудження у фіксований час і мали на момент обстеження 7-й день індукованого статевих циклу, показала наявність у однієї телиці (на фото зверху) морфологічно типового ЖТ циклу, що відповідало за розмірами та морфологічними ознаками нормі та фазі циклу. Додатковими характеристиками під час пальпації стали відповідні тактильні відчуття пальців оператора щодо пружності тканин яєчника і ЖТ, які відрізнялись, типової будови верхівки ЖТ із заглибленням у центрі та визначенням структурної межі розділення між ЖТ і паренхімою гонади. Телиця з такими морфо-функціональними показниками правого яєчника придатна для ролі реципієнта доїмплантаційного ембріона, незважаючи на встановлену гіпофункцію лівого яєчника.

Діагностика яєчників іншої телиці (рис. 3.3, внизу) в той же термін після введення аналогічного препарату не мала морфо-функціональних показників, які відповідають 7 дню індукованого статевих циклу. Обидва яєчники мали ознаки гіпотрофії, ніяких ознак ЖТ не виявлено, такій тварині потрібно провести курс підтримуючої терапії для відновлення нормальної статевих циклічності.



Рис. 3.3. Зразки об'ємних моделей яєчників двох ремонтних телиць з однаковою фазою естрального циклу, зроблені з пластиліну (7 день індукованого статевого циклу)

Примітка. Усі виготовлені моделі та наведені фото об'ємних моделей (на цьому рисунку та далі по тексту) за даними візуалізації ректальної пальпації яєчників з архіву Сідашової С. О. Коментар до всіх фото надається в тексті.

На рисунку 3.4 представлені варіанти поліморфізму у розвитку ЖТ на 8-й день індукованого статевого циклу в групі ремонтних телиць-потенційних реципієнтів. В групі підібрані телиці з ЖТ циклу правого яєчника та вираженою гіпотрофією або гіпоплазією лівого яєчника. За даними ректальної діагностики всі варіанти поліморфізму морфо-функціонального стану яєчників телиць були визнані як нормальний фізіологічний стан функціональної асиметрії. Яєчники та розмір ЖТ суттєво відрізнялись між собою, але мали ключові характеристики функціональності: розмір вкладався в нормативні межі, пальпаторно встановлено центр ЖТ, тактильні характеристики відповідали попередньо встановленим для активного ЖТ. Моніторинг результатів проведених пересадок ембріонів показав настання тільності в усіх трьох реципієнтів.

На рисунку 3.5 показано варіативність сприйняття даних ректальної діагностики однієї і тієї ж тварини різними операторами. Особливістю використання даних ректального дослідження є врахування відхилень у розмірах і сприйнятті форми різних структур правого та лівого яєчників різними операторами.



Рис. 3.4. Об'ємні моделі яєчників трьох ремонтних телиць з однаковою фазою естрального циклу, виготовлені з моделіну (8-й день індукованого статевого циклу)

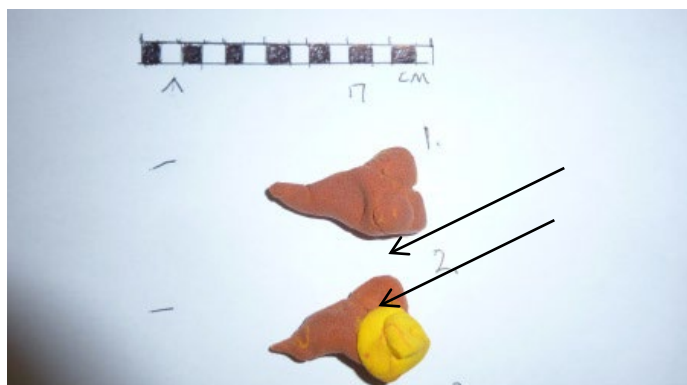


Рис. 3.5. Об'ємні моделі правого яєчника однієї телиці в стадії ЖТ сьомого дня індукованого циклу, які виготовлені різними стажерами з врахуванням особистої здібності до візуалізації даних ректальної діагностики яєчників

Під час візуалізації даних встановлено, що відхилення у розмірах моделей одного і того ж яєчника суттєві, а морфологічні деталі виконані по-різному. Такі розходження у інтерпретації результатів потребують набуття практичного досвіду встановлення чіткого розмежування між функціональними утвореннями яєчників відповідно до стадії статевого циклу та анатомічними утвореннями, що не мають фізіологічного значення для нормального перебігу статевого циклу. Наприклад, часто недосвідчені оператори визначають пальпаторні відчуття від твердих сполучнотканинних утворень, що формувались упродовж попередніх циклів у самиці, а саме – залишків лізованих ЖТ (так зване, біле тіло) як функціонуюче ЖТ поточного циклу. На фото таке нефункціональне утворення показано стрілкою. Справжнє функціонуюче

ЖТ – в центрі яєчника може мати пальпаторно навіть менші розміри, але чітко діагностується за тактильними характеристиками та морфологією. Під час спільного проведення ректальної діагностики та наступного виготовлення моделей, інструктор має можливість в режимі реального часу вказати стажеру на помилковий діагноз з наданням повторної пальпації, що в результаті швидко закріпить практичні навички диференційної діагностики.

Найбільший відсоток помилкових діагнозів недосвідчені оператори ставлять у випадках фронтального ректального дослідження групи ремонтних телиць з невідомим терміном статевого циклу або за відсутності статевої циклічності у тварин. В умовах інтенсивного вирощування ремонтного молодняку за високої концентрації поголів'я на сучасних промислових підприємствах у ремонтних телиць почастишали випадки патологічних процесів у яєчниках, що виникають вже в ранньому онтогенезі. В результаті цих негативних впливів зустрічаються патології, характерні для лактуючих корів, а саме: кістозні дегенерації фолікулів, недостатність лютеальної активності ЖТ.

В курсі тренінгу для проведення диференційної діагностики в групах ремонтних телиць із зафіксованим терміном статевого циклу велике значення має групова методика виготовлення об'ємних моделей яєчників після закінчення навчального ректального дослідження. Серед тварин, у яких інструктором встановлена відсутність функціональних утворень яєчників та/або патологічні утворення, можливі різні діагнози, але метою навчання стажерів є виявлення реципієнтів потенційно придатних до пересаджування ембріонів.

На рисунку 3.6 показані різні варіанти моделей яєчників ремонтних телиць, які непридатні до використання в якості реципієнтів. У 1 і 2 варіанті на поверхні яєчників діагностуються тверді утворення, що стали наслідком попередніх запальних і дегенеративних процесів в яєчнику. Візуалізація дозволяє розглянути деталі диференційної діагностики, бо такі утворення часто сприймаються як ЖТ. Тверді застарілі фолікулярні кісти (3-й варіант) теж пальпаторно можуть бути помилково сприйняті як ЖТ, але за детальним візуалізованим розглядом моделей різницю добре помітно. Можливо додатково застосувати УЗ-сканування для показу внутрішньої порожнини кіст. Найбільш складно діагностуються випадки неповного лізису ЖТ (4-й варіант) на різних стадіях перебігу статевого циклу. Такі патологічні стани, особливо з середини лютеїнової фази циклу (8–13 день), виникають у результаті

впливу складних механізмів розладу гормональної та імунної систем за дії ряду стресових факторів. Хронічний стан такого утворення на моніторі УЗД має вигляд типового ЖТ, але пальпаторна діагностика показує відмінність у тактильних характеристиках. В зв'язку з тим, що таке ЖТ не продукує достатньої кількості прогестерону, тварина з таким діагнозом не придатна для використання в якості реципієнта.



Рис. 3.6. Варіативність морфологічної будови яєчників ремонтних телиць з порушеннями статеві циклічності: анафродизія (1), гіпотрофія (2), гіперплазія, фолікулярна кістозність (3), передчасний лізис ЖТ (4) в середині індукованого статевого циклу

За даними досліджень українських вчених (О. Д. Бугров, 2009) лютеїноюю фазою статевого циклу можна вважати 3–18 добу циклу. Встановлено, що до 13-ї доби ЖТ збільшує свою активність – рівень прогестерону збільшується: спочатку повільно (4-а доба), потім стрімко (9-а доба), і вповільнюється коли сягає максимального рівня (13-а доба). Із 14-ої до 18-ої доби циклу відбувається активний лютеоліз, в результаті чого спостерігається стрімке зниження рівня прогестерону.

Можливість розгляду і групового обговорення результатів візуалізації даних ректальної діагностики яєчників ремонтних телиць дозволяє стажерам швидко набути практичного досвіду розрізняти фізіологічний поліморфізм будови яєчників тварин в різних стадіях статевого циклу та патологічні утворення яєчників.

3.6. Візуалізація результатів диференційної діагностики жовтого тіла яєчників на 10–13 день статевого циклу телиць

Завдання 3. Провести ректальне дослідження групи телиць парувального віку, що знаходяться в стадії статевого спокою, для визначення розмірів і морфологічних особливостей будови ЖТ яєчників для засвоєння прийомів добору групи для організації синхронізації статевої циклічності.

Наступним кроком диференційної діагностики яєчників ремонтних телиць впродовж лютеїнової фази статевого циклу є розгляд ЖТ в стані функціонального розквіту – з 9-го до 12–13 дня циклу (рис. 3.7–3.8).

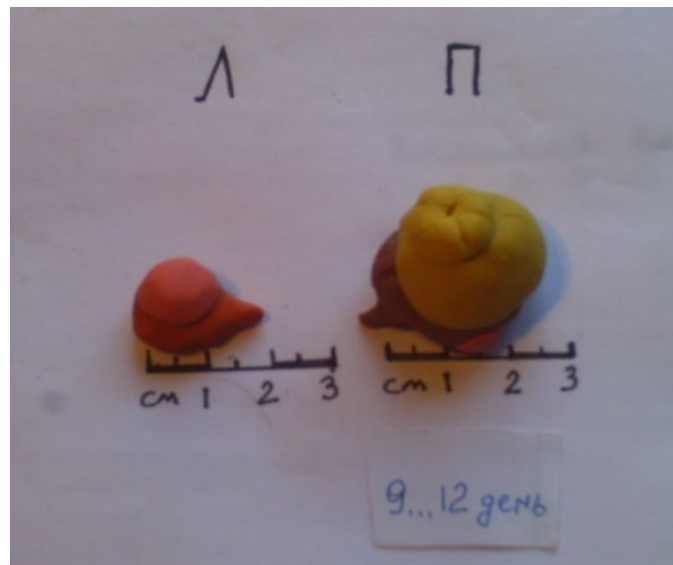


Рис. 3.7. Об'ємна модель яєчників ремонтної телиці з морфологічно типовим ЖТ справа. Телицю можна перевести в групу для синхронізації статевих циклів



Рис. 3.8. Об'ємна модель яєчника ремонтної телиці, яка непридатна для використання в якості реципієнта внаслідок дегенеративних змін фолікулярного шару тканин яєчника (правого): пальпується фолікулярна кіста з розмірами 2×1,5×1,2 см

Після проведення навчального ректального дослідження групи телиць, інструктор відбирає найбільш типову тварину з ЖТ для подальшого навчання. Потім в аудиторії стажери виготовлять об'ємну модель яєчника і обговорюють різні варіанти особливостей візуалізації пальпаторних даних. Одночасно моделі порівнюються з тими випадками, коли були виявлені гонадопатії, розмір яких може призвести до помилкового діагнозу. Наприклад, фолікулярні кісти можуть бути твердими під час пальпації і не дають відчуття флуктуації кістозної рідини (рис. 3.8). Такі утворення не мають центрального заглиблення, виразного контуру відмежування від тканин яєчника. Підтвердженням діагностики може бути УЗД.

3.7. Візуалізація результатів диференційної діагностики у телиць жовтого тіла яєчників у стадії лізису на 15–17 день статевого циклу

Завдання 4. Провести ректальне дослідження групи телиць парувального віку, що знаходяться в стадії статевого спокою, для визначення розмірів і морфологічних особливостей будови жовтого тіла яєчників наприкінці статевого циклу.

Відомо, що ЖТ яєчника наприкінці лютеїнової фази статевого циклу (у випадку, коли не наступило запліднення, або зародок загинув до 20–21 дня після запліднення) набуває ознак регресії (рис. 3.9). Лютеїнові клітини розсмоктуються, внаслідок чого продукування прогестерону зменшується та настає фолікулярна фаза циклу. В цей період дані ректальної пальпації яєчника з ЖТ можуть показувати різні варіанти морфологічної регресії тимчасової залози: суттєве або незначне зменшення ЖТ, зміна його округлої форми. Тактильно відмічається рихлість лютеїнової тканини, відсутність пружності, характерної для ЖТ, що росте. В більшості випадків поряд з лізованим ЖТ вже добре виявляються фолікули нової генерації, але такі утворення можна відчутити і на контрлатеральному яєчнику.

Якщо під час дослідження групи ремонтних телиць, потенційних реципієнтів без відомого строку статевого циклу виявляються ЖТ з ознаками лізису, то потрібно їх виокремити в групу для повторного контролю, тому що синхронізація статевого циклу простагландинами за такими морфологічними характеристиками ЖТ має низьку ефективність.



Рис. 3.9. Об'ємна модель ЖТ яєчника в стадії початку лізису (телиця на 15-й день після індукованого статевого циклу)

Під час групового ректального дослідження та наступного виготовлення об'ємних моделей яєчників телиць з ЖТ різного терміну розвитку слід звертати увагу на морфометричні та морфо-функціональні відмінності різних варіантів протікання статевого циклу у самиць і виділяти типові ознаки характерні для якісних ЖТ, що характеризують тварин можливих реципієнтів.

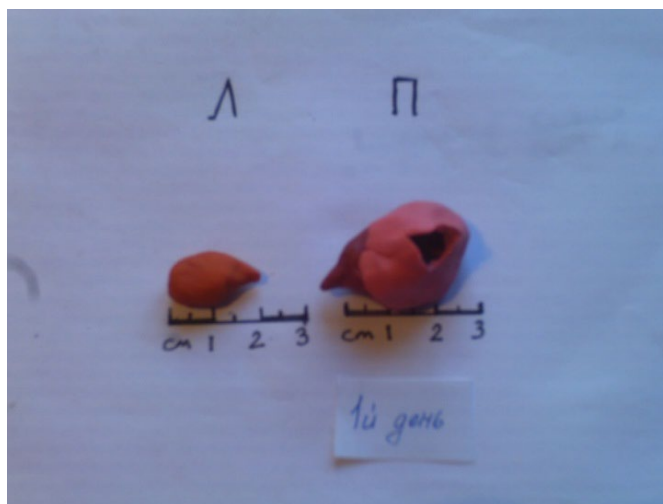
3.8. Візуалізація результатів диференційної діагностики стану яєчників корів та телиць в 0-й день статевого циклу за унілатеральної овуляції

Завдання 5. Провести ректальне дослідження групи телиць парувального віку, які знаходяться в стадії статевого збудження, для визначення розмірів і морфологічних особливостей будови дозрілих і передовуляторних фолікулів яєчників з метою засвоєння прийомів визначення повноцінності статевих циклів та добору телиць-реципієнтів до імплантаційних ембріонів.

Після набуття попередніх навичок диференційної пальпаторної діагностики яєчників у лютеїновій фазі статевого циклу, група переходить до засвоєння навичок пальпації яєчників, на стадії зріючих фолікулів. Ректальне дослідження яєчників в цій фазі потребує підвищеної уваги з причини того, що дозрілий преовуляторний фолікул має дуже тонку оболонку, яка може бути пошкоджена під час дотику пальців. Внаслідок цього яйцеклітина з такого фолікула попадає в черевну порожнину, а не в лійку яйцепровода.

Після виявлення ознак охоти у телиць, шляхом спостереження за їх поведінкою, таких тварин фіксують у станку і відмічають термін між початком візуальної фіксації прояву статевих рефлексів і часом проведення ректального дослідження (для уточнення настання нульового дня циклу). Правильна пальпація обох яєчників забезпечує встановлення наявних дозрілих домінуючих фолікулів. Відмічають його розмір, а також тактильні характеристики: м'якість оболонки, флуктуацію фолікулярної рідини. Для контролю процесу дозрівання фолікула проводять повторне обстеження через 3–6 або 12 годин, що дозволяє встановити настання овуляції, а саме – овуляторну ямку (рис. 3.10) на місці фолікула у вигляді заглиблення в оболонці або залишків оболонки навкруги того місця, де попередньо фіксували домінуючий фолікул. Відповідно до технологічних вимог, день настання овуляції прийнято вважати як нульовий день циклу, від якого йде розрахунок дня проведення трансплантації ембріонів (7–8 день).

Дослідження гормонального рівня корів та телиць, проведені українськими науковцями (О. Д. Бугров, 2014), показали, що після закінчення лютеїнової фази статевого циклу (після 18-ої доби) починається фолікулярна фаза на 19-у добу і триває до 2-ї доби наступного циклу, що збігається з третьою хвилею збільшення домінуючого фолікула.



**Рис. 3.10. Об'ємна модель яєчників телиці з ознаками настання овуляції
справа**

При першому обстеженні телиці, у якої ще спостерігаються всі ознаки статевого збудження, на яєчнику не пальпується домінуючий фолікул (несинхронний цикл), треба звернути увагу на поверхню яєч-

ника і знайти ознаки овуляційної ямки (рис. 3.11). У таких самиць часто спостерігають ознаки гіпотрофії гонад, що негативно впливає на гормональний фон формування статевого циклу.



Рис. 3.11. Динаміка морфологічних змін яєчників впродовж стадії збудження статевого циклу від нульового до першого дня (за даними візуалізації пальпаторних даних однієї телиці)

У випадку, коли добір потенційних реципієнтів проходить в групах ремонтного молодняка без попередньо встановлених даних щодо нульового дня циклу, то треба звертати увагу на диференційну діагностику фізіологічного стану яєчника в нульовий день циклу (після овуляції домінуючого фолікула) та патологічних станів відсутності циклічності внаслідок гіпогонадизму яєчників (гіпотрофія, гіпоплазія), що показано на рисунку 3.12. Для підтвердження діагнозу потрібно провести повторне обстеження через 6–8 днів, що покаже наявність ЖТ циклу за фізіологічного перебігу.

На рисунку 3.13 проілюстровано методику визначення морфометричних показників розвитку яєчників за допомогою об'ємних моделей. Через 7–8 днів після встановленої овуляції стажери порівнюють пальпаторні дані яєчників телиць, зафіксовані у вигляді об'ємних моделей, з новими даними, що характеризують лютеїнову фазу циклу тих же самих тварин. Найбільший позитивний ефект у навчанні надають приклади порівняння яєчників телиць з чітко простеженими термінами дозрівання фолікулів з наступною овуляцією та розвитком ЖТ на місці овульованих фолікулів. На моделях яєчників чітко простежується поліморфність їх функціональних утворень різних фаз статевого циклу з однаковою фазою його перебігу.

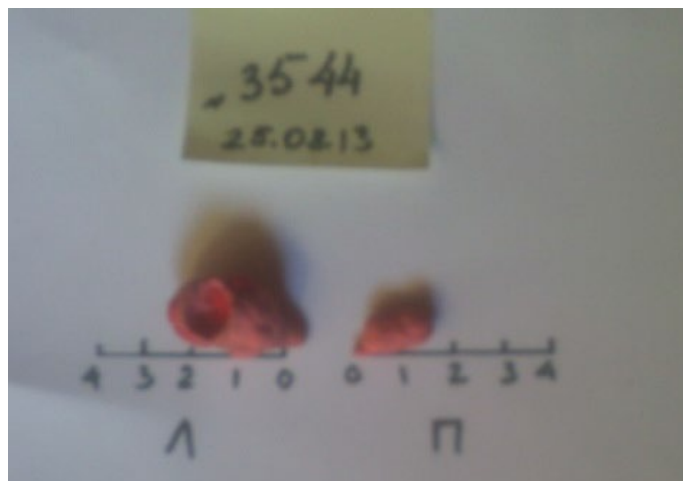


Рис. 3.12. Виявлення овуляційної ямки на поверхні лівого яєчника телиці з вираженими ознаками статевого збудження (несинхронність перебігу статевого циклу – овуляція розпочалась до закінчення статевого збудження)

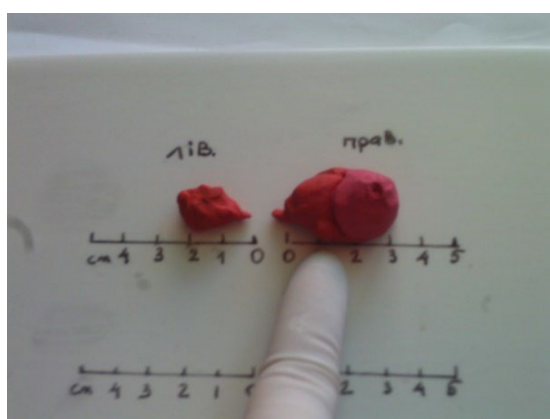


Рис. 3.13. Вимірювання на об'ємних моделях яєчників за даними візуалізації результатів пальпаторної діагностики: зліва – розмір нормально розвиненого яєчника з типовим ЖТ; справа – розмір яєчника без морфологічних утворень з ознаками гіпогонадізму

Для закріплення отриманих знань і навичок для стажерів проводиться, під час тренінгу, діагностичний забій вибракуваної корови або телиці у відповідному, попередньо визначеному терміні статевого циклу. Матеріали розтину статевих органів, зокрема, яєчників, піддаються аналізу та порівнянню з результатами попередньої візуалізації даних ректального дослідження тварин з подібним фізіологічним або патологічним станом органів розмноження. Приклади фото виокремлених яєчників з ЖТ середини циклу (рис. 3.14 зліва) і передовуляційним фолікулом (рис. 3.14 справа) показано нижче. Препарати були отримані та використані в процесі практичного навчання в умовах ферми.



Рис. 3.14. Яєчники корів після забою з характерними морфо-функціональними утвореннями: зліва ЖТ середини циклу (розтин по центру залози, видно порожнину в середині), справа – преовуляторний фолікул (0-й день статевого циклу, стадія статевого збудження)

3.9. Візуалізація результатів пальпаторної діагностики стану яєчників корів або телиць донорів ембріонів у контрольні терміни індукованого статевого циклу (0-й і 7–8 дні). Оцінка реакції утворення жовтих тіл і прогноз виходу ембріонів

Завдання 6. Провести ректальне дослідження групи корів – потенційних донорів ембріонів у різні строки індукованого циклу: в 0-й день під час прояву статевого збудження, в 6–8 день – під час контролю реакції жовтих тіл яєчника на гормональну стимуляцію.

Після засвоєння практичних навичок ректальної діагностики яєчників телиць (цикли з унілатеральною активністю яєчників), можна перейти до вивчення особливостей формування функціональних утворень яєчників у корів-донорів ембріонів (цикли з індукованою поліовуляцією). Після обробки корів гормональними препаратами СЖК або ФСГ, яєчники самиць виробляють значно більше естрогенів, що спонукає розвиток множинних антральних фолікулів до стадії дозрілих з наступним процесом поліовуляції. Настання овуляції множинних дозрілих фолікулів проходить у більш розтягнуті терміни щодо прояву статевого збудження, ніж під час унілатеральної овуляції преовуляторного фолікула в спонтанний або індукований цикл.

Як правило, під час проведення ШО корови-донора, не рекомендується пальпування яєчників, бо внаслідок стимулюючої дії гормонів, гонади суттєво збільшуються в розмірах, що збільшує ризик потрапляння овкульованих яйцеклітин поза лійкою яйцепровода. Для навчальних цілей можна проводити обробку вибрактованих корів препаратом СЖК («Синхростим», 3500 ОД) для оцінки реакції яєчників (рис. 3.15).



Рис. 3.15. Зразок об'ємної моделі яєчників корови після гормональної стимуляції множинного фолікулогенезу

Препарати СЖК, застосовані без спеціальної сироватки, часто призводять до патологічної реакції яєчників, а саме фолікулярної кістозності. Пальпаторне обстеження корови в нульовий день індукованого циклу показало множинний фолікулогенез з наступним перетворенням фолікулів у кісти (полікістоз). Контроль стану яєчників наступного дня підтвердив встановлений ректально діагноз, а діагностичний розтин підтвердив картину візуалізації даних попереднього ректального дослідження (рис. 3.15, 3.16).



Рис. 3.16. Яєчник тієї ж корови через день після пальпації з ознаками дегенеративних змін фолікулів (полікістоз): оболонки фолікулів тверді, непридатні для овуляції, реакція яєчників корови на гормонограму з препаратом СЖК патологічна

Для порівняння стажери використовують отримані попередньо дані пальпації преовуляторних фолікулів з унілатеральною овуляцією, що дає можливість відрізнити тактильні відчуття фолікулярної оболонки від стану кістозної щільної оболонки.

Через 7 днів після поліовуляції за протоколом проводиться контроль реакції утворення ЖТ яєчників у корів – потенційних донорів ембріонів. Проводиться пальпація обох яєчників і на кожному з них підраховують кількість ЖТ. Морфологічні характеристики множинних ЖТ яєчників корів після поліовуляції відрізняються ще більш вираженим поліморфізмом, порівняно з одиничною овуляцією.

Під час пальпації беруть до уваги характерні ознаки морфології ЖТ відповідної стадії розвитку (рис. 3.17 і 3.18). Морфометричні параметри суттєво залежать від кількості утворених ЖТ, але закономірність зберігається: чим більша кількість ЖТ, тим дрібніші вони за розмірами. Зустрічаються випадки, коли кількість ЖТ після поліовуляції неможливо розрізнити, тоді йде мова про множинну реакцію яєчників.



Рис. 3.17. Зразок об'ємної моделі яєчників корови – позитивного донора ембріонів на 7-й день після гормональної стимуляції поліовуляції: реакція яєчників позитивна, на лівому пальповано 2 ЖТ, на правому – 8–9 функціональних ЖТ



Рис. 3.18. Зразок об'ємної моделі яєчників корови з низьким генеративним потенціалом, на 7-й день після поліовуляції реакція ЖТ низька: зліва ЖТ відсутні, справа – 2 морфологічно типові ЖТ (вимивання недоцільне)

Отримання п'яти якісних ембріонів за одне вимивання сприймається технологічно прийнятним результатом, наявність трьох і більше ЖТ в сумі на обох яєчниках свідчить про недостатню поліовуляцію.

Вміння пальпувати ЖТ яєчників на 6–7 день стимульованого циклу у донорів є обов'язковою процедурою для оцінки ефективності поліовуляції та прогнозу постійного використання корови в якості донора.

Таким чином, після поетапного закріплення упродовж курсу навичок диференційної діагностики станів яєчників корів та телиць з візуа-

лізацією даних пальпації, стажери набувають вміння точно діагностувати стадію статевого циклу, що дозволяє оптимізувати процедури регуляції циклічності поголів'я донорів та реципієнтів великої рогатої худоби і отримання більшої кількості ембріонів та їх приживлюваності.

ВИСНОВКИ

1. Розроблено і випробувано в умовах виробництва методику візуалізації результатів ректальної пальпації яєчників корів та телиць за допомогою створення об'ємних моделей з пластичних матеріалів у натуральну величину із врахуванням динаміки морфо-функціональних змін впродовж перебігу статевого циклу.

2. Розроблений інноваційний методологічний підхід є етапом до інтенсивного практичного тренінгу спеціалістів з диференціальної діагностики стану яєчників корів та телиць, необхідним для підвищення ефективності процедур з штучного осіменіння та трансплантації ембріонів великої рогатої худоби.

3. За даними візуалізації результатів ректальної пальпації яєчників лактуючих корів та телиць накопичено колекцію зразків моделей яєчників, що характеризує видовий поліморфізм будови яєчників різних популяцій великої рогатої худоби.

4. Розроблені методичні рекомендації є посібником для професійно-орієнтованих навчальних занять для студентів і спеціалістів зооветеринарного профілю, що сприятиме долученню українських фахівців з відтворення до інтеграції в європейський технологічний сектор і дозволить підняти дуальну аграрну освіту на сучасний рівень.

ВИКОРИСТАНІ ЛІТЕРАТУРНІ ДЖЕРЕЛА

1. Бугров О. Д., Хмельков В. М. Взаємозв'язок морфо-функціональних показників яєчників корів. *Науково-технічний бюлетень*. Харків, 2009. № 100. С. 161–163.

2. Бугров О. Д., Шахова Ю. Ю. Удосконалення методу синхронізації статевої охоти у корів і телиць. *Науково-технічний бюлетень*. Харків, 2009. № 99. С. 52–59.

3. Давиденко В. М., Мельник В. О., Журавель М. П. Акушерство, гінекологія і біотехнологія відтворення тварин. Термінологічний словник. Миколаїв : МНАУ, 2013. 74 с.

4. Давидова Ю. Ю. Морфологічні зміни фолікулів і жовтих тіл у природному статевому циклі корів. *Науково-технічний бюлетень*. Харків, 2006. № 92. С. 32–38.

5. Дуванов О. В. Морфологічна характеристика жовтих тіл яєчників і ефективність стимуляції поліовуляції корів-донорів. *Розведення і генетика тварин*. Київ, 2011. Вип. 45. С. 63–65.
6. Інструкція зі штучного осіменіння корів і телиць : затв. наказом М-ва аграрної політики України 1 серп. 2001 р. № 230. Київ, 2001. 38 с.
7. Ковтун С. І., Щербак О. В., Стаховський В. Ф. Стан та перспективи застосування комплексних біотехнологій у скотарстві. *Розведення і генетика тварин*. Київ, 2012. Вип. 46. С. 26–29.
8. Мельник В. О., Сідашова С. О. Акушерство, гінекологія і біотехнологія відтворення тварин. Конспект лекцій. Миколаїв : МНАУ, 2013. 140 с.
9. Оптимізація схем синхронізації статевих циклів ремонтних телиць за фізіологічними та економічними показниками / Т. А. Стрижак та ін. *Зернові культури*. 2018. Т. 2, № 2. С. 370–381.
10. Основи штучного осіменіння і ветеринарно-зоотехнічного контролю відтворення стада / за ред. В. О. Пабата. Київ, 1997. 58 с.
11. Сідашова С. О. Анатомічні і функціональні зміни яєчників самок великої рогатої худоби. *Розведення і генетика тварин*. Київ, 2011. Вип. 45. С. 236–247.
12. Сідашова С. О. Лабораторія трансплантації ембріонів. Пропозиції товаровиробникам свинини. *Свинарство*. Полтава, 2013. Вип. 62. С. 202–203.
13. Сідашова С. О. Оцінка лактуючих корів на придатність бути донорами-реципієнтами доїмплантаційних ембріонів. *Вісник Полтавської державної аграрної академії*. 2013. № 2. С. 61–63.
14. Сідашова С. О. Повноцінність статевої циклічності ремонтних телиць в умовах промислового виробництва. *Науково-інформаційний вісник ХДАУ*. 2017. Вип. 9. С. 54–58.
15. Сідашова С. О., Стаховський В. Ф., Ковтун С. І. Ембріопродуктивність корів-донорів і функціональна асиметрія яєчників. *Розведення і генетика тварин*. Вінниця, 2016. Вип. 51. С. 247–255.
16. Сідашова С. О., Сагло О. Ф. Функціональна асиметрія гонад самок свиней і ВРХ: методологія вивчення, фундаментальні і прикладні аспекти. *Свинарство*. Полтава, 2014. Вип. 64. С. 91–105.
17. Шеремета В. І., Себа М. В. Вміст статевих гормонів у крові телиць української чорно-рябої породи. *Вісник аграрної науки*. 2004. № 12. С. 35–38.

18. Яблонський В. А. Ветеринарне акушерство, гінекологія та біотехнологія відтворення тварин з основами андрології : підручник / за ред. В. А. Яблонського. Вінниця : Нова книга, 2011. 608 с.

19. Dairy cow synchronization Protocols. URL: www.selectsires.com (дата звернення: 11.02.2020).

genetic resources / FAO Animal Production and Health Guidelines. Rome : Italy, 2010. № 3. 133 p.

21. Kovtun S., Shcherbak O., Zyuzyun A., Reznikova N., Duvanov A., Osypchuk A. The use of biotechnological for conservation of genetic resources. *Journal of Animal Science (BG)*. 2013. Vol. 4, №. 5. P. 83–87.

22. Lauderdale J. W., Seguin B. E., Stellflug J. N., Chenault J. R., Thatcher W. W., Vincent C. K., Loyancano A. F. Fertility of cattle following PGF₂ a in injection. *Journal of Animal Science* 1974. V. 38, iss. 5. P. 964–967 <https://doi.org/10.2527/jas1974.385964x>.

23. Lucy M. C., Stevenson J. S., Call E. P. Controlling first service and calving interval by prostaglandin F₂ a gonadotropin-releasing hormones and timed insemination. *Journal of Dairy Science*. 1986. V. 69, iss. 8. P. 2186–2194 [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(86\)80652-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(86)80652-X).

24. Pender Peter. Bovine Artificial Insemination. Technical Manual. Canada. Ontario, 1993. 112 p.

25. Pierson R. A., Ginter O. J. Follicular population during the estrous cycle in heifers. *Anim. Reprod. Sci.* 1987. № 14. P. 177–186.

26. Pursley J. R., Mee M. O., Wiltbank M. C. Synchronization of Ovulation in dairy cattle with using PGF₂ α and GnRH. *Theriogenology*. 1995. V. 44, iss. 7. P. 915–923 [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(95\)00279-H](https://doi.org/10.1016/0093-691X(95)00279-H).

27. Mark A. Crowe, Miel Hostens and Geert Opsomer. Reproductive management in dairy cows – the future. *Irish Veterinary Journal*. 2018. № 1. URL: <https://irishvetjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13620-017-0112-y> (дата звернення: 11.02.2020).

28. Sidashova S. O., Kovtun S. I., Scherbak O. V. Ethological and morpho-functional features of sexual cyclicity at cows in conditions of industrial production of milk. *Вісник аграрної науки*. 2018. № 7. С. 42–47.

29. Klindworth H. P., Hoedemaker M., Burfeindt D., Heilkenbrinker T. Synchronization of ovulation (OVSYNCH) in high-producing dairy cattle herds. I. Fertility parameters, body condition score and plasma progesterone contraction. 2001. 108 (1). URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11232418/> (дата звернення: 11.02.2020).

Розділ 4.

ОЦІНКА ЯКОСТІ ПРИЗНАЧЕНОЇ ДО КРІОКОНСЕРВАЦІЇ СПЕРМОПРОДУКЦІЇ ТА СТРУКТУРНОЇ ЦІЛІСНОСТІ СПЕРМАТОЗОЇДІВ КНУРІВ

4.1. Методичні підходи до кріоконсервації сперми кнурів

Перші повідомлення про методи тривалого збереження еякульованої сперми кнурів з'явилися у 70-х роках минулого сторіччя. Було експериментально доведено, що розроблені методики кріоконсервації сперми кнурів суттєво відрізняються від підходів щодо тривалого зберігання сперми інших видів сільськогосподарських тварин.

Зокрема, у 1975 р. Пурсель і Джонсон розробили метод заморожування сперми кнурів у вигляді гранул. Його ефективність визначалася відносно високою збереженістю рухливості гамет після їх розморожування, але головним недоліком була відсутність можливості індивідуальної ідентифікації кожної гранули. Пізніше були розроблені інші методи кріоконсервації сперми кнурів, які ґрунтувались на заморожуванні зразків сперми у пайетах різного об'єму («maxi» – 5,0 мл та «mini» – 0,25 або 0,5 мл), що забезпечило індивідуальну ідентифікацію кожної спермодози кнура. Упродовж тривалого періоду прогрес у створенні ефективних методів низькотемпературного зберігання еякульованої сперми кнурів був незначний через те, що методологія цього процесу ґрунтувалася на емпіричному підході до досліджень, а не на фундаментальних кріобіологічних основах. Фундаментальний кріобіологічний підхід досліджує та враховує біофізичні характеристики сперми за розробки протоколів кріоконсервації.

Запорукою успішної кріоконсервації сперми є збереження структурної та функціональної цілісності сперматозоїдів. Ці фактори мають вирішальне значення, оскільки різні складові цієї клітини (наприклад, акросома, джгутик, ядро) будуть по-різному переносити процедуру кріоконсервації і мають бути повністю захищені для забезпечення результативного запліднення деконсервованими сперматозоїдами в умовах *in vivo* та *in vitro*. Рухливість сперматозоїда після деконсервації може залишатись на досить високому рівні, а цілісність акросоми може бути порушена під дією, наприклад, фізичних чинників, таких як осмотичний стрес.

Наразі існує два методи кріоконсервації сперми кнурів: традицій-

ний метод занурення в азот та спосіб регульованої швидкості заморожування. Показано, що кращі показники життєздатності сперматозоїдів отримують після деконсервації в разі застосування програмного заморожування, порівняно із методами заморожування із неконтрольованою швидкістю. Проте інші дослідження не підтвердили розбіжності результатів застосування цих двох методів. Окрім породоспецифічної плідності, результати польових досліджень показали, що середня рухливість деконсервованих еякульованих сперматозоїдів кнурів різних порід (ландрас та дюрк) була відмінною. У кнурів різної породи належності виявлено відмінності у складі мембранних ліпідів, але так і не з'ясовані головні відмінності виживаності спермій та загальної фертильності кнурів різних порід. Показано, що деконсервовані еякульовані сперматозоїди кнурів проявляють дещо знижений рівень запліднення та отримання малої кількості потомства після штучного осіменіння.

Відносно невисока запліднююча здатність деконсервованих еякульованих сперматозоїдів кнурів пов'язана з багатьма чинниками. Показано, що генерація активних форм кисню, індукована процесом кріоконсервації, може бути відповідальною за ушкодження сперматозоїдів у ссавців. Утворення активних форм кисню пов'язане зі зниженням рухливості сперматозоїдів та зниженням здатності сперматозоїда проникати у яйцеклітину.

Сперматозоїди чутливі до перекисного окислення ліпідів через високий вміст поліненасичених жирних кислот і не здатні ресинтезувати їхні мембранні компоненти, хоча це не єдиний механізм, який впливає на функціональну активність сперматозоїда та активні форми кисню. Показано, що додавання антиоксидантів до середовищ для розрідження сперми кнурів покращували показники якості свіжої сперми кнурів та кріоконсервованих еякульованих сперматозоїдів.

Наразі, оцінка сперми переважно застосовується для прогнозування фертильності кнурів та її придатності до тривалого збереження за наднизьких температур. Традиційні лабораторні методи оцінки сперми, такі як концентрація сперми, рухливість і морфологічні показники спермій не здатні виявити тонкі аномалії та порушення, що негативно впливають на здатність до репродукції, підкреслюючи необхідність пошуку нових методів оцінки глибоких змін спермій у процесі кріоконсервації. Одним із відносно нових лабораторних підходів, що

застосовується в роботі кріолабораторій, є тест HOST (гіпо-осмотичний тест), який дозволяє визначати рівень функціональності мембран сперматозоїдів після їх розморожування.

Незважаючи на тривалий період досліджень властивостей сперміїв під впливом наднизьких температур, до цього часу залишаються невідомими деякі характеристики сперми, що можуть впливати на процеси заморожування-відтаювання. Геномна цілісність є одним з основних нещодавно досліджених параметрів, що визначає важливу роль у штучному осіменінні й заплідненні *in vitro*, а високий рівень фрагментації ДНК впливає на процес запліднення і нормальний розвиток ембріону.

Незважаючи на збереження функціональності мембран і життєздатності сперматозоїдів, проблеми із тривалим збереженням сперми за наднизьких температур, можуть бути викликані порушеннями цілісності геному, що можуть бути визначено чутливим методом аналізу – тестом ДНК-комет.

У методичних рекомендаціях запропонований детальний опис основних лабораторних методів для ефективної оцінки сперми: спермограма, структурна та морфологічна оцінка, визначення геномної цілісності сперматозоїдів.

4.2. Лабораторні методи оцінки якості сперми

4.2.1. Визначення концентрації сперматозоїдів за допомогою камери Горяєва

Для визначення концентрації сперматозоїдів за допомогою камери Горяєва необхідні наступні прилади та реактиви: мікроскоп біологічний, камера Горяєва (рис. 4.1), столик з підігрівом, термостат водяний, гумова груша, еритроцитарний меланжер, скельця шліфовані покривні та предметні, палички скляні, піпетки мірні, салфетки марлеві, 3% розчин хлориду натрію, спирт етиловий ректифікований (C_2H_5OH). Слід відмітити, що цей метод є одним із доступних і не потребує великих фінансових витрат.

На початку проведення досліджень еритроцитарний меланжер промивають сумішшю етилового спирту з ефіром у співвідношенні 1:1.

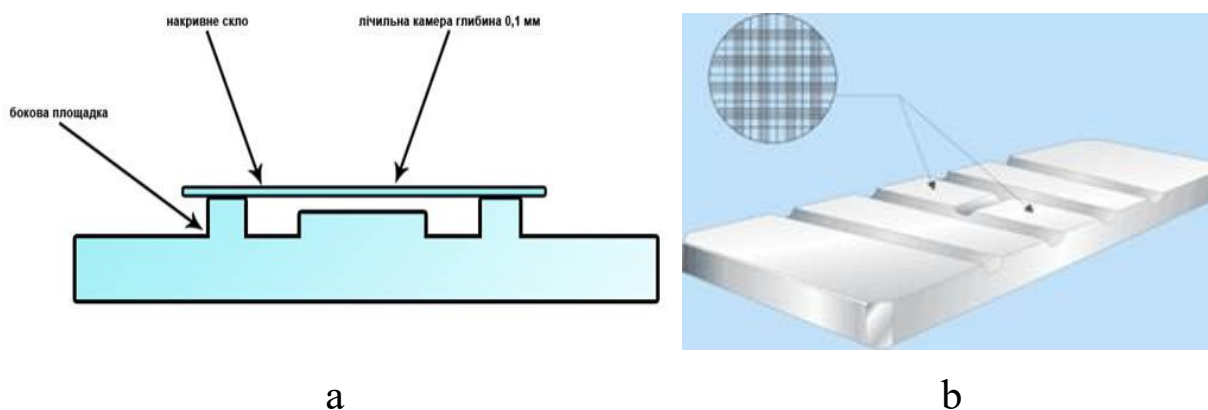


Рис. 4.1. Загальний вигляд (а) та будова камери Горяєва (b)

Отриману сперму ретельно перемішують скляною паличкою і набирають у меланжер до мітки «0,5». До мітки «11» набирають 3% розчин хлориду натрію. Фізіологічний розчин розріджує сперму в 20 разів і призводить до адинамії сперматозоїдів.

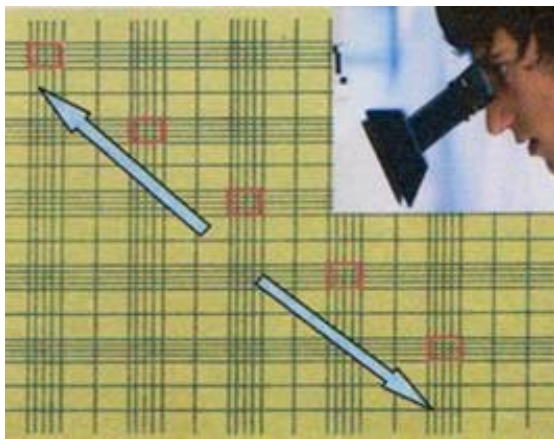
Обидва кінці меланжера затискають великим і вказівним пальцями. Меланжер струшують упродовж двох – трьох хвилин для рівномірного перемішування сперми з фізіологічним розчином. Для підрахунку кількості сперматозоїдів, перші 2–3 краплі розведеної сперми не використовують. Четверту та п'яту краплі наносять на край притертого до камери Горяєва шліфованого покривного скла. Нанесені краплі сперми затікають під скло і заповнюють камеру.

Підрахунок кількості сперматозоїдів здійснюють при збільшенні окуляра $\times 7$ і об'єктива $\times 40$ або відповідно $\times 15$ і $\times 20$.

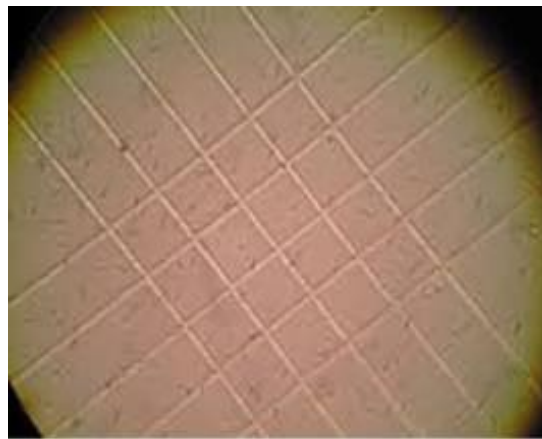
Необхідно стежити, щоб на сітці камери не утворювались пухирці повітря і сперма не потрапляла під притерті краї покривного скла.

Це дозволяє в полі зору мікроскопа розмістити один великий або 16 малих квадратів. Кількість сперматозоїдів підраховують у розміщених по діагоналі 80 малих квадратах (рис. 4.2).

Зображення сперматозоїдів, які знаходяться у глибині камери, постійно корегують мікрогвинтом мікроскопа. Розміщення клітин з зовнішньої або внутрішньої сторін квадрата визначають за місцем знаходження головок. Розміщені на лівій і верхній лініях квадрата головки сперматозоїдів зараховують до того квадрата, у якому здійснюють підрахунок; розміщені на правій і нижній лініях – до наступного.



П'ять великих квадратів розміщені по діагоналі



Один великий квадрат складається із 16-ти маленьких

Рис. 4.2. Схема підрахунку сперматозоїдів у камері Горяєва

Загальний вигляд робочого місця під час визначення концентрації сперматозоїдів за допомогою камери Горяєва представлено на рисунку 4.3.



Рис. 4.3. Сітка з камерою Горяєва на предметному столику мікроскопа

Концентрацію (С) клітин в еякулятах або спермодозі визначають за формулою:

$$C = \frac{n \cdot D \cdot S}{N \cdot p \cdot 1\,000\,000},$$

де: N – кількість малих квадратів (n = 80),

n – кількість підрахованих клітин,

D – розведення сперми у меланжері (20),

S – площа малого квадрата (400 мм²), p – глибина камери (0,1 мм),

1 000 000 – коефіцієнт для перерахунку кількості сперматозоїдів (млрд/мл).

За кінцевий результат приймають середнє арифметичне з трьох визначень. Різниця між величинами не має перевищувати $\pm 10\%$.

Приклад. Якщо в п'ятих великих квадратах нарахували $17+28+22+16+17=100$ сперматозоїдів, то при розведенні еякуляту в 20 разів їх концентрація у 1 мл сперми становить 0,1 млрд.

$$C = \frac{100 \cdot 20 \cdot 400}{80 \cdot 0,1 \cdot 1\,000\,000} = 0,1 \text{ млрд} / \text{мл}$$

Мінімальні вимоги до сперми, придатної для кріоконсервації, відображено у додатку (стор. 71).

4.2.2. Визначення рухливості сперматозоїдів

Під рухливістю сперматозоїдів вважають їх здатність до прямолінійного поступального руху. Для проведення оцінки рухливості сперматозоїдів необхідні наступні прилади та реактиви: мікроскоп біологічний, термостат, предметне скло, покривні скельця, палички скляні, піпетки мірні, натрій лимоннокислий ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 5H_2O$), натрій хлористий (NaCl).

За 20–30 хв до початку роботи вмикають термостат. Робоча температура внутрішньої камери термостата має становити 40–42°C. Стерильний лабораторний посуд (скельця шліфовані покривні і предметні, скляні палички, піпетки) і потрібні розчини зберігають за температури 35–40°C.

Рухливість статевих клітин визначають за допомогою біологічного мікроскопа при збільшенні у 120 або 180 разів. Скляною паличкою (піпеткою) на предметне скло наносять краплю сперми, до якої додають 2–3 краплі 3% розчину лимоннокислого натрію. Сперму змішують з розчином і накривають покривним скельцем. Рухливість сперматозоїдів визначають у полі зору мікроскопа. Підраховують кількість клітин з прямолінійним поступальним, манежним і коливальним рухами, а також мертвих. У кожній пробі три рази поспіль ($n=3$) визначають кількість рухливих сперматозоїдів. Оцінювання проводять за десятибальною системою: за кожних 10% сперматозоїдів з прямолінійно-поступальним рухом ставлять один бал (0–10) або відсотками (0–100; рис. 4.4).

Рухливість сперматозоїдів (P_c) визначають за формулою:

$$P_c = \frac{n_1 \cdot 10 \cdot (100)}{n},$$

де: n – сумарне число підрахованих сперматозоїдів;

n_1 – число підрахованих клітин з прямолінійним поступальним, маневрним і коливальним рухами;

10 (100) – постійні коефіцієнти, потрібні для оцінки рухливості сперматозоїдів балами (0–10) або відсотками (0–100).

За кінцевий результат досліджень приймають середню арифметичну величину за даними двох визначень.

Мінімальні вимоги до сперми, придатної для кріоконсервації, відображено у додатку (стор. 71).

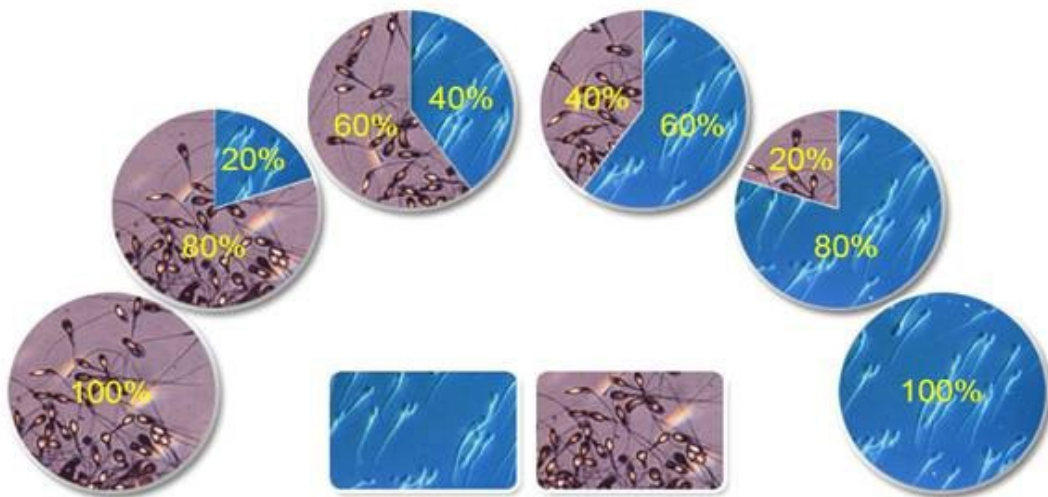


Рис. 4.4. Оцінка якості сперми за рухливістю

4.2.3. Визначення тривалості виживаності сперматозоїдів поза організмом самця

Запліднювальна здатність сперматозоїдів тісно пов'язана з їх виживаністю поза організмом, що, у свою чергу, залежить від їх стійкості до зовнішніх впливів. Абсолютну виживаність сперматозоїдів визначають за кожний окремо взятий інтервал часу в процесі зберігання сперми після її розрідження. Тривалість виживаності визначають кількістю годин, що минули від початку зберігання сперми до повної втрати рухливості клітинами.

Для проведення визначення тривалості виживаності сперматозоїдів поза організмом самця необхідні наступні прилади та реактиви: мікроскоп біологічний, термостат, холодильник, предметне і покривне

скло, колби мірні (50–500 мл), глюкозо-жовтково-цитратне середовище.

Перед початком дослідження не менше ніж дві проби розріджують глюкозо-жовтково-цитратним середовищем. Ступінь розведення сперми має коливатися у межах 1:8–1:32. Для досліджень використовують лише один ступінь розведення сперми. Розріджену сперму зберігають у холодильнику за температури 3–5°C. Рухливість сперматозоїдів визначають після кожного інтервалу ($t=24$ год) від початку одержання сперми. Закінченням досліджень вважають день, коли мінімальна кількість рухливих сперматозоїдів знижується до 0,5 бала або 5 відсотків.

Абсолютну виживаність сперматозоїдів (A_t) визначають за формулою:

$$A_t = a_1 t_1 + a_2 t_2 + a_3 t_3 + \dots a_n t_n,$$

де $a_1, a_2, a_3 \dots a_n$ – рухливість сперматозоїдів за інтервали часу у балах;

$t_1, t_2, t_3 \dots t_n$ – інтервали часу, впродовж яких рухливість сперматозоїдів становить $a_1, a_2, a_3 \dots a_n$, год;

$a_1 t_1 + a_2 t_2 + a_3 t_3 + a_n t_n$ – виживаність сперматозоїдів за інтервали часу.

За кінцевий результат досліджень приймають середнє арифметичне з двох визначень. Невідповідність між величинами не має перевищувати $\pm 10\%$.

Інтервали часу ($t_1, t_2, t_3 \dots$) в годинах визначають за формулою:

$$t_1, t_2, t_3 = \frac{T_{n+1} - T_{n-1}}{2}$$

де T – час від початку до наступного дня досліджень, год;

n – порядковий номер дня досліджень.

В останній день досліджень, коли неможливо встановити мінімальну рухливість сперматозоїдів, інтервал часу (t_n) в годинах знаходять за формулою:

$$t_n = \frac{T_{nc} - T_{n-1}}{2}$$

де T_{nc} – час виживання сперматозоїдів, год;

T_{n-1} – час від першого до наступного дня дослідження, год.

Час виживання сперматозоїдів (T_{nc}) обчислюють годинами за формулою:

$$T_{nc} = \frac{T_n - T_{n-1}}{2} + T_{n-1}$$

де T_n – час від початку до останнього дня досліджень, год. Результати з визначень проведених досліджень записують у лабораторний журнал.

Приклад.

1. Інтервал часу на четвертий день досліджень за формулою становить 36 годин.

$$t_4 = \frac{T_5 - T_3}{2} = \frac{120 - 48}{2} = 36 \text{ год.}$$

Показник виживання сперматозоїдів за даний інтервал часу становить 252 ум. од.

$$a_4 t_4 = 7 \cdot 36 = 252 \text{ ум. од.}$$

2. Виживання сперматозоїдів у годинах за формулою становить 252 години.

$$T_{nc} = \frac{T_n - T_{n-1}}{2} + T_{n-1} = \frac{264 - 240}{2} + 240 = 252 \text{ год}$$

3. Інтервал часу на кінцевий (дев'ятий) день досліджень становить 18 годин.

$$t_9 = \frac{T_{nc} - T_{n-1}}{2} = \frac{252 - 216}{2} = 18 \text{ год.}$$

4. Абсолютне виживання сперматозоїдів ($n=3$) становить:

$$At_2^1 = \sum_{at}(108+216+288+252+216+180+72+48+18) = 1398;$$

$$At_2^2 = \sum_{at}(108+216+216+216+216+120+48+18) = 1410;$$

$$At_2^3 = \sum_{at}(108+216+288+288+288+216+180+56+48+18) = 1458.$$

Невідповідність між мінімальним (1398) і максимальним (1458) значеннями абсолютного виживання сперматозоїдів становить 60 ум. од. або 4,3%, а його середнє значення за формулою становить 1422 ум. од.

$$At^{1-3} = At^1 + At^2 + At^3/3,$$

$$\text{де } At^{1-3} = 1398+1410+1458/3 = 1422 \text{ ум. од.}$$

4.2.4. Прискорений метод визначення виживаності сперматозоїдів (терморезистентна проба)

З метою зменшення затрат часу на визначення рухливості сперматозоїдів упродовж тривалого зберігання за кімнатної температури доцільно застосовувати терморезистентну пробу.

Для постановки терморезистентної проби необхідні наступні прилади та реактиви: мікроскоп біологічний, термостат, предметне скло, покривні скельця, мірні колби (20–50 мл), палички скляні, піпетки мірні, натрій лимоннокислий ($C_6H_5O_7Na_3 \cdot 5H_2O$).

Одержану нерозріджену або розріджену сперму вносять у стерильну мірну колбу, яку розміщують у термостаті за температури $+38^\circ C$ на три години. Через три години проводять оцінку рухливості сперматозоїдів, яка і буде відображати стан якості сперми. Сперма доброї якості приймається з показником рухливості сперматозоїдів не менше 60%.

Мінімальні вимоги до сперми, придатної для кріоконсервації, відображено у додатку (стор. 71).

4.2.5. Тест на термостресстійкість

У практиці штучного осіменіння свиней широко застосовується розріджена сперма кнурів, яка зберігається за температури $+16^\circ C$ – $+18^\circ C$. Відомо, що придатність такої сперми для штучного осіменіння, в основному, визначається за показником прямолінійно-поступальної рухливості сперматозоїдів. Згідно з існуючим нормативними документами цей показник розрідженої сперми впродовж 72 год зберігання за вищезгаданої температури повинен бути не менш ніж 6 балів (60%), а нативної – 7 балів (Інструкція із штучного осіменіння свиней, 2003). Застосування такої сперми, за умов дотримання всіх чинників технології штучного осіменіння, гарантує одержання високих стабільних результатів запліднення та приплоду в свиноматок. Використання сперми кнурів-плідників довготривалого зберігання (замороженої в рідкому азоті при $-196^\circ C$) у виробничих умовах поки що обмежено, в зв'язку з низьким рівнем заплідненості свиноматок та їх продуктивністю. Однією з основних причин такого явища є низька функціональна активність сперматозоїдів після процедури заморожування-розморожування (кріоконсервації), яка в кращому випадку становить близько 4–5 балів. Причому, відомо, що тільки від незначного відсотку наявного поголів'я кнурів можна одержати сперму, яка витримує наднизькі

температурні умови. Отже, попередній добір еякулятів кнурів, придатних до кріоконсервації, має суттєве значення в практиці відтворення поголів'я. Науковцями Інституту свинарства та АПВ НААН для визначення придатності сперми кнурів до кріоконсервації і довготривалого збереження був запропонований тест на визначення термостресстійкості сперматозоїдів кнурів.

Основою тесту на термостресстійкість є визначення рівня життєздатності сперматозоїдів кнура в діапазоні від температури тіла тварини (приблизно $+38^{\circ}\text{C}$) до передпорогової межі температурного шоку (приблизно $+13^{\circ}\text{C}$). Застосування цього тесту забезпечує об'єктивний прогноз рівня здатності сперматозоїдів витримувати дію багаторазових температурних стресів – термо-стресстійкість (ТСС).

На початку проведення тесту на термостресстійкість визначають початкову рухливість сперматозоїдів. Для цього у біологічній пробі сперми певного еякуляту об'ємом 5–10 мл, розрідженої згідно з технологією кріоконсервації у співвідношенні 1:1 глюкозо-хелато-цитратно-сульфатно-жовтковим середовищем (ГХЦСЖ) або його аналогами, оцінюють початкову рухливість сперматозоїдів за температури $+38^{\circ}\text{C}$ при збільшенні мікроскопа у 180–300 разів. Рухливість сперматозоїдів повинна бути не менше 8 балів. Наступний етап тесту передбачає контрастну зміну температурного режиму зберігання сперми, а саме: упродовж трьох годин пробу сперми поперемінно витримують по 30 хв за температури $+38^{\circ}\text{C}$ та $+13^{\circ}\text{C}$. Потім реєструють кінцеву рухливість сперматозоїдів, що і відповідає показнику їх ТСС. Придатними для використання визначаються проби, в яких рухливість сперматозоїдів, після дії контрастного позитивного температурного режиму, становить не менше 4 балів.

ТСС сперматозоїдів є об'єктивним показником прогнозування придатності еякулятів кнурів до кріоконсервації.

Мінімальні вимоги, що висуваються до сперми, призначеної для кріоконсервації, відображено у додатку (стор. 85).

4.2.6. Визначення структурної цілісності деконсервованих сперматозоїдів за допомогою гіпоосмотичного тесту

Тест HOST (гіпоосмотичне набухання сперматозоїдів) ґрунтується на визначенні інтактних життєздатних сперматозоїдів. При додаванні до зразків сперми гіпоосмотичного розчину відбувається набухання цитоплазми цілих неушкоджених сперматозоїдів. Метод ґрунтується

на нездатності сперматозоїдів із ушкодженими мембранами до набухання та закручування їх джгутиків. За результатами цього тесту еякулятом, придатним для проведення подальших біотехнологічних маніпуляцій (норма), приймається такий, у якому кількість сперматозоїдів із набухлою цитоплазмою та закрученими джгутиками визначається у кількості понад 58%.

Цей метод є корисним для відбору життєздатних сперматозоїдів без застосування їх фарбування.

Сперматозоїди з інтактними мембранами набухають упродовж 5 хв у гіпо-осмотичному розчині, а форми джгутиків стабілізуються до 30 хв.

Розчин для набухання з метою визначення ушкоджених сперматозоїдів готують із 0,375 г дигідрату цитрату натрію і 1,351 г D-фруктози у 100 мл дистильованої води. Аліквоти цього розчину по 1 мл заморожують за температури (-20°C).

Готову аліквоту необхідно нагріти у конусній пластиковій пробірці за $+37^{\circ}\text{C}$ упродовж 5 хв. Далі ретельно перемішується зразок сперми у кількості 100 мкл і додається до гіпоосмотичного розчину, обережно перемішується піпетуванням. Готова суміш інкубується за температури $+37^{\circ}\text{C}$ упродовж 30 хв. Відбирається 10 мкл підготованого розчину і розміщується на чисте предметне скло, накривається покривним скельцем (22×22 мм). Відбирають повторну аліквоту підготовленого підігрітого гіпоосмотичного розчину та додають пробу сперми у кількості 10 мкл. Процедура з цим зразком повторюють у тому порядку та режимі, як зазначено вище. Кожне скло оцінюється у фазово-контрастному мікроскопі при збільшенні $\times 200$ або $\times 400$ (табл. 4.1).

За допомогою лабораторного лічильника, підраховують кількість не набухлих (мертвих) і набухлих клітин (живі). Для досягнення мінімальної статистичної похибки проводиться оцінка 200 сперматозоїдів у кожній аліквоті та розраховується середній процент живих клітин і різниця між аліквотами. Якщо різниця між двома вимірюваннями не перевищує зазначеного у таблиці, визначають середнє значення живих клітин. У випадку отримання великого значення похибки, всю процедуру повторюють з початку.

4.1. Допустимі рівні підрахунку статистичної похибки між вимірюваннями двох аліквот сперми

Число сперматозоїдів	Статистична похибка, %	Число сперматозоїдів	Статистична похибка, %
5	20,0	75	11,5
30	18,3	80	11,2
35	16,9	85	10,8
40	15,8	90	10,5
45	14,9	95	10,3
50	14,1	100	10,0
55	13,5	150	8,2
60	12,9	200	7,1
65	12,4	250	6,3
70	12,0	300	5,8

Набухлі сперматозоїди ідентифікують за зміною форми клітини та скручування джгутика (рис. 4.5).

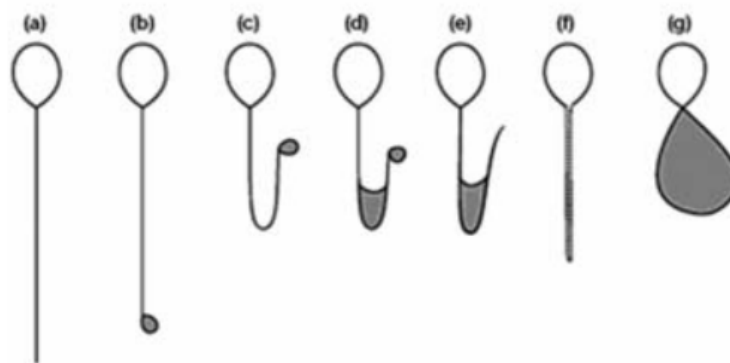


Рис. 4.5. Типові зміни форми голівок і хвостиків сперматозоїдів при гіпоосмотичному стресі (за Jeyendran R. S., Van der Ven H. H., Perez-Pelaez M., Crabo B. G., Zaneveld L. J. D. (1984)

- a) зміни відсутні,
b-g) різні типи набухання джгутиків.

Живі клітини ідентифікують за різними формами набухання джгутиків і підраховують як живі сперматозоїди з неушкодженими мембранами.

4.3. Практичне застосування лабораторних методів оцінки якості сперми кнурів

Практичне застосування лабораторних методів оцінки якості сперми кнурів є визначальним етапом у технології кріоконсервації сперми плідників. Результати, отримані під час досліджень, забезпечать ефективність технології довгострокового зберігання генетичних ресурсів тварин.

За використання інформативних біотехнологічних методів стало можливим проведення оцінки придатності сперми кнурів до кріоконсервації та накопичення такого генетичного матеріалу у банку генетичних ресурсів тварин Інституту розведення і генетики тварин імені М.В. Зубця НААН.

У роботі використовували сперму кнурів, відібрану одночасно від трьох кнурів миргородської породи, які утримувалися у державному підприємстві дослідне господарство «Надія» Інституту свинарства і АПВ НААН.

Еякуляти відбирали мануальним методом від плідників миргородської породи (№№ 1159, 79, 347) віком 2–2,5 роки за умов відсутності попередніх еякуляцій упродовж тижня. Одразу після отримання сперму оцінювали за її основними якісними показниками та розріджували середовищем для транспортування, яке розроблено науковцями Інституту свинарства і АПВ НААН. Тривалість транспортування еякулятів до лабораторії біотехнології Інституту розведення і генетики тварин імені М.В. Зубця НААН не перевищувала шести годин. Оцінена сперма кнурів відповідала вимогам, визначеним «Інструкцією із штучного осіменіння свиней» (2003).

Концентрацію сперматозоїдів у еякуляті визначали за допомогою камери Горяєва. Вживаність сперматозоїдів у годинах визначали за терморезистентною пробою при $+38^{\circ}\text{C}$ упродовж трьох годин. Термостресстійкість визначали упродовж трьох годин з еквілібрацією температур від $+12^{\circ}\text{C}$ до $+38^{\circ}\text{C}$ упродовж кожних 30 хв, згідно описаних вище методичних підходів. Весь обсяг лабораторних досліджень проводився на базі Інституту розведення і генетики тварин імені М.В. Зубця НААН (табл. 4.2).

Для підготовки сперми до кріоконсервації її центрифугували при 3100 об./сек. (900 g) упродовж 5 хвилин для концентрації сперматозоїдів у невеликому об'ємі еякуляту. Одержану концентровану суміш

сперматозоїдів розріджували лактозо-глицерино-жовтковим (ЛГЖ) середовищем та після 3-годинної еквілібрації при +4°C заморожували у формі відкритих гранул.

Встановлено, що найменший об'єм еякуляту був відібраний від кнура №79, найбільший – у №347 (табл. 4.2). Відмітимо, що у еякуляті останнього з досліджуваних кнурів, поряд з високим об'ємом сперми, спостерігався найменший об'єм сперматозоїдів у еякуляті (3,0%) за рівня їх рухливості 90%. У кнура №79, навпаки, було відмічено найвищий відсоток сперматозоїдів у еякуляті, але у перерахунку на кількість їх значення було найменшим серед досліджених тварин і не перевищувало 31,5 млрд за дещо заниженого рівня їх рухливості (80%).

4.2. Характеристика отриманої сперми кнурів

Індивідуальний №	Показник					
	об'єм, мл	порівняння із середнім показником, %	об'єм сперматозоїдів в еякуляті, %	загальна кількість сперматозоїдів в еякуляті, млрд.	рухливість сперматозоїдів, %	порівняння із середнім показником, %
1159	260,0	86,7	4,2	76,1	90,0	103,8
79	240,0	80,0	5,0	31,5	80,0	92,3
347	400,0	133,3	3,0	36,4	90,0	103,8
Середній показник	300,0		4,06	48,0	86,7	

Кращими показниками характеризувалася сперма кнура № 1159, а зафіксований в його еякуляті показник кількості сперматозоїдів був найвищим і склав 76,1 млрд. Отже, за основними морфологічними параметрами, спермограма досліджених кнурів не виходила за межі визначених стандартів для свиней, усереднений рівень рухливості сперми дослідних кнурів сягав 87,5%.

Для визначення придатності сперми кнурів до кріоконсервації і довготривалого збереження нами застосовано прискорений метод визначення виживаності сперматозоїдів (терморезистентна проба) та тест на термострестійкість. За вказаними основними показниками придатності сперми кнурів до кріоконсервації (рис. 4.7), кращими показниками характеризувалася сперма кнура №1159, для якого показники терморезистентної проби та термострестійкості становили відповідно 40,0% та 35,0%.

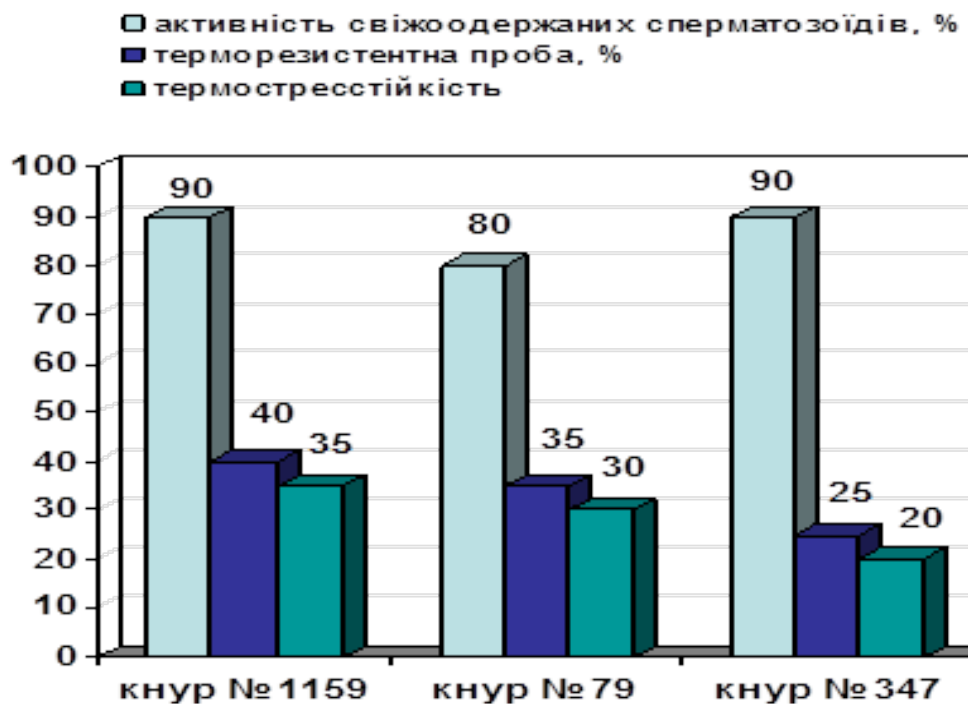


Рис. 4.7. Показники якості спермопродукції досліджених кнурів на придатність її до заморожування

Термостресстійкість сперми кнура № 347 знаходилася на рівні 20,0%, що дає підставу зробити висновок про знижену придатність сперматозоїдів цієї тварини для тривалого зберігання шляхом кріоконсервації. Причина такого явища може полягати у генетичних особливостях батька і матері, що за даними зоотехнічного обліку, отриманий шляхом «прилиття крові» тварин породи п'єтрєн, для яких визначено гірші показники якості спермопродукції, в тому числі стійкості сперматозоїдів до дії наднизьких температур. Очевидно, що селекційні прийоми, спрямовані на зниження показників осаленості туш тварин миргородської породи за рахунок використання плідників породи п'єтрєн, супроводжується небажаним зниженням показників фертильності тварин миргородської породи із різними долями кровності за поліпшувальною породою.

Наступний етап досліджень передбачав застосування технології кріоконсервації еякульованих сперматозоїдів кнурів з наступною перевіркою їх життєздатності після розморожування. Встановлено, що після центрифугування, розрідження сперматозоїдів кнурів середовищем ЛГЖ та 3-годинної еквілібрації при +4°C їх рухливість знизилась

у середньому на 5%. Слід зазначити, що від кожного кнура нами одержано по 250 гранул кріоконсервованих сперматозоїдів.

Розморожені сперматозоїди кнурів миргородської породи проявляли рухливість на рівні 13,33%. За аналізу рухливості після розморожування встановлено, що цей показник знизився в середньому на 83,7 % (рис. 4.8).

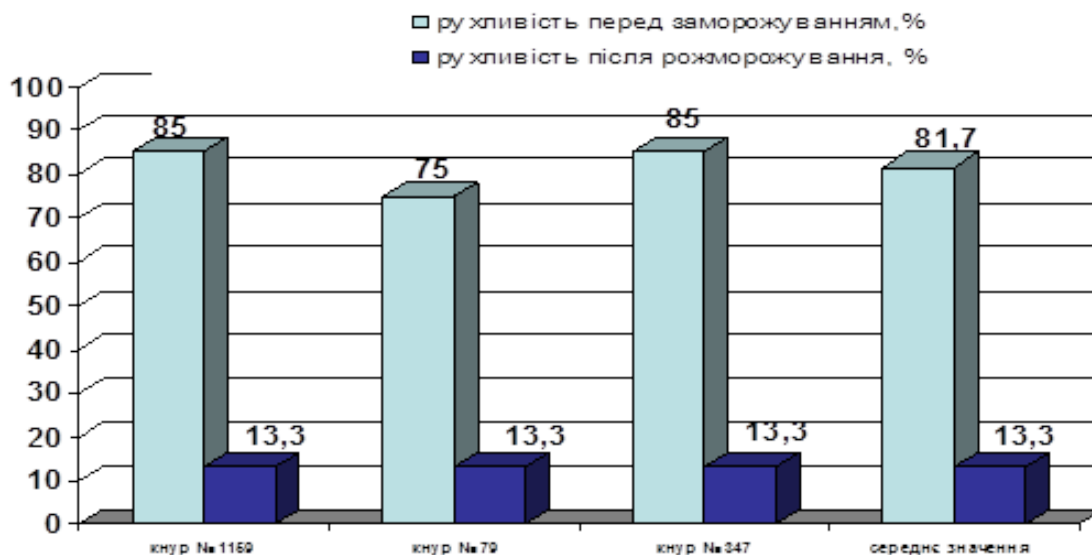


Рис. 4.8. Оцінка придатності еякульованої сперми кнурів до глибокого заморожування

Нами відмічена індивідуальна особливість якості сперми кнурів миргородської породи, що впливає на її придатність до кріоконсервації. Найбільш придатною до кріоконсервації за показником термостресстійкості була сперма кнурів № 1159 та № 79, яка становила відповідно 35,0% та 30,0%. Хоча, в цілому, показники придатності сперми кнурів до дії наднизьких температур були невисокими, це давало змогу зберегти отриманий генеративний матеріал тварин зникаючої породи миргородських свиней, що дає можливість проведення із ним подальших біотехнологічних маніпуляцій. За нашими даними, після деконсервації, в середньому, показник рухливості сперматозоїдів знизився на 83,7%.

За результатами аналізу племінних карток, всі кнури досліді були потомками одного плідника лінії Ловчика 1205, який у попередніх наших дослідженнях характеризувався негативними показниками стій-

кості сперми до заморожування. Відзначимо, що за результатами застосованих біотехнологічних методів при оцінці свіжоотриманої сперми кнурів, гірша її здатність до заморожування може бути пов'язана із впливом генотипу кнурів породи п'єтрєн, що виступали як представники породи-поліпшувача м'ясних якостей, але призвели до зниження показників стійкості сперми до дії наднизьких температур. Таким чином, наразі виникає суттєва проблема застосування існуючих біотехнологічних методів до збереження генеративного матеріалу тварин миргородської породи внаслідок нераціонального використання плідників породи п'єтрєн із невизначеним комплексом небажаних спадкових факторів і їх непрогнозованих комбінацій у особин помісного походження, що внаслідок недосконалості існуючої системи племінного обліку визнаються тваринами із статусом племінних. Отже, в комплексних програмах із збереження генофонду малочисельних і зникаючих порід свиней необхідно враховувати можливі ризики негативної коселекції, що поряд із підвищенням м'ясних якостей, може призводити до погіршення імунного статусу, якості м'ясної продукції, зниження фертильності та втраті унікальних генних комплексів адаптивності автохтонних тварин.

Показано, що фрагментація ДНК тісно корелює з показниками рухливості і, насамперед, із зниженням запліднюючої здатності генеративних клітин. Метод ДНК-комет тест, призначений для визначення фрагментації ДНК у сперматозоїдах тварин, є одним із інформативних методів для оцінки сперми (як нативної так і замороженої) в якості доповнення до стандартної спермограми плідників.

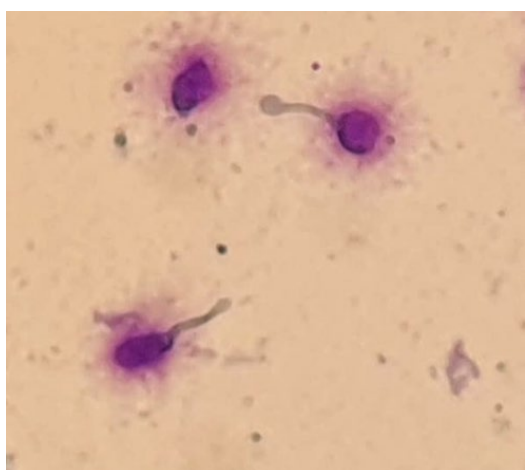
Результати оцінки кріоконсервованих сперматозоїдів кнурів миргородської породи за використання методу ДНК-комет тесту наведені у таблиці 4.3. За результатами ДНК-комет тесту було встановлена схильність еякульованих сперматозоїдів кнура № 347 до фрагментації ДНК, на що вказує найвищий її рівень (14,4%) проти 2,8% у кнура № 1159. Оскільки головним показником відсутності фрагментації ДНК, згідно використаного ДНК-комет тесту, є наявність сперматозоїдів з великим ореолом, то їх максимальна кількість була характерна саме для кнура № 1159 (95,2%; рис. 4.9). Слід зазначити, що саме сперма кнура № 1159 виявилась найбільш придатною до кріоконсервації за показником термостресстійкості та терморезистентної проби.

4.3. Рівень фрагментації ДНК кріоконсервованих сперматозоїдів кнурів

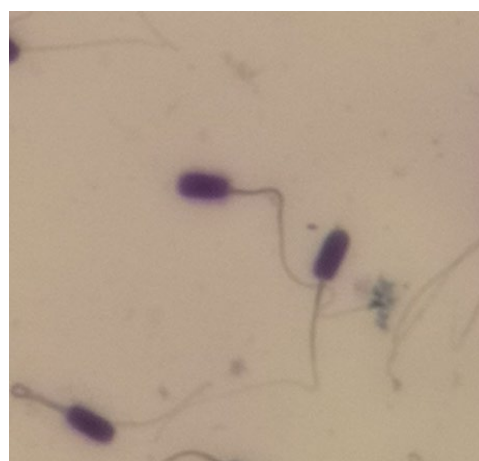
Індивіду- альний №	Сперматозо- їди з великим ореолом	Сперматозо- їди з се- реднім ореолом	Сперматозо- їди з ма- лим орео- лом	Клітини без оре- ола	Деградован і сперматозо- їди	Клітини з фрагмен- тованою ДНК
1159	$95,2 \pm 0,1$	$2,0 \pm 0,3$	$1,2 \pm 0,4$	$1,2 \pm 0,3$	$0,4 \pm 0,2$	$2,8 \pm 0,3$
79	$43,3 \pm 0,4$	$50,1 \pm 0,2$	$2,7 \pm 0,3$	—	$3,3 \pm 0,4$	$6,2 \pm 0,1$
347	$31,0 \pm 0,3$	$54 \pm 0,1$	$6,4 \pm 0,1$	$6,6 \pm 0,5$	$1,4 \pm 0,1$	$14,4 \pm 0,2$
Середнє значення	$56,5 \pm 19,7$	$35,4 \pm 16,7$	$3,4 \pm 1,5$	$2,6 \pm 2,0$	$1,7 \pm 0,8$	$7,8 \pm 0,33,4$

Сперматозоїди з наявністю фрагментованої ДНК після відповідної обробки і забарвлення характеризуються наявністю малого ореолу (рис. 4.9б), а їх максимальна кількість була встановлена у кнура № 347 (6,4%).

Таким чином, підводячи підсумок щодо результатів комплексного застосування лабораторних методів оцінки сперми кнурів на придатність до кріоконсервації, гірша заморожуваність сперми досліджених кнурів миргородської породи може бути пов'язана із впливом генотипу кнурів породи п'єстрен, що виступали в якості породи-поліпшувача м'ясних якостей. Це певним чином відбилося на показниках збалансованості їх каріотипу, що показано нашими попередніми дослідженнями, проте відмічена різниця між ними і чистопородними тваринами миргородської породи попередніх генерацій була статистично невірогідною через обмеженість досліджуваної вибірки тварин.



а – сперматозоїди з великим і середнім ореолом



б – сперматозоїди з малим ореолом з наявністю ДНК фрагментації

Рис. 4.9. Диференціація різних типів клітин за ДНК-комет тестом

Оскільки в результаті проведеної роботи були отримані результати щодо можливості застосування отриманих зразків еякульованої сперми кнурів миргородської породи до кріоконсервації за використання сучасних комплексних методичних підходів, незважаючи на незначні показники її виживаності після розморожування внаслідок генетичних особливостей кнурів, обраних для досліджень, відмічаємо перспективність проведення подальших досліджень з розробки та оптимізації відповідних методик, створення оптимальних видоспецифічних кріосередовищ для підвищення якісних показників розмороженої сперми кнурів зникаючих порід та доцільність продовження досліджень за цим напрямом. Без сумніву, існуючі селекційні програми роботи з малочисельними породами свиней потребують суттєвого вдосконалення у зв'язку з необхідністю врахування можливих ризиків зниження репродуктивних якостей і систематично підходити до комплексного оцінювання генотипу тварин, що використовуються в якості поліпшувачів та засновників ліній, впроваджувати у практику племінної роботи сучасні методи генетичного прогнозування оптимальної сполучуваності батьківських пар для отримання гетерозисного ефекту потомків на чистопородній основі.

Додаток

МІНІМАЛЬНІ ВИМОГИ ДО ЯКОСТІ СПЕРМИ КНУРІВ ДЛЯ ЗАМОРОЖУВАННЯ (Коваленко В. Ф., 2011)

Параметри	Мінімальні вимоги
Колір	Сіро-білий, білий, жовто-білий
Консистенція	молочна
Запах	специфічний
Об'єм, мл	100
Концентрація сперматозоїдів млн/мл	150–200
Загальна кількість сперматозоїдів, млрд	15–20
Прямолінійна рухливість, %	75
Терморезистентна проба, %	60
Комплексний бал оцінки сперми, бал	7
Термостресстійкість, %	40
Загальні морфологічні аномалії, %	20

ВИКОРИСТАНІ ЛІТЕРАТУРНІ ДЖЕРЕЛА

1. Pursel, V. G., Johnson L. A. Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *Journal of Animal Science*. 1975. Vol. 40, № 1. P. 99–102. <https://doi.org/10.2527/jas1975.40199x>.
2. Bwanga C. O, Braganca M. M., Einarsson S., Rodriguez-Martinez H. Cryopreservation of boar semen in mini- and maxi-straws. *Zentralblatt fur Veterinarmedizin. Reihe A*. 1990. Vol. 37, № 9. P. 651–658. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0442.1990.tb00958.x>.
3. Bwanga, C. O. Cryopreservation of boar semen. I: A literature review. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 1991. Vol. 32, № 4. P. 431–453. DOI: 10.1186/BF03546944.
4. . Gilmore J. A, Liu J., Peter A. T., Critser J. K. Determination of plasma membrane characteristics of boar spermatozoa and their relevance to cryopreservation. *Biology of Reproduction*. 1998. Vol. 58, № 1. P. 28–36. <https://doi.org/10.1095/biolreprod58.1.28>.
5. Agca Y., Gilmore J., Byers M., Woods E. J., Liu J., Critser J. K. Osmotic characteristics of mouse spermatozoa in the presence of extenders and sugars. *Biology of Reproduction*. 2002. Vol. 67, № 5. P. 1493–1501. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.005579>.
6. . Guthrie H. D, Liu J., Critser J. K. Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on motility of bovine spermatozoa. *Biology of Reproduction*. 2002. Vol. 67, № 6, P. 1811–1816. <https://doi.org/10.1095/biolreprod67.6.1811>.
7. Walters E., Men H., Agca Y., Mullen S. F, Critser E. S., Critser J. K. Osmotic tolerance of mouse spermatozoa from various genetic backgrounds: Acrosome integrity, membrane integrity, and maintenance of motility. *Cryobiology*. 2005. Vol. 50, iss. 2. P. 193–205. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2005.01.004>.
8. Verheyen G., Pletincx I., Van Steirteghem A. Effect of freezing method, thawing temperature and post-thaw dilution/washing on motility (CASA) and morphology characteristics of high-quality human sperm. *Human Reproduction*. 1993. Vol. 8, № 10. P. 1678–1684. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a137912>.
9. Thachil J. V., Jewett M. A. Preservation techniques for human semen. *Fertility and Sterility*. 1981. Vol. 35, № 5. P. 546–548. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)45498-1](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)45498-1).
10. Waterhouse K. E., Hofmo P. O., Tverdal A., Miller Jr R. R. Within

and between breed differences in freezing tolerance and plasma membrane fatty acid composition of boar sperm. *Reproduction*. 2006. Vol. 131, № 5. P. 887–894. <https://doi.org/10.1530/rep.1.01049>.

11. Johnson L. A., Weitze K. F., Fiser P., Maxwell W. M. C. Storage of boar semen. *Animal Reproduction Science*. 2000. Vol. 62, iss. 1-3. P. 143–172. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00157-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00157-3).

12. Buranaamnuay K., Wongtawan T., Kaeoket K. Intra-uterine artificial insemination with frozen-thawed boar semen in sows in Thailand. *Proc. 19th IPVS*, (Copenhagen, Denmark. 16-19 July 2006) Copenhagen. 2006. P. 16–19.

13. Griveau J. F. Le Lannou D. Influence of oxygen tension on reactive oxygen species production and human sperm function. *International Journal Andrology*. 1997. Vol. 20, № 4. P. 195–200. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2605.1997.00049.x>.

14. Bamba K., Cran D. G. Effects of treatment with butylated hydroxytoluene on the susceptibility of boar spermatozoa to cold stress and dilution. *Journal Reproduction and Fertility*. 1992. Vol. 95, № 1. P. 69–77. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0950069>.

15. Funahashi H., Sano T. Select antioxidants improve the function of extended boar semen stored at 10 degrees C. *Theriogenology*. 2005. Vol. 63, № 6. P. 1605–1616. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.06.016>.

16. Gadea J., Gumbao D., Matás C., Romar R. Supplementation of the thawing media with reduced glutathione improves function and the in vitro fertilizing ability of boar spermatozoa after cryopreservation. *Journal Andrology*. 2005. Vol. 26, № 6. P. 749–756. <https://doi.org/10.2164/jandrol.05057>.

17. Hernández M., Roca J., Gil M. A., Vázquez J. M., Martínez E. A. Adjustments on the cryopreservation conditions reduce the incidence of boar ejaculates with poor sperm freezability. *Theriogenology*. 2007. Vol. 67, № 9. P. 1436–1445. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.02.012>.

18. Breininger E., Beorlegui N. B., O'Flaherty C. M., Beconi M. T. Alpha-tocopherol improves biochemical and dynamic parameters in cryopreserved boar semen. *Theriogenology*. 2005. Vol. 63, Is. 8. P. 2126–2135. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.08.016>.

19. Pena F. J., Johannisson A., Wallgren M., Rodriguez Martinez H. Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different

fractions of the ejaculate. *Animal Reproduction Science*. 2003. Vol. 78, iss. 1-2. P. 85–98. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(03\)00049-6](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(03)00049-6).

20. Roca J., Gil M. A., Hernandez M., Parrilla I., Vazquez J. M., Martinez E. A. Survival and fertility of boar spermatozoa after freeze-thawing in extender supplemented with butylated hydroxytoluene. *Journal Andrology*. 2004. Vol. 25, iss. 3. P. 397–405. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2004.tb02806.x>.

21. Roca J., Rodriguez J. M., Gil M. A., Carvajal G., Garcia E. M., Cuello C., Vazquez J. M., Martinez E. A. Survival and in vitro fertility of boar spermatozoa frozen in the presence of superoxide dismutase and/or catalase. *Journal Andrology*. 2005. Vol. 26. P. 15–24. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2005.tb02867.x>.

22. Holt W. V., Van Look K. J. W. Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory tests of semen quality. *Journal Reproduction*. 2005. Vol. 127, iss. 5. P. 527–535. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00134>.

23. Rusu A. V., Miclea V., Zahan M. A new model of boar semen evaluation and the impact of cryogenic factor on spermatogenic cells. *J. Lucrări științifice Zootehnie și Biotehnologii*. 2009. Vol. 42, № 1. P. 85–91.

24. Hernandez M., Ekwall H., Roca J., Vazquez J. M., Martinez E., Rodríguez-Martínez H. Cryo-scanning electron microscopy (Cryo-SEM) of semen frozen in medium-straws from good and sub-standard freezer AI-boars. *Cryobiology*. 2007. Vol. 54 (1). P. 63–70. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2006.11.004>.

25. Jeyendran R. S., Van der Ven H. H., Perez-Pelaez M., Crabo B. G., Zaneveld L. J. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to the other semen characteristics. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1984. Vol. 70, iss. 1. P. 219–228. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0700219>.

26. Hossain A. M., Rizk B., Barik S., Huff C., Thorneycroft I. H. Time course of hypo-osmotic swellings of human spermatozoa: evidence of ordered transition between swelling subtypes. *Human Reproduction*. 1998. Vol. 13, № 6. P. 1578–1583. <https://doi.org/10.1093/humrep/13.6.1578>.

27. Інструкція із штучного осіменіння свиней : затв. наказом М-ва аграрної політики України від 13 груд. 2002 р. N 395. Київ : Аграрна наука, 2003. 56 с.

28. Спосіб прогнозування термостресстійкості спермійв кнур : пат. 52538 Україна МПК А61D 19/00. № u 201003336 ; подано 22.03.2010 ;

опубл. 25.08.2010, Бюл. № 16.

29. Коваленко В. Ф., Базалевич А. В. Використання у тваринництві низьких температур для селекції статевих клітин. *Біотехнологічні, селекційні та організаційні методи відтворення, зберігання і використання генофонду тварин*. Київ, 1997. С. 74–75.

30. Стародуб Л. Ф., Костенко С. О., Джус П. П., та ін. Моніторинг цитогенетичних показників різних порід свиней. *Вісник Сумського національного аграрного університету*. Серія : Тваринництво. 2012. Вип. 12. С. 60–64.

Розділ 5.

ПІДГОТОВКА ДЕКОНСЕРВОВАНИХ СПЕРМАТОЗОЇДІВ КНУРІВ ДО ЗАПЛІДНЕННЯ *IN VITRO*

Відомо, що кріопошкодження сперматозоїдів кнурів зазвичай спостерігають після деконсервації, але не всі зазнають однакових пошкоджень. Відомо про значні відмінності у виживаності деконсервованих еякульованих сперматозоїдів (від 25% до 60%). Хоча відмінності між методами заморожування (кріоконсервація в парах рідкого азоту або на сухому льоду), порівняно з програмним заморожуванням з контрольованою швидкістю, можуть сприяти деяким з цих відмінностей, основна детермінанта, яку наводять більшість світових вчених знаходиться в кожному індивідуальному еякуляті кнура. Слід відмітити, що кожен еякулят кнура демонструє унікальну кріорезистентність з очевидними відмінностями між породною приналежністю тварини та між еякулятами однієї особи.

Еякуляти кнурів класифікують за якістю сперми після кріоконсервації, що визначається як «придатність до заморожування» або кріорезистентність, стійкість до кріоконсервації. Застосування цього показника допомагає уникнути проведення штучного запліднення еякулятом, який неякісно заморожується, оскільки запліднювальна здатність його різко знижується.

Отже, значні зусилля вчених спрямовано на визначення кріомаркерів, які допомагають передбачити кріорезистентність свіжоотриманого еякуляту.

Ідентифікація маркерів придатності до кріоконсервації зосере-

джена на білках сперматозоїдів та спермальній плазмі, які опосередковують реакції гамет на осмотичний та тепловий стрес, хоча достовірний механізм, за допомогою якого вони виконують свою роль, залишається значною мірою нерозкритим. Наприклад, в спермі кнурів відносно велика кількість білків, один з них – білок теплового шоку 90. Цей білок зв'язує акрозин, триозофосфат ізомерази та вольтаж-залежний аніонний канал 2 у свіжоотриманому еякуляті, відрізняється між еякулятами з хорошою та поганою здатністю до заморожування. Крім того, активність специфічного для сперми кнурів ферменту акрозину у свіжоотриманій спермі пов'язана з її стійкістю до кріоконсервації. Встановлено, що високий вміст окремих білків спермальної плазми, наприклад фібронектину 1 та активність специфічних ферментів, таких як N-ацетил- β -гексозамінідаза в еякулятах кнурів пов'язані із підвищеною кріорезистентністю та придатністю до заморожування.

Наразі технологія кріоконсервації еякульованих сперматозоїдів кнурів широко не застосовується для промислового розведення свиней. Такий підхід, частіше застосовують в програмах зі збереження абorigенних порід чи в разі збереження генетичних ресурсів високоцінних особин. Тому підхід із тестування свіжоотриманих еякулятів на кріотолерантність та придатність до заморожування не завжди застосовують. Після процедури кріоконсервації часто такий генетичний матеріал демонструє невисокі показники життєздатності адже в переважній кількості випадків використовується для генетичних досліджень. В разі використання деконсервованих сперматозоїдів зі зниженою життєздатністю для отримання ембріонів поза організмом необхідно проводити дослідження з підвищення їх життєвого потенціалу та фертильності. Отже, метою досліджень було вивчити якісні показники деконсервованих еякульованих сперматозоїдів кнурів із застосуванням різних культуральних середовищ за температури культивування $+37^{\circ}\text{C}$.

Одним із складових сім'яної рідини є присутній у ній трофобластичний b-1-глікопротеїн, який негативно впливає на запліднювальну здатність сперматозоїдів шляхом зниження активності ферменту акрозину. Акрозин – унікальна нейтральна протеїназа. Він розташовується в акросомальній ділянці головки сперматозоїда на внутрішній мембрані у формі неактивного ферменту (проакрозину), який при звільненні з акросоми перетворюється на акрозин. Встановлено, що активність акрозину високо корелює із частотою запліднення. Використання

найбільш раціональної технології обробки (відмивання) сперми, у процесі якої ефективно виділяються повноцінні та функціонально активні сперматозоїди з еякуляту – це необхідна умова повноцінного запліднення *in vitro*.

Рекомендації розроблено в рамках завдання 31.03.00.06.П «Удосконалити технології кріоконсервації ембріонів вітчизняних порід свиней із застосуванням методу *in vitro*» (№ ДР 0121U107830) ПНД 31 НААН «Генетика, збереження та відтворення біоресурсів у тваринництві» (підпрограма 3 «Біотехнологія відтворення сільськогосподарських тварин», 2021–2023 рр.).

Вилучення сперматозоїдів із еякуляту людини як модель для досліджень гамет ссавців

Одним з найважливіших факторів для визначення успіху під час запліднення та розвитку ембріона є якість статевих клітин. Неякісно підготовлені сперматозоїди не забезпечать отримання повноцінних ембріонів. Успішне запліднення та подальший розвиток ембріона можливі лише за умови повноцінної структури хроматину сперматозоїдів. Еякулят – це порція сперматозоїдів і плазми, що виділяється з уретри під час еякуляції. Для виділення сперматозоїдів із еякулята застосовують відмивання їх від сім'яної плазми шляхом центрифугування в градієнті щільності та метод «swim-up» (спливання). Важливою умовою під час вибору того чи іншого методу є збереження життєздатності, найвищої активності та повноцінної структури хроматину сперматозоїдів.

Досить часто застосовують метод центрифугування (1700 g), який дозволяє розділити еякулят на сперматозоїди та спермоплазму. Далі сперматозоїди відмивають двічі фізіологічним розчином або, після розведення сперми в 0,9% NaCl (1:1), відокремлення проводять центрифугуванням за 400 g упродовж 5 хв. Це найпростіший метод виділення сперматозоїдів із еякуляту і найчастіше застосовується до еякуляту з високими фізіологічними показниками. До недоліків методу відносять утворення активних форм кисню (АФК) в осаді клітин після центрифугування, а також осідання разом з рухомими сперматозоїдами потенційно токсичних клітин та мертвих сперматозоїдів, що може мати негативний ефект на їх життєздатність.

Одним із напрямків оптимізації відокремлення сперматозоїдів є

розробка методів, що дозволяють з найбільшою ефективністю виділити з еякуляту фракцію прогресивно рухливих сперматозоїдів, що використовується для запліднення ооцитів, яка мала б найкращі показники життєздатності. Тому найбільш широко застосовують для отримання рухомих фракцій спосіб спливання «swim-up», чи фракціонування еякуляту в градієнті щільності з використанням препарату «Percoll» або «PureSperm».

Центрифугування сперми в градієнті щільності забезпечує добір активних повноцінних сперматозоїдів. Метод ґрунтується на принципі центрифугування сперми через градієнт, утворений двома-трьома шарами розчинів із зростаючою щільністю (маса/об'єм), що містять різні концентрації частинок колоїдного кремнію. Таким чином, підхід заснований на поділі клітин еякулята за їхньою питомою вагою та щільністю.

В разі методу градієнтного центрифугування еякулят розташовується поверх градієнта. Під час центрифугування різні клітини займають певне положення, в якому їхня плавуча щільність відповідає щільності градієнта. Поділ заснований на тому, що зрілі сперматозоїди мають щільну упаковку ДНК і більшу щільність, ніж 80% розчин, тому проходять крізь нього і осідають на дні пробірки. Одержані сперматозоїди, які знаходяться на дні пробірки, мають найбільшу рухливість. Градієнтне центрифугування застосовується багатьма лабораторіями IVF як штатний спосіб обробки сперми низької якості.

У лабораторних умовах розчини препарату «Percoll» готують на HBS + BSA буфері з рН 8,0 (0,13 М NaCl, 0,004 М KCl, 0,001 М CaCl₂, 0,0005 М MgCl₂, 0,014 М фруктози, 0,01 М N-2-гідроксietилпіперазин-N'-2-етансульфонової кислоти та 1 мг/мл сироваткового альбуміну великої рогатої худоби).

«PureSperm» складається з колоїдного розчину двоокису кремнію в збалансованому розчині солей та буфера «HEPES». Для досягнення найкращих результатів градієнт слід готувати безпосередньо перед використанням та підігріти до кімнатної температури.

Методика виділення сперматозоїдів з еякулята методом центрифугування в градієнті щільності з використанням «PureSperm» полягає в наступному:

1. Сперму інкубують за температури +37°C упродовж 30 хв для розрідження.
2. Готують два градієнти: наприклад, 1,5 мл 40% компонента та 1,5

мл 80% компонента в пробірці з конічним дном.

3. Розріджений еякулят обережно, не порушуючи розділення шарів, нашаровують на градієнт.

4. Центрифугують при 300g упродовж 20 хв. Після центрифугування на дні конічної пробірки утворюється осад із найбільш рухомої фракції сперматозоїдів.

5. Пастерівською піпеткою обережно видаляють сім'яну плазму, а також верхню інтерфазу, 40% шар та нижню інтерфазу. Залишають основну частину 80% шару.

6. Чистою стерильною піпеткою, зануреною в 80% шар, аспірують осад, ресуспендують його в буфер для гамет і переносять в чисту пробірку для відмивання залишків колоїдного розчину.

7. Центрифугують 10 хв при 600g.

8. Повторюють відмивання з буфером для гамет.

9. Видаляють супернатант і ресуспендують у невеликому обсязі середовища для приготування сперматозоїдів або середовища для запліднення.

10. Підраховують кількість сперматозоїдів та обчислюють концентрацію. За потреби роблять розведення. Зберігають в інкубаторі з 6% CO₂ за температури +37°C.

В разі правильного виконання вищеописаної методики осад містить тільки функціонально активні рухливі сперматозоїди, які можуть бути використані для IVF.

Крім того, у процесі градієнтного центрифугування можуть бути відокремлені інші клітини, присутні в спермі, наприклад, лейкоцити та епітеліальні клітини, так само як мертві сперматозоїди та ті, що гинуть, які служать джерелом АФК і можуть викликати оксидативний стрес. Одночасне видалення сперматозоїдів з пошкодженим хроматином і джерелом АФК має пом'якшити вплив їх високої концентрації на зразки сперми у процесі її обробки.

Метод спливання «swim-up», або флотація, імітує природне переміщення сперматозоїдів через цервікальний слиз. При цьому фракція сперми розташовується під культуральним середовищем, що дозволяє прогресивно рухливим сперматозоїдам переміститися у фракцію середовища. До недоліків методу «swim-up» слід віднести неадекватність підходу при вираженій астенозооспермії (низькою рухливістю сперматозоїдів).

Метод «swim-up» відокремлює сперматозоїди від решти складу еякуляту виключно на основі їх рухливості, проте не відокремлює ні морфологічно деформовані, ні сперматозоїди з порушеним хроматином. Також не видаляються бактерії та віруси, присутність яких і продукованих ними ендотоксинів або реакційно-активних сполук кисню з клітин, мертвих або сперматозоїдів, що гинуть, надає згубну дію на функціональну повноцінність хроматину, на запліднювальну здатність і виживаність всіх сперматозоїдів.

Виділення сперматозоїдів даним методом можна здійснювати або з нативної сперми, внаслідок чого рухливі сперматозоїди з центрифугованого осаду виходять у верхню фазу – в нашароване чисте середовище або краще спочатку відмити сперматозоїди та ресуспендувати осад перед наступним виділенням гамет спливанням. Для в'язкого зразка сперми можна зробити попереднє розведення із середовищем для сперматозоїдів.

Методика виділення сперматозоїдів із сперми методом спливання «swim-up» полягає в наступному:

1. У центрифужній пробірці на аліквоту розрідженого еякуляту нашаровують середовище для методу «swim-up».
2. Пробірку ставлять у термостат під кутом приблизно 45° . Інкубують упродовж однієї години за температури $+37^\circ\text{C}$.
3. Після інкубації акуратно відбирають близько 1 мл суспензії над спермою, щоб не пошкодити нижній шар і інтерфазу, і центрифугують при 600g протягом 10 хв до утворення осаду із сперматозоїдів.
4. Відбирають осад і потім ресуспендують його в малому обсязі відповідного середовища для приготування сперматозоїдів або середовища для запліднення, щоб використовувати під час IVF.
5. Підраховують кількість сперматозоїдів та визначають їх концентрацію. Зберігають в інкубаторі з 6% CO_2 при $+37^\circ\text{C}$.

Методика виділення попередньо відмитих сперматозоїдів методом спливання полягає в наступному:

1. У конічну пробірку відбирають аліквоту розрідженого еякуляту та додають приблизно такий самий обсяг буфера для гамет. Центрифугують при 300 g упродовж 20 хв.
2. Видаляють супернатант, а осад ресуспендують у буфері для гамет. Центрифугують при 300g упродовж 10 хв.
3. Видаляють супернатант, а на осад нашаровують середовище для сперматозоїдів та інкубують в атмосфері CO_2 упродовж однієї години за температури $+37^\circ\text{C}$.

4. Відбирають супернатант зі сперматозоїдами, що «спливли», і переносять у чисту пробірку, підраховують концентрацію сперматозоїдів.

Метод «swim-up» забезпечує виділення сперматозоїдів від еякуляту виключно завдяки їхній рухливості. Хоча збільшується відсоток виділення рухомих сперматозоїдів, проте малорухливі сперматозоїди теж потрапляють у середовище, а також сперматозоїди з морфологічними дефектами та пошкодженою ДНК. Тобто метод «swim-up» не відокремлює морфологічно деформовані сперматозоїди і сперматозоїди з порушеним хроматином. У процесі «swim-up» не видаляються бактерії та віруси, присутність продукованих бактеріями ендотоксинів або реакційно активних сполук кисню з клітин негативно впливають на функціональну повноцінність хроматину, на запліднювальну здатність і виживання всіх сперматозоїдів.

Відомо, що застосування градієнту щільності дозволяє ефективно виділяти з еякуляту найбільш рухливі сперматозоїди. А з допомогою методу «swim-up» отримуємо найбільш життєздатні сперматозоїди, порівняно з виділеними методами простого відмивання від плазми та безперервного центрифугування в градієнті щільності. Щодо того, який із методів виділення сперматозоїдів є більш ефективним наразі єдиної думки немає. Є дані, що вказують на переваги використання як градієнту щільності так і «swim-up». Порівняльний аналіз цих двох основних методів виділення прогресивно рухомих сперматозоїдів показав, що метод «swim-up» більш ефективний для їх відбору з нормальним хроматином, ніж градієнт щільності. Більше того, після обробки в градієнті «PureSperm» в деяких випадках підвищувався ступінь пошкодження ДНК (індекс фрагментації – ІФ). Середній ІФ в еякуляті становив 12% після застосування «swim-up» – 5,5%.

Деякі автори вважають, що ефективним для виділення найбільш рухомих сперматозоїдів з повноцінною структурою хроматину є комбінований метод. Суть його полягає у послідовному застосуванні центрифугування в ізотонічному 90% градієнті щільності «Percoll» та подальшого спливання сперматозоїдів з одержаного осаду. Ця модифікація дозволяє поєднувати переваги обох методик. Застосування комбінованого методу виділення найбільш рухомих сперматозоїдів дозволяє отримати популяцію зі значно кращими морфологічними характеристиками, порівняно з нативним еякулятом як при нормо-, так і при патоспермії.

5.2. Використання для запліднення *in vitro* сперматозоїдів, отриманих різними методами

Технологія отримання *in vitro* ембріонів великої рогатої худоби включає дозрівання *in vitro* (IVM), запліднення *in vitro* (IVF) і культивування *in vitro* (IVC) до стадії бластоцисти. Під час природнього запліднення цервікальний слиз створює бар'єр, який дозволяє мігрувати лише сперматозоїдам з нормальною морфологією, прогресивною рухливістю та повноцінним ядром. Свіжі еякуляти бугаїв зазвичай мають понад 80% прогресивно рухомих сперматозоїдів і 85% морфологічно нормальної форми. Кріоконсервована сперма бугая має нижчий відсоток прогресивної рухливості сперматозоїдів (30–70%), тому під час оптимізації слід приділити особливу увагу методам їх підготовки для отримання ембріонів *in vitro*. Добір сперматозоїдів відокремлює рухливі сперматозоїди від нерухомих, видаляє сім'яну плазму, кріопротектори, а також одночасно ініціює активність гамет. Ефективність методів підготовки можна оцінити за допомогою різних параметрів сперми, таких як: рухливість сперматозоїдів, морфологія, концентрація, життєздатність, активність мембрани, стан акросоми, утворення активних форм кисню, зрілість і цілісність хроматину.

Якісна характеристика сперматозоїда – це одна з найважливіших умов, при якому відбувається процес запліднення з наступним розвитком спочатку ембріона, а потім і плода. Вкрай складно отримати ембріони гарної якості з погано підготовлених для запліднення сперматозоїдів. Це зумовлено тим, що еякулят багатокomпонентний і складається з сім'яної рідини, сперматозоїдів, імунних та епітеліальних клітин, бактерій та клітинного дебрису.

Препарат «Percoll» це частинки колоїдного кремнезему (15–30 нм в діаметрі), покриті полівінілпіролідом для підвищення питомої щільності середовища до 1,13 г/мл. Він також використовується для виділення бактерій, нейтрофілів, вірусів і субклітинних частинок. Центрифугування в градієнті щільності «Percoll» (90–45%) використовується для відбору рухливих сперматозоїдів та використання їх для запліднення *in vitro*. Спливання «swim-up» є ще одним часто використовуваним методом відбору сперми для IVF. Це простий і дешевий метод, який відбирає високорухливі сперматозоїди, що досягають поверхні середовища після інкубації.

Враховуючи практичність вказаних вище методів відбору, Wolf С.А. з колегами (2008) вивчали як метод «swim-up» і центрифугування

сперматозоїдів у градієнті щільності впливає на співвідношення статі ембріонів великої рогатої худоби, отриманих *in vitro*. Стать ембріонів визначали за допомогою ПЛР. В разі центрифугування сперматозоїдів у градієнті щільності 48,6% ембріонів ($n = 90$) були чоловічої статі і 51,4% ембріонів ($n = 95$) – жіночими. За використання «swim-up» виявлено, що у 58,4% – ембріони чоловічої ($n = 83$) і 41,6% ембріонів жіночої статі ($n = 59$).

Parrish J.J. з колегами вивчали вплив розділення сперматозоїдів бугаїв методом «swim-up» або центрифугуванням в градієнті щільності на запліднення *in vitro* та ранній ембріональний розвиток. Метою цих досліджень було охарактеризувати розділення кріоконсервованих сперматозоїдів за градієнтом щільності, а потім порівняти розділення сперматозоїдів щодо здатності сперматозоїдів запліднювати ооцити *in vitro*. Початкові експерименти показали, що центрифугування сперми в градієнті «Percoll» упродовж 15 хвилин при 700g було достатнім для отримання рухливих сперматозоїдів. Більшість нерухомих сперматозоїдів було знайдено на межі 45- і 90%-х шарів «Percoll», тоді як рухливі сперматозоїди були в основному у нижній частині градієнта.

Коли кріоконсервовану сперму від кожного з семи бугаїв відокремлювали шляхом спливання, середнє значення рухливих сперматозоїдів було $9\% \pm 1$. Більше сперматозоїдів було відновлено після поділу в градієнті «Percoll» ($P < 0,05$), при цьому було відновлено $40\% \pm 4$ рухомих сперматозоїдів. Вплив процедури відокремлення на запліднення *in vitro* виявив, що відокремлені сперматозоїди «swim-up» проникли в яйцеклітин у $74\% \pm 5$, тоді як відокремлені сперматозоїди за допомогою «Percoll» проникли в $52\% \pm 8$ яйцеклітин ($P < 0,05$).

Процедура поділу не вплинула на показники поліспермії, із середнім значенням $1,25 \pm 0,9$ для сперматозоїдів, відокремлених «swim-up», і $1,14 \pm 0,7$ для сперматозоїдів, відокремлених за методом центрифугування з «Percoll» ($P > 0,05$). За використання сперматозоїдів двох бугаїв, відокремлених за допомогою «swim-up» або центрифугуванням в «Percoll», було виявлено різницю в швидкості дроблення на користь відокремлених сперматозоїдів методом «swim-up» ($P < 0,05$), але не спостерігали різниці під час розвитку на сьомий день до стадії морули-бластоцисти ($P > 0,05$). Недоліки методу центрифугування з «Percoll» можна легко подолати, а процедура була швидшою та дала в шість разів більше рухливих сперматозоїдів, ніж в разі використання методу «swim-up».

Liu В. з колегами вивчали вплив методів «swim-up» і центрифугування в «Percoll» на якість відокремлених сперматозоїдів яків та розвиток ембріонів *in vitro*. Зразки кріоконсервованої сперми обробляли за допомогою методів «swim-up» та центрифугування в градієнті «Percoll». Оцінювали концентрацію сперматозоїдів, їх прогресивну рухливість, відновлення рухомих сперматозоїдів, цілісність мембрани, цілісність акросоми та хроматину та порівнювали у відновлених зразках. Крім того, було оцінено вплив двох методів отримання сперматозоїдів на розвиток ембріонів *in vitro* до стадії бластоцисти. Сперматозоїди, відокремлені «swim-up», мали вищу рухливість, у той час як концентрація і відсоток відновлення рухомих сперматозоїдів були вищими під час центрифугування в градієнті «Percoll».

За даними оптичної та електронної мікроскопії за використання методу «swim-up» отримано вищий відсоток сперматозоїдів з непошкодженою плазматичною мембраною та акросомою, ніж центрифугування в градієнті «Percoll». Однак не було різниці у відсотках сперматозоїдів з інтактним хроматином. Кількість ембріонів, які досягли стадії бластоцисти, у двох групах не відрізнялась, а рівень дроблення ембріонів був вищий, коли використовували метод «swim-up».

Mehmood А. з колегами досліджували кріоконсервовану сперму п'яти буйволів щодо ефективності застосування вказаних вище методів для відокремлення життєздатних сперматозоїдів та одержання ембріонів *in vitro*. Аналізували відновлення рухливості сперматозоїдів (%), збільшення цілісності мембрани (%) і цілісності акросоми (%). Відокремлені сперматозоїди методом «swim-up» показали вищу рухливість ($P < 0,05$), тоді як відсоток відновлення рухомих сперматозоїдів був вищим після розділення в «Percoll» ($P < 0,05$). Цілісність мембрани сперматозоїдів (%), відокремлених за допомогою «swim-up», була значно вищою ($P < 0,05$), порівняно зі сперматозоїдами, відокремленими за допомогою «Percoll». За використання сперматозоїдів після «swim-up» встановлено більш високий індекс дроблення ембріонів ($P < 0,001$). Таким чином, для покращення ефективності отримання *in vitro* ембріонів буйволів рекомендовано відокремлювати сперматозоїдів методом «swim-up».

5.3. Вплив середовищ для флотації на деконсервовані еякульовані сперматозоїди кнура

Сперма кнурів чутлива до низьких температур, і безумовно є важливим розробка ефективних методів кріоконсервації. Має значний вплив відмивання сперматозоїдів після розморожування, температура інкубації на їх життєздатність. Збільшення фрагментації ДНК сперматозоїда суттєво впливає на ефективність запліднення.

В дослідженнях використано деконсервовані еякульовані сперматозоїди кнура миргородської породи Камиш 253. Генетичний матеріал зберігався в Банку генетичних ресурсів тварин ІРГТ ім. М.В. Зубця НААН. Суспензію сперматозоїдів розморожували на водяній бані за температури +37°C упродовж 5 хв до повного розморожування. Відокремлення деконсервованих сперматозоїдів від кріоконсерванта та розріджувача проводили в трьох різних середовищах: в середовищі Sp-TALP Parrish J.J. et al. (1988), TALP безCa²⁺ (табл. 5.1) Ковтун С.І. та ін. (2005) та Sperm Preparation Medium (Origio, Denmark) методом «swim-up». Склад останнього середовища вказано на <https://tsmb.ru/catalog/culture-media/environment-sperm-preparation-medium/>.

5.1. Склад середовищ для відокремлення деконсервованих сперматозоїдів (мг на 20 мл води)

Компоненти фірми Sigma (номер за каталогом)	TALP без іонів Ca ²⁺	Sp-TALP Parrish J.J.
1. Хлорид натрію, NaCl (S 5886)	130,9	117,0
2. Хлорид калію, KCl (S 5405)	4,0	4,62
3. Гідросульфат натрію, NaHCO ₃ (S 5761)	42,0	42,0
4. Дигідрофосфат натрію, NaH ₂ PO ₄ (S 5011)	0,94	0,82
5. Лактат натрію, 60 % сироп (L 7900)	11,2	—
6. Хлорид магнію, MgCl ₂ x 6 H ₂ O (M 2393)	2,0	1,62
7. Хлорид кальцію, CaCl ₂ x H ₂ O (C 7902)	—	5,88
8. Нерес (H 9136)	24,0	47,6
9. Феноловий червоний (P 3532)	0,15	—
10. Канаміцин сульфату (P 5530)	1,5	—
11. Піруват натрію (P 5280)	2,2	2,2
12. БСА (A 6003)	120,0	120,0
13. Глюкоза (G 7021)	50,0	—
14. Гентаміцин (p-n)	—	20,0 мл

Для цього розташовували пробірку з 2 мл теплої середовища (+37°C) під кутом 45°. Флотацію сперматозоїдів від розріджувача та кріоконсерванта проводили у трьох середовищах. На дно пробірки підшаровували 0,2 мл розмороженої суспензії сперматозоїдів та на 15 хв залишали в термостаті за температури +37°C рисунок 5.1.

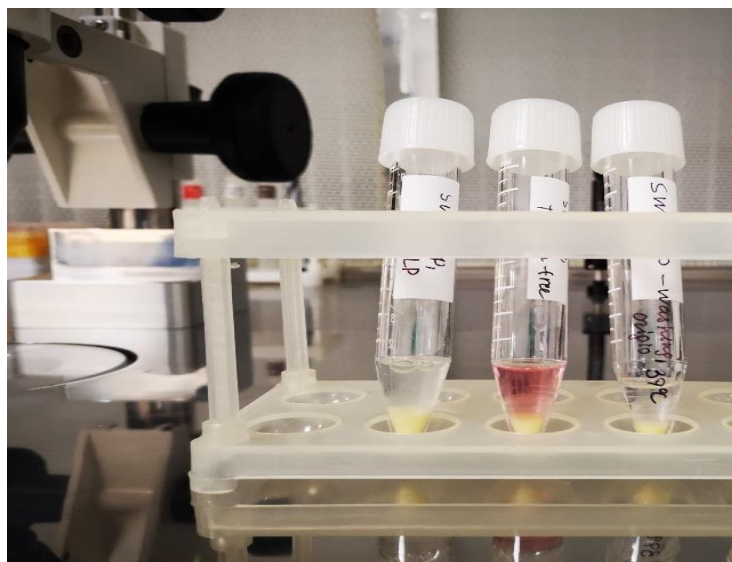


Рис. 5.1. Флотація суспензії сперматозоїдів у трьох різних середовищах

Після цього проводили оцінку рухливості та визначали концентрацію сперматозоїдів з використанням камери Маклера (рис. 5.2). Підрахунок проводили у трьох повторах за збільшення в 400 разів.

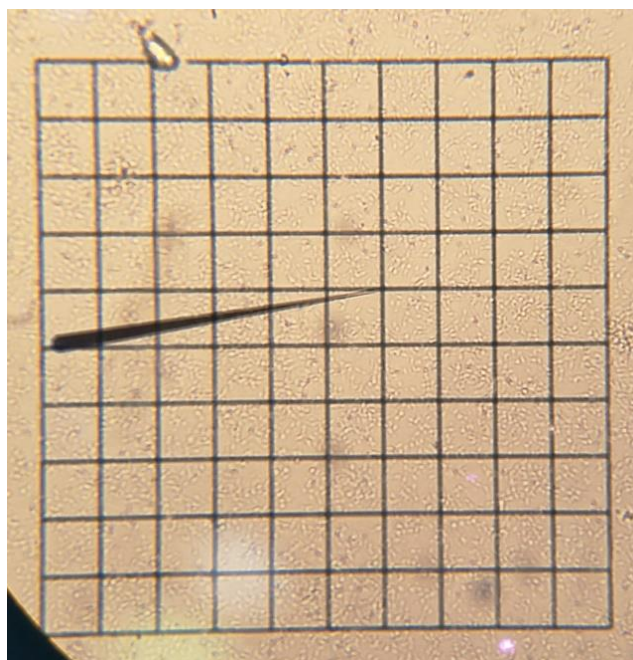


Рис. 5.2. Камера Маклера для підрахунку сперматозоїдів.

Для всіх зразків проводили обчислення середнього арифметичного значення та значення середньоквадратичної помилки ($M \pm m$). Отриманий цифровий матеріал статистично опрацьовували із застосуванням пакету програм Microsoft Office Excel 2010.

Після відмивання деконсервованої суспензії сперматозоїдів за температури $+37^{\circ}\text{C}$ у трьох різних середовищах ми отримали дані, які наведено в таблиці 5.2.

5.2. Кількісні показники сперматозоїдів після флотації в різних середовищах

Середовище	Концентрація (млн/мл)	Рухливість (%)	Рухливість (млн/мл)
Sp-TALP Parrish J.J. et al. (1988)	$69,7 \pm 3,1^*$	$9,7 \pm 0,86^*$	$6,8 \pm 0,56$
TALP Ca^{2+} free	$71,0 \pm 2,58^*$	$5,0 \pm 1,49^*$	$3,56 \pm 0,27$
Sperm Preparation Medium, Origio	$21,3 \pm 2,27^*$	$0,7 \pm 0,86^*$	$0,15 \pm 0,13$

Примітка: *відмінності в межах однієї колонки достовірні при $P < 0,01$

За використання середовища Sp-TALP Parrish J. J. et al. (1988) та TALP Ca^{2+} free для флотації життєздатних сперматозоїдів концентрація їх була майже на однаковому рівні та становила, $69,7$ млн/мл та $71,0$ млн/мл, відповідно. В разі використання середовища Sperm Preparation Medium отримано значно нижчі показник концентрації сперматозоїдів, а саме $21,3$ млн/мл.

Найвищу рухливість сперматозоїдів на рівні $9,7\%$ спостерігали у середовищі Sp-TALP Parrish J.J. et al. (1988). У середовищі Sperm Preparation Medium було отримано показники рухливості сперматозоїдів у $13,8$ разів нижче, ніж за використання середовища Sp-TALP Parrish J.J. et al. (1988). Рухливість сперматозоїдів на рівні $5,0\%$ спостерігали за використання середовища для флотації TALP Ca^{2+} free.

Під час запліднення важливим є не лише показник загальної рухливості сперматозоїдів, а також кількості таких рухливих сперматозоїдів у 1 мл. За використання середовища Sp-TALP Parrish J.J. et al. (1988) цей показник був на рівні $6,8 \pm 0,56$ млн в 1 мл. За флотації сперматозоїдів у середовищі Sperm Preparation Medium кількість рухливих сперматозоїдів в 1 мл була лише $0,15 \pm 0,13$ млн/мл. За використання середовища TALP Ca^{2+} free цей показник був на рівні $3,56 \pm 0,27$ млн в 1 мл.

Слід відмітити, що найвищу загальну кількість сперматозоїдів було отримано в середовищі TALP Ca^{2+} free, $71,0 \pm 2,58$ млн/мл.

Найвищу кількість рухливих сперматозоїдів після застосування методу флотації отримано в середовищі Sp-TALP Parrish J.J. et al. (1988) цей показник становив $6,8 \pm 0,56$ млн/мл. На нашу думку, така кількість рухливих сперматозоїдів може забезпечити високий рівень запліднення поза організмом, оскільки для результативного запліднення однієї яйцеклітини вирішальним показником є не кількість сперматозоїдів, а здатність до запліднення. Також, застосовуючи такі підходи можливо зменшити рівень поліспермії, яка є однією з найбільш поширених «аномалій» під час запліднення поза організмом у свиней.

ВИСНОВКИ

1. Наразі різні методи виділення сперматозоїдів тварин після розморожування можна застосовувати з однаковою ефективністю. Вибір методу залежить від того, проводиться виділення сперматозоїдів для досліджень або для штучного осіменіння самок, а також від характеристик еякуляту та правил, передбачених у конкретній лабораторії.

2. За допомогою комбінації різних підходів до маніпуляцій з деконсервованими еякульованими сперматозоїдами кнурів можливо досягти прийнятної життєздатності для забезпечення високого рівня запліднення поза організмом.

3. Встановлено, що оптимальним середовищем для відбору сперматозоїдів методом флотації є Sp-TALP Parrish J.J. et al. (1988), в якому отримано $69,7 \pm 3,1$ млн/мл сперматозоїдів, з яких $6,8 \pm 0,56$ млн/мл були рухливими.

4. Показано, що застосовувати комерційне середовище Sperm Preparation Medium не доцільно для відбору сперматозоїдів методом флотації, за його застосування отримано найнижчу концентрацію сперматозоїдів ($21,3 \pm 2,27$ млн/мл) з найнижчою кількістю рухливих ($0,15 \pm 0,13$ млн/мл).

ВИКОРИСТАНІ ЛІТЕРАТУРНІ ДЖЕРЕЛА

1. Knox R. V. The fertility of frozen boar sperm when used for artificial insemination. *Reproduction in Domestic Animals*. 2015. Vol. 50 (Suppl 2). P. 90–97. <https://doi.org/10.1111/rda.12552>.

2. Yeste M. Sperm cryopreservation update: Cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. *Theriogenology*. 2016. Vol. 85 (1). P. 47–64. DOI:10.1016/j.theriogenology.2015.09.047.

3. Yeste M. Recent advances in boar sperm cryopreservation: State of the art and current perspectives. *Reproduction in Domestic Animals*. 2015. Vol. 50 (Suppl 2). P. 71–79. <https://doi.org/10.1111/rda.12569>.

4. Pinart E., Yeste M., Bonet S. Acrosin is a good predictor of boar

sperm freezability. *Theriogenology*. 2015. Vol. 83 (9). P. 1525–1533. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.02.005>.

5. Watson P. F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their postthawing function. *Reproduction Fertility and Development*. 1995. Vol. 7 (4). P. 871–891. <https://doi.org/10.1071/RD9950871>.

4. Casas I., Sancho S., Briz M., Pinart E., Bussalleu E., Yeste M., Bonet S. Freezability prediction of boar ejaculates assessed by functional sperm parameters and sperm proteins. *Theriogenology*. 2009. Vol. 72 (7). P. 930–948. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.07.001>.

6. Yeste M., Estrada E., Casas I., Bonet S., Rodríguez-Gil J. E. Good and bad freezability boar ejaculates differ in the integrity of nucleoprotein structure after freeze-thawing but not in ROS levels. *Theriogenology*. 2013. Vol. 79 (6). P. 929–939. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.01.008>.

7. Casas I., Sancho S., Briz M., Pinart E., Bussalleu E., Yeste M., Bonet S. Fertility after post-cervical artificial insemination with cryopreserved sperm from boar ejaculates of good and poor freezability. *Animal Reproduction Science*. 2010. Vol. 118 (1). P. 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2009.06.003>.

8. Casas I., Sancho S., Ballester J., Briz M., Pinart E., Bussalleu E., Yeste M., Fàbrega A., Rodríguez-Gil J. E., Bonet, S. The HSP90AA1 sperm content and the prediction of the boar ejaculate freezability. *Theriogenology*. 2010. Vol. 74 (6) 940–950. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.04.021>.

9. Vilagran I., Castillo J., Bonet S., Sancho S., Yeste M., Estanyol J. M., Oliva R. Acrosin-binding protein (ACRBP) and triosephosphate isomerase (TPI) are good markers to predict boar sperm freezing capacity. *Theriogenology*. 2013. Vol. 80 (5). P. 443–450. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.05.006>.

10. Vilagran I., Yeste M., Sancho S., Casas I., Rivera del Álamo M. M., Bonet S. Relationship of sperm small heat-shock protein 10 and voltage-dependent anion channel 2 with semen freezability in boars. *Theriogenology*. 2014. Vol. 82 (3) 418–426. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.04.023>.

11. Estrada E., Rodríguez-Gil J. E., Rivera Del Álamo M. M., Peña A., Yeste M. Effects of reduced glutathione on acrosin activity in frozenthawed boar spermatozoa. *Reproduction Fertility and Development*. 2015. Vol. 29 (2). P. 283–293. <https://doi.org/10.1071/RD15118>.

13. Vilagran I., Yeste M., Sancho S., Castillo J., Oliva R., Bonet S. Comparative analysis of boar seminal plasma proteome from different freezability ejaculates and identification of Fibronectin 1 as sperm freezability marker. *Andrology*. 2015. Vol. 3 (2). P. 345–356. <https://doi.org/10.1111/andr.12009>.
14. Wysocki P., Orzolek A., Strzeżek J., Koziorowska-Gilun M., Zasiadczyk Ł., Kordan W. The activity of N-acetyl- β -hexosaminidase in boar seminal plasma is linked with semen quality and its suitability for cryopreservation. *Theriogenology*. 2015. Vol. 83 (7). P. 1194–1202. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.12.025>.
15. Samardzija M., Getz I., Lojkic M., Valpotic H., Djuricic D. Optimization of Sperm for *In vitro* Production of Bovine Embryos. *SOJ Vet Sci*. 2015. Vol. 1 (2). P. 1–7. DOI: <http://dx.doi.org/10.15226/2381-2907/1/2/00107>.
16. Wolf C. A., Brass K. E., Rubin M. I. B., Pozzobon S. E., Mozzaquatro F. D., De La Corte F. D. The effect of sperm selection by Percoll or swim-up on the sex ratio of in vitro produced bovine embryos. *Anim. Reprod.*, 2008. Vol. 5, N. 3/4. P. 110–115.
17. Parrish J. J., Krogenaes A., Susko-Parrish J. L. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. *Theriogenology*. 1995. Vol. 44 (6). P. 859–869. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(95\)00271-9](https://doi.org/10.1016/0093-691X(95)00271-9).
18. Liu B., Cui Y., Yu S. Effect of Swim-Up and Percoll Treatment on Sperm Quality and In vitro Embryo Development in Yak. *Journal of Integrative Agriculture*. 2013. Vol. 12, iss. 12. P. 2235–2242. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(13\)60378-0](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(13)60378-0).
19. Mehmood A., Anwar M., Saqlan Naqvi S. M. Motility, acrosome integrity, membrane integrity and oocyte cleavage rate of sperm separated by swim-up or Percoll gradient method from frozen–thawed buffalo semen. *Animal Reproduction Science*. 2009. Vol. 111, iss. 2–4. P. 141–148. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.02.011>.
20. Morales E. C. L., Aragon M. A., Pescador S. N., Salazar G. F. SWIM-Up Procedure in Boar Semen Improves Motility and Viability but Recovered Sperm Could Carry Active Caspases and Chromatin Damage. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 2012. Vol. 11, iss. 4. P. 431–437. DOI: 10.3923/javaa.2012.431.437.

Розділ 6.

ОПТИМІЗАЦІЯ ПІДГОТОВКИ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ СПЕРМАТОЗОЇДІВ КНУРІВ ДО ШТУЧНОГО ЗАПЛІДНЕННЯ

Одержання ембріонів свиней *in vitro* – важливий метод для збереження різноманіття даного виду тварин. Крім того, свині є важливою експериментальною моделлю через їх біологічну схожість з людиною та можуть бути потенційними донорами органів для ксенотрансплантацій. Тому надзвичайно важливо оптимізувати процеси запліднення ооцитів свиней IVF (*in vitro* fertilization) для отримання максимально високого рівня формування та розвитку ембріонів. Для одержання ембріонів свиней за використання кріоконсервованих сперматозоїдів обмеженої кількості, застосування методу *in vitro* є малоефективним. Методика ICSI (intracytoplasmic sperm injection) наразі є унікальною, завдяки якій можна отримати ембріон, використовуючи один ооцит та один сперматозоїд.

Одним з ключових етапів ICSI є знерухомлення (імобілізація) сперматозоїдів, який проводять з використанням розчину ПВП (полівінілпіролідон). Незважаючи на його широке використання, цей розчин має негативний вплив на розвиток ооцитів та непридатний для імобілізації сперматозоїдів кнурів. Розчин ПВА (полівінілалкоголь) має схожі характеристики в'язкості, але використовується у невеликих концентраціях як безпечний агент для культивування ембріонів і є альтернативою ПВП для використання під час ICSI. Основні аспекти процедури ICSI включають імобілізацію сперматозоїда шляхом пошкодження джгутика, аспірація його в ін'єкційну піпетку, аспірація цитоплазми та безпосередньо ін'єкція сперматозоїда в ооцит. Головною перевагою ICSI є використання сперми зі зниженою концентрацією або рухливістю сперматозоїдів, сексованої чи кріоконсервованої або у разі використання із придатків сім'яників (епідидиміс). У свиней IVF призводить до поліспермного запліднення понад 50% яйцеклітин, що істотно знижує ефективність отримання ембріонів *in vitro*. Тому є гостра необхідність щодо застосування даного методу в тому числі і для усунення поліспермії. Ін'єкція сперматозоїдів в цитоплазму яйцеклітин ICSI є методом допоміжного розмноження, який використовується для отримання ембріонів *in vitro* у тварин і лікування безпліддя у людей.

Застосовується для реалізації програм збереження біорізноманіття, розуміння механізмів і процесів запліднення та вивчення раннього ембріонального розвитку.

6.1. Стан збереження генофонду порід свиней та шляхи його вирішення

Згідно з даними Продовольчої та сільськогосподарської організації ООН (FAO) щодо видового різноманіття одомашнених тварин з початку минулого століття в Європі серед локальних порід сільськогосподарських тварин зникли майже 11%, а під загрозою зникнення знаходиться понад 40%.

Якщо розглядати ситуацію щодо зникнення порід свиней, то наразі вона не є оптимістичною. Станом на 2020 рік серед регіональних порід свиней в Європі та Кавказі зниклими вважаються 21% порід, в небезпеці 32%, і лише 7% з них – не в зоні ризику (рис. 6.1). В Україні на межі зникнення перебувають одночасно кілька порід свиней: українська степова ряба, мангалиця, українська степова біла та локальна дніпропетровська популяція української м'ясної. Такі дані в цілому та в Україні зокрема свідчать про недостатні зусилля, які залучені до збереження генофонду або ж неефективність методів, які застосовуються наразі.

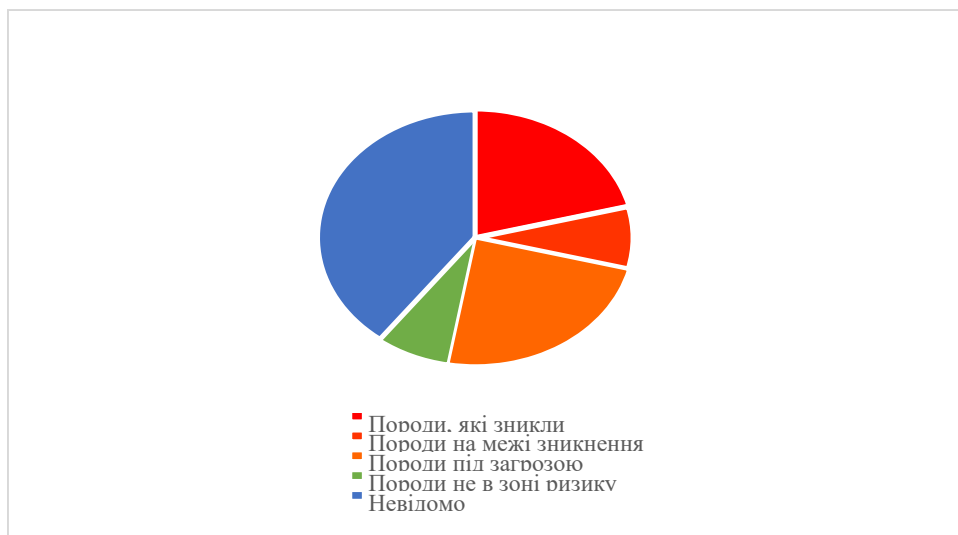


Рис. 6.1. Стан порід свиней в Європі та Кавказі у 2020 році.

До того ж пандемія коронавірусу Covid-19, яка розпочалася в 2019 році показала, що країни не готові до боротьби з новими вірусами, які

можуть вражати як тварин, так і людей. Підтвердженням цьому є зникнення в 2018 році двох вітчизняних порід свиней: миргородської та великої чорної, внаслідок спалаху африканської чуми свиней. Тому зберігання автохтонних порід, у вигляді невеликих популяцій є вкрай ризикованим способом збереження різноманіття. Такі підходи є ризикованими і через те, що в невеликих популяціях явище інбридингу може спричиняти дрейф генів, і, як наслідок, може призводити до накопичення небажаних мутацій.

Рішенням цієї проблеми може стати кріоконсервація генетичного матеріалу у вигляді сперми, ооцитів та ембріонів сільськогосподарських тварин та зберігання його у кріосховищах упродовж необмеженого часу. Зважаючи на те, що після кріоконсервації виживає невеликий відсоток ооцитів і сперматозоїдів ми маємо обмежену кількість вихідного матеріалу і тому існує нагальна потреба максимально оптимізувати процес отримання ембріонів для раціонального використання цінного генетичного матеріалу. Побічною проблемою є те, що активність кріоконсервованих сперматозоїдів кнурів не завжди забезпечують високу частоту запліднення та формування якісних ембріонів на доімплантаційних стадіях у разі застосуванні методу запліднення *in vitro*. Однією з найголовніших проблем даного методу також є і неможливість контролювати явище поліспермії під час запліднення ооцита та низьку здатність до розвитку отриманих зигот. Це призводить до того, що у разі недосконалого методу дозрівання ооцит-кумулюсних комплексів запліднення буде низьким і встановити причину даного явища буде вкрай важко.

Однак, у свинарстві є загроза зникнення порід через періодичні спалахи інфекційних захворювань. Науковці постійно приділяють увагу питанням збереження генофонду цього виду тварин, але підходи до кріоконсервації гамет та ембріонів все ще не забезпечують стабільних та високих результатів. Деякі біотехнологічні маніпуляції мали лише інформативний характер хоча для практичних підходів до збереження генофонду вкрай необхідні.

Дослідження із запліднення *in vitro* на розморожених незрілих ооцитах свиней, які перебували на стадії зародкового пухирця, показали низький рівень формування бластоцист – 5,2%. Встановлено, що вітрифіковані ооцити, заплідненні *in vitro* мали вищий рівень формування бластоцист, ніж ооцити тієї ж групи запліднені методом ICSI. Автори це явище пояснюють недостатністю фізіологічної складової в процесі

ICSI. Сперматозоїди можуть пропускати необхідні етапи природнього запліднення, такі як впізнавання ооцита і сперматозоїда та акросомальна реакція.

Результати щодо застосування ICSI у свиней наразі мають суперечливі дані. Після запліднення методом IVF отримано роздроблених ембріонів на другу добу розвитку на рівні 53,2% та 88,2%, відповідно, а після запліднення методом ICSI результативність була нижчою в обох випадках, відповідно 48,7% та 85,1%. Різниця між методами ICSI та IVF спостерігалася під час культивування ембріонів від третьої до п'ятої доби розвитку, що є додатковим методом селекції для визначення найбільш життєздатних ембріонів. Відсоток сформованих бластоцист після запліднення *in vitro* за допомогою ICSI був майже в два рази нижчим (10,5% та 20,2%, відповідно) порівняно з результатами сформованих бластоцист після IVF (19,4 та 35,2%, відповідно). В дослідженнях Wu J. et al. (2001), за допомогою ICSI було отримано більше ембріонів (51,0%), ніж за допомогою IVF (45,0%). Кількість отриманих бластоцист була вищою під час запліднення методом ICSI (21,0%), ніж під час IVF (16,0%). За результатами досліджень Mandryk I. (2013) встановлено, що запліднення методом ICSI не є оптимізованою методикою, а результативність у разі її використання може коливатися від може збільшуватись (або зменшуватись) на 15,8% в разі застосування одного і того ж методу запліднення, а саме ICSI. Але існують випадки, коли запліднення методом ICSI є необхідним, – через обмежену кількість гамет. Зниження результатів під час такого методу запліднення пов'язують з рядом факторів, серед яких використання сполуки полівінілпіролідону для знерухомлення сперматозоїдів.

6.2. Використання методу ICSI для одержання ембріонів *in vitro*

Метод ICSI – це запліднення ооцитів *in vitro*, під час якого відбувається ін'єкція одного сперматозоїда в зрілий ооцит на стадії метафази II мейозу. ICSI включає іммобілізацію сперматозоїда шляхом пошкодження хвоста, аспірацію цитоплазми ооцита ін'єкційною піпеткою та випускання одного сперматозоїда в цитоплазму. Порушення цитоплазми ооцита та сперматозоїда є важливим етапом для успішного запліднення, оскільки пошкодження ооцита це необхідний крок для злиття двох гамет, а пошкодження хвоста сперматозоїда важливе для

вивільнення розчинних факторів сперми, які мають індукувати активацію ооцитів. Наразі він добре відпрацьований на ооцитах жінок, але для ооцитів інших видів ссавців залишається недостатньо оптимізованим для досягнення відповідного рівня запліднення та формування ембріонів. В нашій країні дуже мало даних щодо застосування методу ICSI для *in vitro* запліднення тварин, в тому числі свиней, хоча цей метод підвищить ефективність запліднення та формування повноцінних ембріонів.

Проведення ICSI забезпечує вирішення складного питання поліспермії під час запліднення *in vitro*. Цей метод забезпечує використання мінімальної кількості вихідного матеріалу для отримання максимальної кількості ембріонів та надає можливість застосування в тому числі і сперматозоїдів з недостатньою рухливістю. Оскільки цей метод для одержання ембріонів свиней *in vitro* є багатоступеневим, необхідно отримати дозрілі *in vitro* ооцити, освоїти процедуру відбору сперматозоїда в ін'єкційну піпетку, проведення процедури ICSI та культивування ембріонів. Нами відпрацьовано всі етапи, хоча етап культивування ембріонів після ICSI потребує удосконалення. Так ооцити свиней, які нами культивовані *in vitro* до стадії метафази II мейозу і мали ідентифіковане перше полярне тіло, були успішно ін'єктовані з внесенням одного сперматозоїда в цитоплазму ооцита (рис. 6.2).

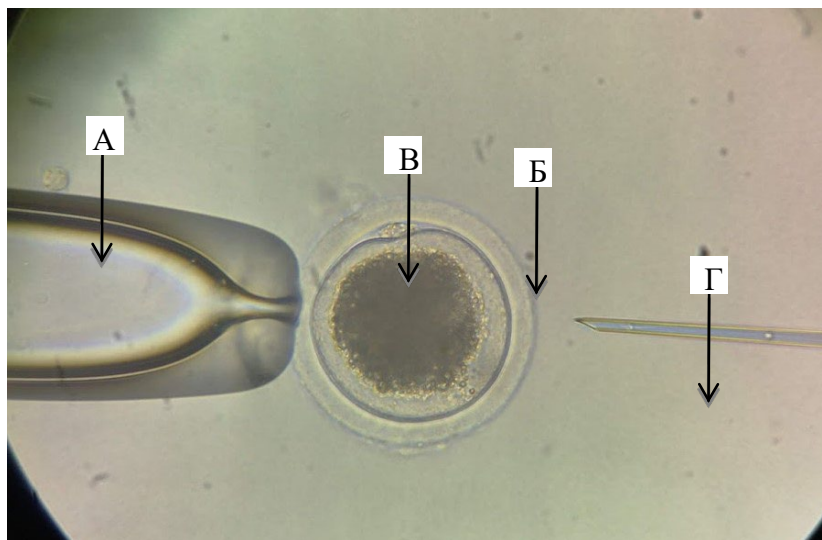


Рис. 6.2. Запліднення *in vitro* ооциту свині методом ICSI.

А – утримуюча піпетка; Б – ооцит свині; В – полярне тільце; Г – сперматозоїд.
Об.10х, ок.40х.

Незважаючи на переваги методу ICSI та перспективність його застосування, для підвищення ефективності запліднення існує ряд проблем з використанням його для гамет тварин, порівняно з гаметами людини. Насамперед, під час запліднення ооцитів великої рогатої худоби та свиней, спостерігається значно менша кількість отриманих ембріонів. На думку науковців на це можуть впливати декілька факторів, серед яких використанням ін'єкційної піпетки меншого діаметру для сперматозоїдів людини (так вони менші за гамети тварин, і, відповідно відбувається менша травматизація ооцита), відсутністю процедури центрифугування ооцитів перед ICSI, яке потрібно для деяких видів тварин, та коротшим джгутиком сперматозоїда, що забезпечує потрапляння меншої кількості чужорідної рідини в цитоплазму.

Іншим модифікованим методом ICSI є метод пошкодження головки. Під час природного процесу запліднення цитоплазма з'єднується з постакросомальною ділянкою плазматичної мембрани головки сперми. Тому для кращої результативності запліднення запропоновано пошкоджувати не джгутик, а головку сперматозоїда. Більшість існуючих методик запліднення ICSI поєднують у собі різноманітні техніки пошкодження хвоста сперматозоїда, але в 2003 році було проведено дослідження, згідно з яким відбувалося пошкодження головки сперматозоїда перед поміщенням його в ооцит. Крім того, в дослідженні Yong H. Y. et al. (2003) було використано ПВА, замість ПВП. Припускають, що уникнення шкідливого ефекту від ПВП покращить розвиток запліднених ооцитів. До того ж, у разі використання ПВА мінеральна олія в процесі проведення процедури менше налипає на піпетку, так само як і клітинні рештки. Це значно покращує процес засмоктування цитоплазми та випускання сперматозоїда, і є більш безпечно, що в свою чергу знижує кількість дегенерованих ооцитів. У разі застосування такого методу утворення бластоцист підвищувалось на 6%, порівняно з контрольною групою, де ооцити були запліднені традиційним методом ICSI.

Тривалий час існувала думка, що пошкодження головки сперматозоїда призводить до пошкодження генетичного матеріалу. Це в свою чергу призводить до відсутності запліднення чи формування аномальних ембріонів. Тому серед вимог до проведення ICSI основним було перебивання хвостика. Але Yong H. Y. et al. (2003) довели, що дисульфідні мости головки сперматозоїда, які формуються проходячи через епідидиміс, роблять ядро сперматозоїда стійким до хімічних та фізичних розривів.

Deng T. et al. (2020) оприлюднили результати досліджень щодо обробки ооцитів під час процедури ICSI урходезоксихолевою кислотою та довели, що такий підхід збільшує кількість отриманих зигот. Цей феномен вони пояснюють здатністю даної речовини зменшувати оксидативний стрес, який спричиняється під час цієї процедури в ендоплазматичному ретикулумі та попереджувати процеси апоптозу.

Незважаючи на всі вищеназвані проблеми згідно з опублікованими даними Американської асоціації трансплантації ембріонів, за 2020 рік у Сполучених штатах Америки із усіх трансплантованих ембріонів різних видів тварин до 50% були заплідненими методом ICSI (AETA, 2021). З цього можемо зробити висновок, що хоча проблема запліднення методом ICSI залишається невирішеною, цей метод є достатньо перспективним біотехнологічним методом для застосування його у тваринництві. Зважаючи на швидке зникнення порід свиней, даний метод буде доцільним для опанування та застосування його для відтворення генофонду цінних порід свиней.

6.3. Вплив середовищ з ПВП та ПВА на деконсервовані еякульовані сперматозоїди кнура та їх підготовки до запліднення

Проведення ICSI потребує використання розчину ПВП для сповільнення швидкості руху сперматозоїдів. Ця молекула може бути шкідливою під час введення її в ооцит і негативно впливати на запліднення та деконденсацію ДНК сперматозоїдів. Нами відпрацьовано успішно процедуру відбору сперматозоїда кнура в ін'єкційну піпетку після сповільнення його руху розчину полівінілпіролідону (рис. 6.3).

Для проведення знерухомлення сперматозоїдів використовують 10% розчин ПВП. Застосування ПВП також попереджує налипання сперматозоїдів та клітинного дебрису на піпетку, що полегшує проведення процедури. Однією з можливостей покращити метод ICSI є модифікований метод ін'єкції сперматозоїда з використанням ПВА замість ПВП.

На відміну від шкоди ПВП для гамет сполука ПВА не спричинює негативні ефекти на ооцити, і Yong H.Y. et al (2003) показали, що доволі успішно дана сполука використовується в невеликих концентраціях в культуральних середовищах навіть для тривалого культивування ембріонів свиней.

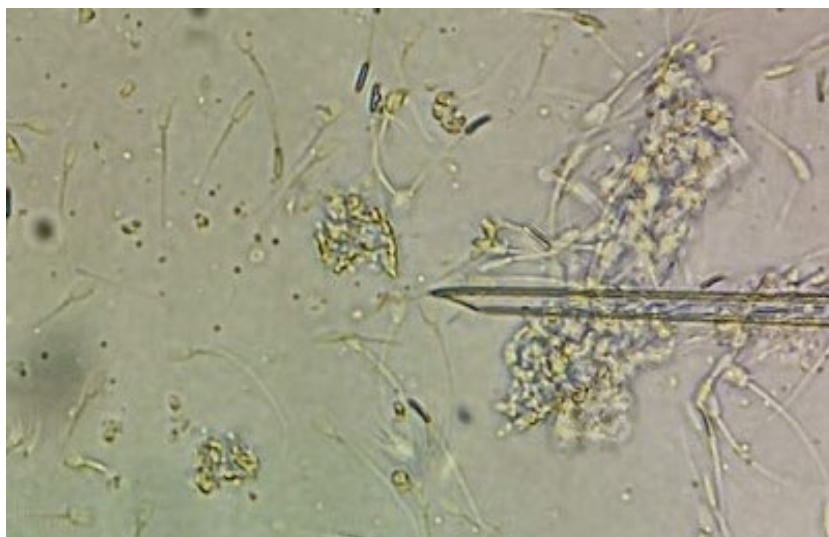


Рис. 6.3. Сперматозоїди кнурів в розчині полівінілпіролідону та ін'єкційна піпетка. Об.10х, ок.40х.

Використання ПВП для проведення процедури ICSI полягає в тому, що це найбільш густий та в'язкий розчин для даних цілей. Під час використання такого розчину сперматозоїди сповільнюються достатньо для того, щоб їх можна було оцінити, вибрати найбільш морфологічно правильний та знерухомити. Сперматозоїди кнурів відрізняються від сперматозоїдів інших видів розмірами, характерним прямолінійним рухом (рис. 6.4) та досить невисокою швидкістю. Для проведення процедури ICSI у свиней не потрібно значно сповільнювати рух тому, що зловити сперматозоїд не настільки проблематично. Тому знерухомлення сперматозоїдів кнурів в розчині ПВА є більш простим та легким, ніж в разі застосування його для інших видів тварин і є абсолютно прийнятним для застосування під час запліднення методом ICSI різних порід свиней.

Ще одним важливим аспектом під час підготовки деконсервованих еякульованих сперматозоїдів кнурів до штучного запліднення є здатність розчину попереджувати налипання дебрису та нерухомих сперматозоїдів всередині та зовні піпетки. Слід зазначити, що найважливішим моментом є відсутність залипання сперматозоїду всередині ін'єкційної піпетки, що утруднює саму ін'єкцію, а це призведе до дегенерації ооцита. ПВП запобігає виникненню таких випадків, розчин ПВА теж має володіти такими властивостями, щоб процедура була атравматичною для ооцитів.

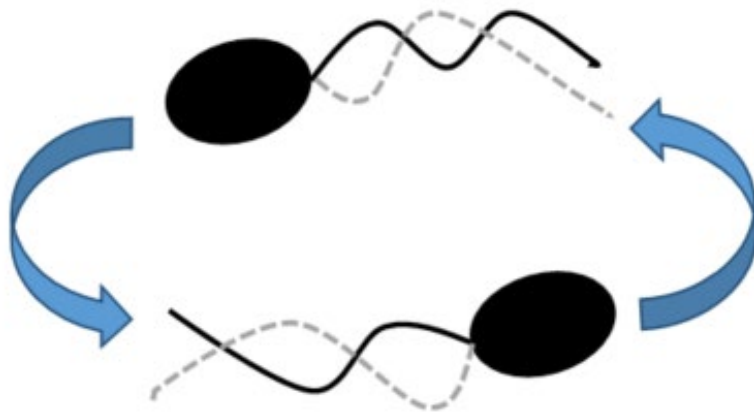


Рис. 6.4. Траєкторія руху сперматозоїдів кнурів

Середовище з додаванням ПВА може тримати стінку та порожнину ін'єкційної піпетки менш липкою упродовж довшого проміжку часу, ніж під час проведення іммобілізації сперматозоїдів без даного розчину. В результаті цього можливо досягти ефекту такого, що спостерігається в разі використання ПВП (меншого налипання мінеральної олії та шматків клітин до піпетки), але в той же час не шкодити гаметам. Тому метою роботи було вивчити вплив середовищ з ПВП та ПВА на деконсервовані еякульовані сперматозоїди кнура та їх підготовки до штучного запліднення.

В дослідженнях нами використано еякульовані кріоконсервовані сперматозоїди кнура миргородської породи Дніпро 641. Генетичний матеріал зберігався в Банку генетичних ресурсів тварин ІРГТ ім. М.В. Зубця НААН упродовж восьми років. Суспензію сперматозоїдів розморожували на водяній бані за температури $+37^{\circ}\text{C}$ упродовж 5 хв до повного розморожування. Відокремлення сперматозоїдів від кріоконсерванта та розріджувача проводили за допомогою методу «swim-up» у середовищі Sp.-TALP. Для цього розташовували пробірку з 2 мл теплого середовища під кутом 45° . На дно пробірки підшаровували 0,2 мл розмороженої суспензії сперматозоїдів та на 15 хв залишали в термостаті за температури 37°C . Після інкубації отриману суспензію сперматозоїдів розріджували середовищем Sp.-TALP до концентрації $1-5 \times 10^7$ сперматозоїдів в 1 мл.

Для тестування 10,0% розчинів ПВП (Origio, Denmark) та ПВА (Sigma, P8136, USA) підготовлювали чашку Петрі ($d=35$ мм) з двома доріжками цих середовищ та покривали мінеральною олією LiteOil

(GlobalLife, USA) (рис. 6.5). Чашку Петрі з розчинами попередньо розміщували в термостаті за температури $+37^{\circ}\text{C}$ впродовж 60 хв. Для оцінки рухливості сперматозоїдів вносили 10 мкл відмитої суспензії сперматозоїдів в 10,0% розчини ПВП та ПВА. Після чого оцінювали рухливість в 10 полях зору збільшення в 400 разів.



Рис. 6.5. Чашка Петрі з доріжками 10,0% розчинів ПВП та ПВА

Для дослідження швидкості руху сперматозоїдів використовували ін'єкційну піпетку діаметром 5,0 мкм (Cook, США). Експеримент проводили в трьох повторях.

Для успішного проведення процедури ICSI рухомий сперматозоїд механічно знерухомлюється, за допомогою маніпуляцій з хвостом сперматозоїда різними способами: ударами ін'єкційної піпетки, енергійним поглинанням, кількома п'єзоімпульсами або повторюваною аспірацією в ін'єкційну піпетку та з неї. Для цього в більшості ембріологічних лабораторій використовується хімічний агент, ПВП, а саме для уповільнення руху сперматозоїда та для полегшення пошкодження хвостика, незважаючи на переконливі дані щодо його шкідливого впливу на виживання та розвиток ооцитів після процедури ICSI.

Перший етап досліджень передбачав оцінку можливості застосування 10,0% розчинів ПВП та ПВА в разі проведення запліднення методом ICSI, ми досліджували рухливість сперматозоїдів через 10 та 20 хв після розміщення їх в досліджувані розчини. Це той проміжок часу,

який необхідний для проведення запліднення 10 ооцитів в одній чашці для зниження часової паузи перебування гамет поза інкубатором. Для запліднення більшої кількості ооцитів використовуються додаткові чашки та відповідно суспензія сперматозоїдів розміщується заново в нові чашки з чистими розчинами ПВП чи ПВА. Також було протестовано зручність проведення процедури для оператора, а саме відсутність залипання в піпетці клітин та дебрису, що є важливим елементом під час процедури ICSI.

Встановлено, що після розморожування рухливість сперматозоїдів кнура становила 10,7%. Після перебування сперматозоїдів в 10,0% розчині ПВП впродовж 10 хв рухливість знизилась на 68,2% і становила 3,4%, а через наступні 10 хв інкубації знизилася до 1,4%, що в 10 раз нижче, порівняно із початковою рухливістю. В 10,0%-му р-ні ПВА рухливість через 10 хв інкубації знизилась на 37,4% і становила 6,7%, а ще через 10 хв знизилась до 5,7% що в 1,8 разів нижче, порівняно із початковою рухливістю (табл. 6.1).

6.1. Вплив 10,0% розчинів ПВП та ПВА на рухливість деконсервованих сперматозоїдів кнура

Показники	Рухливість сперматозоїдів		
	відразу після впорскування (%)	через 10 хв (%)	через 20 хв (%)
10,0% ПВП	10,7 ± 1,71	3,4 ± 0,86*	1,4 ± 1,3**
10,0% ПВА	10,7 ± 0,86	6,7 ± 1,71*	5,7 ± 0,65**

Примітка: * – $P < 0,05$, ** – $P < 0,01$ порівняно із початковою рухливістю.

В разі застосування 10,0% розчину ПВП для кріоконсервованих сперматозоїдів кнурів ми спостерігали швидку втрату рухливості сперматозоїдів, на 68,2% від початкової рухливості. Такий результат може бути через те, що 10,0% розчин ПВП є достатньо в'язкий, а сперматозоїди кнурів через особливості свого руху, особливо після кріоконсервації, можуть недостатньо добре рухатися в настільки в'язкому середовищі. Так як сперматозоїди кнурів мають низьку кріорезистентність, така втрата рухливості призведе до суттєвого зниження результатів запліднення *in vitro*, тому даний розчин не підходить для використання у репродукції свиней.

Альтернативою є застосування розчину ПВА для підготовки сперматозоїдів кнурів до штучного запліднення. Розчин ПВА

забезпечив повільне знеруховлення сперматозоїдів кнура, порівняно із розчином ПВП на 3,3% через 10 хв культивування та на 4,3% після 20 хв культивування. Так в 10,0% розчині ПВП за 10 хв інкубації рухливість сперматозоїдів кнура знизилась до 3,4%, а в 10,0% розчині ПВА до 6,7%, що на 3,3% вище, порівняно із показником рухливості в 10,0% розчині ПВП.

Через 20 хв інкубації результати були ще більш різючими, під час культивування в 10,0% розчині ПВП рухливість знижувалася до 1,4%, в той самий проміжок часу рухливість сперматозоїдів в 10,0% розчині ПВА становила 5,7%.

В'язкість розчинів ПВА та ПВП однакової концентрації є схожою, 20,0% розчин ПВП за +25°C має в'язкість 0,084 Па/с, а 20,0% розчин ПВА має в'язкість 1,836 Па/с за тієї ж температури. В'язкість – це ключова характеристика, яка необхідна для сповільнення сперматозоїдів, тому під час досліджень з отримання ембріонів свиней методом ICSI ми протестували розчин ПВА, в такій же концентрації як і наявний комерційний розчин ПВП, тобто 10,0% розчин.

Другим етапом досліджень було оцінити вплив різних концентрацій розчину ПВА на рухливість сперматозоїдів кнура (табл. 6.2). В дослідженнях було використано чотири концентрації: 0,1; 1,0; 5,0 та 10,0% розчини ПВА.

6.2. Вплив різних концентрацій ПВА на рухливість деконсервованих сперматозоїдів кнура

Показники	Рухливість сперматозоїдів		
	після впорскування (%)	через 10 хв (%)	через 20 хв (%)
10,0%	10,7 ± 0,86	6,7 ± 0,86*	5,7 ± 0,86*
5,0%	10,7 ± 0,86	8,4 ± 0,65**	7,7 ± 0,86*
1,0%	10,7 ± 0,86	9,4 ± 1,71*	9,4 ± 0,65**
0,1%	10,7 ± 0,86	10,7 ± 0,86*	9,7 ± 0,65**

Примітка: * – P<0,05; ** – P<0,01.

Для приготування розчинів ПВА використовували ПВА (Sigma), середовище Multipurpose Handling Medium-Complete (Irvine), це Hepes та MOPS-вмісне середовище, з додаванням білку

(HSA – human serum albumin, Irvine) – 5%, та з гентаміцином.

Для 10% розчину ПВА – брали наважку 1 г ПВА та 9 мл приготованого середовища.

Для 5% розчину ПВА – брали наважку 0,5 г ПВА та 9,5 мл приготованого середовища.

Для 1% розчину ПВА – брали наважку 0,1 г ПВА та 9,9 мл приготованого середовища.

Для 0,1% розчину ПВА – брали наважку 0,01 г ПВА та 9,99 мл приготованого середовища.

Через 10 хв інкубації найнижчу рухливість сперматозоїдів спостерігали в 10,0% розчині ПВА і вона становила – 6,7%, що на 1,7 та 2,7% нижче, порівняно із 5,0% та 1,0% розчинами ПВА, відповідно. Слід відмітити, що рухливість сперматозоїдів в 0,1% розчині ПВА через 10 хв інкубації не змінилась і залишилась на рівні 10,7%. Високі показники життєздатності сперматозоїдів кнура були зафіксовані у 0,1% розчині ПВА. Так, через 20 хвилин інкубації в цьому розчині рухливість залишалася достатньо високою і становила 9,7%, що на 9,4% нижче, порівняно із початковою рухливістю. Найнижчі показники життєздатності сперматозоїдів кнура спостерігали в 10,0% розчині ПВА, і цей показник становив 5,7%, що на 2,0; 3,7 та 4,0%, менше, порівняно із 5,0, 1,0 та 0,1% розчинами ПВА, відповідно.

Аналізуючи отримані дані після інкубації суспензії деконсервованих еякульованих сперматозоїдів кнурів у розчині ПВА з різними концентраціями ми встановили, що розчин ПВА в концентрації 10,0% є найменш вдалим, порівняно з іншими концентраціями. Так, під час підготовки деконсервованих еякульованих сперматозоїдів кнурів до штучного запліднення в 10,0% розчині ПВА швидкість руху через 20 хв знизилася до 5,7%, і проводити ін'єкцію з точки зору всмоктування та випорскування сперматозоїда було б достатньо зручно. Але зниження рухливості є достатньо високим, порівняно з іншими концентраціями, тому що, часто після розморожування сперматозоїдів кнурів кількість рухливих сперматозоїдів і так є невисокою. Для проведення процедури запліднення методом ICSI необхідно знерухомити сперматозоїд, ми маємо вибирати саме рухливий для впевненості того, що він є живим і знерухомлювати механічно ін'єкторною голкою.

Під час використання 0,1 та 1,0% розчинів ПВА через 20 хв рухливість сперматозоїдів знизилася на 1,0 та 1,3%, відповідно, порівняно із початковою рухливістю. Але швидкість руху в ін'єкційній піпетці, була

зашвидкою, так як щільність розчину майже не змінилася і була така ж як і в культурального середовища. Занадто швидкий рух може пошкодити ооцити під час аспірування цитоплазми, що є необхідним етапом в разі проведення ICSI. Наслідком аспірування великої кількості цитоплазми може бути дегенерація ооцита. Також через велику швидкість впускання/випускання рідини можна ін'єктувати велику кількість розчину всередину ооцита, що негативно вплине на розвиток ембріона.

Найбільш оптимальним розчином є 5,0% розчин ПВА. Рухливість сперматозоїдів в даному розчині становить 7,7%, за 20 хв інкубації. Швидкість руху знизилася, що спростило процедуру, до того ж процес запліднення в даному випадку був більш безпечним для ооцита та для майбутнього ембріона.

ВИСНОВКИ

1. З огляду на несприятливі соціально-економічні зміни, викликані пандемією та іншими інфекційними хворобами, надійними підходами до ефективного вирішення завдань збереження та відтворення генофонду тварин є впровадженням в практику сучасних біотехнологічних методів.

2. Під час розробки програм збереження генофонду необхідно врахувати закономірності генетичних процесів в обмежених популяціях, орієнтуватися на широке використання таких біотехнологічних методів, як заморожування епідидимальних сперматозоїдів плідників; кріоконсервація ооцитів і отримання ембріонів *in vitro* різними методами в тому числі і методом ICSI.

3. Удосконалення біотехнологічних методів для кожного виду сільськогосподарських тварин збільшить кількість запліднених клітин та покращить якість сформованих ембріонів на доімплантаційних стадіях розвитку, що є ключовим для подальшого використання генетичного матеріалу в програмах збереження генофонду сільськогосподарських тварин.

4. Встановлено, що в разі застосування 10,0% розчину ПВП еякульовані деконсервовані сперматозоїди кнура втрачають рухливість на 86,9% від початкової рухливості, що унеможлиблює процес вибору придатного сперматозоїда для запліднення методом ICSI.

5. Показано, що 10,0% розчин ПВА можна застосовувати для проведення іммобілізації сперматозоїдів кнурів, так як він знижує рухливість на 46,7% від початкової рухливості сперматозоїдів.

6. Доведено, що рухливість в разі інкубації деконсервованих еякульованих сперматозоїдів кнур у 5,0% розчині ПВА знижується лише на 28,0% від початкової, що є оптимальним під час використання кріоконсервованих сперматозоїдів кнур, матеріал яких є в обмеженій кількості та зручним для оператора і безпечним для ооцитів.

ВИКОРИСТАНІ ЛІТЕРАТУРНІ ДЖЕРЕЛА

1. Зюзюн А. Б., Щербак О. В., Ковтун С. І., Свергунов А. О., Свергунова Г. О. Аналіз ефективності розвитку поза організмом ембріонів свиней за допомогою використання наноматеріалу. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. Київ, 2019. Т. 25. С. 231–236. DOI: <https://doi.org/10.7124/FEEO.v25.1168>.
2. Ковтун С. І., Зюзюн А. Б., Щербак О. В., Троцький П. А. Використання нанобіотехнологічних методів для оптимізації технології культивування ооцитів корів поза організмом. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. Київ, 2018. Т. 22. С. 257–261. DOI: <https://doi.org/10.7124/FEEO.v22.958>.
3. Програма збереження генофонду локальних і зникаючих порід сільськогосподарських тварин в Україні на 2017–2025 роки / М-во аграрної політики та прод-ва України, Нац. акад. аграр. наук України, Ін-т розведення і генетики тварин імені М.В. Зубця НААН, Сумський нац. аграр. ун-т ; М. В. Гладій та ін. Суми, 2018. 85 с. URL: http://iabg.org.ua/images/stories/prog_zber.pdf. DOI: 636.082:502(477).
4. Avalos-Duron G., Cacedo-Del A. E., Rivero-Murillo B. J., Zambrano-Guerrero J. A., Carballo-Mondragyn E., Checa-Vizcaino M. B. Physiological ICSI (PICS) vs. Conventional ICSI in Couples with Male Factor: A Systematic Review. *JBRA Assisted Reproduction*. 2018. Vol. 22 (2). P. 139–147. doi: 10.5935/1518-0557.20180027.
5. Bowley S. C., Comizzoli P., Lindell K. A., Matsas D. Genetic Cryopreservation of Rare Breeds of Domesticated North American Livestock: Smithsonian & SVF Biodiversity Preservation Project. *Diversity*. 2019. Vol. 11. P. 198. DOI: <https://doi.org/10.3390/d11100198>.
6. Casillas F., Betancourt M., Cuello C., Ducolomb Y., López A., Juárez-Rojas L., Retana-Márquez S. An efficiency comparison of different in vitro fertilization methods: IVF, ICSI, and PICS for embryo development to the blastocyst stage from vitrified porcine immature oocytes. *Porcine Health Management*. 2018. Vol. 4 (16). P. 12. DOI: 10.1186/s40813-018-0093-6.
7. Casillas F., Ducolomb Y., Lemus A. E., Cuello C., Betancourt M.

Porcine embryo production following in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection from vitrified immature oocytes matured with a granulosa cell coculture system. *Cryobiology*. 2015. Vol. 71. P. 299–305. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2015.08.003>.

8. Deng T., Xie J., Hengtao G., Liu Q., Song X., Hu L., Meng L., Zhang C. Tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) enhanced intracytoplasmic sperm injection (ICSI) embryo developmental competence by ameliorating endoplasmic reticulum (ER) stress and inhibiting apoptosis. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2020. Vol 37. P. 119–126. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10815-019-01627-2>.

9. Ding D., Wang Q., Li X., Chen B., Zou W., Ji D., Hao Y., Xue R., Zou H., Wei Z., Zhou P., Cao Y., Zhang Z. Effects of different polyvinylpyrrolidone concentrations on intracytoplasmic sperm injection. *Zygote*. 2020. Vol. 28 (2). P. 148–153. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0967199419000820>.

10. Domestic Animal Diversity Information System (DAD-IS) / Food and Agriculture Organization of United States. URL: <http://www.fao.org/dad-is/trend-in-risk-status/en/>.

11. Macedo M. P., Glanzner W. G., Rissi V. R., Gutierrez K., Currin L., Baldassarre H., Bordignon V. A fast and reliable protocol for activation of porcine oocytes. *Theriogenology*. 2018. Vol. 123. P. 22–29. DOI: [10.1016/j.theriogenology.2018.09.021](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.09.021).

12. Nabi A., Entezari F., Miresmaeili S. M., Vahidi S., Lorian K., Anbari F., Motamedzadeh L. Evaluation of sperm parameters and dna integrity following different incubation times in PVP medium. *Urology journal*. 2022. Vol. 19, No. 03. P. 232–237. DOI: <https://doi.org/10.22037/uj.v18i.6936>.

13. Palermo G. D., Nagy Z. P. Manual of intracytoplasmic sperm injection in human assisted reproduction with other advanced micromanipulation techniques to edit the genetic and cytoplasmic content of the oocyte. Cambridge, Cambridge university press, 2021. 171 p.

14. Petelak A., Krylov A. Surface sperm cell ubiquitination directly impaired blastocyst formation rate after intracytoplasmic sperm injection in pig. *Theriogenology*. 2019. Vol. 135 (1). P. 115–120.

15. Pinto S., Carrageta D. F., Alves M. G., Rocha A., Agarwa A., Barros A., Oliveira P. A. Sperm selection strategies and their impact on assisted reproductive technology outcomes. *Andrologia*. 2020. Vol. 53 (2). P. 18.

16. Rajska I. Intra-cytoplasmic sperm injection (ICSI) as an alternative to standard in vitro fertilization in pigs. *Scientific annals of polish society of*

animal production. 2015. Vol. 11 (3). P. 55–66.

17. Ribas-Maynou J., Yeste M., Salas-Huetos A. The relationship between sperm oxidative stress alterations and IVF/ICSI outcomes: a systematic review from nonhuman mammals. *Biology*. 2020. Vol. 9 (7). P. 178.

18. Roychoudhury S. I., Maldonado-Rosas A., Agarwal A. S., Esteves C. R., Sharma A., Gupta A. M. Parthenogenetic activation and developmental potential of mouse oocytes after intracytoplasmic injection (ICSI) of PVP (polyvinylpyrrolidone) and HA (Hyaluronic acid). *Fertility and sterility*. 2016. Vol. 106 (3). P. 544.

19. 2021 Statistical information committee report : https://www.aeta.org/docs/2020_Stats.pdf (2020 data).

20. Yamochi T., Hashimoto S., Morimoto Y. Mural granulosa cells support to maintain the viability of growing porcine oocytes and its developmental competence after insemination. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2021. Vol. 38. P. 2591–2599.

21. Yong H. Y., Pyo B. S., Hong J. Y., Keun K. S., Lee B. C., Lee E. S., Hwang W. S. A modified method for ICSI in the pig: injection of head membrane-damaged sperm using a 3±4 mm diameter injection pipette. *Human reproduction*. 2003. Vol. 18 (11). P. 2390–2396.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

BSA	bovine serum albumin (альбумін сироватки крові великої рогатої худоби)
FAO	Продовольча та сільськогосподарська організація ООН
HSA	human serum albumin – сиворотковий альбумін людини
ICSI	intracytoplasmic sperm injection – інтрацитоплазматична ін'єкція сперматозоїда в ооцит
<i>in vitro</i>	характеристика певного біологічного процесу, змодельованого поза організмом
<i>in vivo</i>	характеристика певного біологічного процесу, який відбувається в організмі
IVC	<i>in vitro</i> culture – <i>in vitro</i> культивування
IVF	<i>in vitro</i> fertilization – запліднення <i>in vitro</i>
IVM	<i>in vitro</i> maturation – <i>in vitro</i> дозрівання
IVP	<i>in vitro</i> production – <i>in vitro</i> отримання ембріонів
МОЕТ	multiple ovulation and embryo transfer, індукція суперовуляції у тварин, штучне осіменіння тварин, вилучення ембріонів, їх оцінка і трансплантація реципієнтам
А	айрширська
АПВ	агропромислове виробництво
АФК	активна форма кисню
Г	голштинська
ГСЖК	гонадотропін сироватки жеребих кобил
ДНК	дезоксирибонуклеїнова кислота
ДП ДГ	державне підприємство дослідне господарство
ЖТ	жовте тіло
ІФ	індекс фрагментації
ЛГ	лютеїнізуючий гормон
ОКК	ооцит-кумулюсний комплекс
ПАТ	публічне акціонерне товариство
ПВА	полівінілалкоголь

ПВП	полівінілпіролідон
ПП	приватне підприємство
ПрАТ	приватне акціонерне товариство
СЖК	сироватка жеребих кобил (serum equine praegnantis)
СПП	сільськогосподарське приватне підприємство
СТОВ	сільськогосподарське товариство з обмеженою відповідальністю
ТЕ	трансплантація ембріонів
ТОВ	товариство з обмеженою відповідальністю
ТОВ	товариство з обмеженою відповідальністю
АТФ	агроторгівельна фірма
УЗД	ультразвукове дослідження
УЧер	українська червоно-ряба молочна
УЧМ	українська червона молочна
УЧР	українська чорно-ряба молочна
ФГ	фермерське господарство
ФСГ	фолікулостимулюючий гормон
ЦНС	центральна нервова система
ЧС	червона степова
ШО	штучне осіменіння

НАУКОВЕ ВИДАННЯ

**Світлана Іванівна Ковтун
Оксана Василівна Щербак
Петро Анатолійович Троцький
Володимир Франкович Стаховський
Оксана Юріївна Лизогуб
Олена Іванівна Метлицька
Світлана Олександрівна Сідашова**

ОРГАНІЗАЦІЯ ПРОВЕДЕННЯ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ У ТВАРИННИЦТВІ (методичні рекомендації)

Керівник видавничого проєкту
Віталій Зарицький

Підписано до друку 26.06.25 р.
Формат 60х84/16. Папір офсетний.
Гарнітура Times New Roman.
Ум. друк. арк. 7,3 Обл.-вид. аркушів – 4,25.
Наклад 100 прим.

Видавець і виготовлювач: ТОВ «Видавництво Ліра-К»
Свідоцтво № 3981, серія ДК.
03115, м. Київ, вул. С. Чобану, 24
тел.: (050) 462-95-48; (067) 820-84-77
Сайт: lira-k.com.ua, редакція: zv_lira@ukr.net