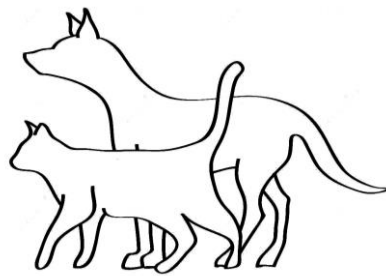


**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
ДНІПРОВСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ АГРАРНО-ЕКОНОМІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

**Склярів П.М.**

# **БІОТЕХНОЛОГІЯ ВІДТВОРЕННЯ СОБАК І КОТІВ**

**Навчальний посібник**



**Дніпро – 2022**





МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
ДНІПРОВСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ АГРАРНО-ЕКОНОМІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

**Склярів П.М.**

БІОТЕХНОЛОГІЯ  
ВІДТВОРЕННЯ  
СОБАК І КОТІВ

Навчальний посібник

Дніпро – 2022

УДК 636.7.082.2:636.8.082.2

**Р е ц е н з е н т и :**

*Білий Д.Д.* – доктор ветеринарних наук, професор кафедри хірургії і акушерства сільськогосподарських тварин (Дніпровський державний аграрно-економічний університет);

*Желавський М.М.* – доктор ветеринарних наук, професор кафедри ветеринарного акушерства, внутрішньої патології та хірургії (Подільський державний аграрно-технічний університет);

*Стефанік В.Ю.* – доктор ветеринарних наук, професор, завідувач кафедри акушерства, гінекології та біотехнології відтворення тварин імені Г.В. Звереві (Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького).

Склярів П.М. Біотехнологія відтворення собак і котів: навчальний посібник / П.М. Склярів. – Дніпро: РВВ ДДАЕУ, 2022. – 92 с.

*У виданні висвітлені питання можливостей біотехнології у відтворенні тварин. Представлені методи, що використовуються за розведення собак та котів і зокрема історія розвитку, технологічні етапи штучного осіменіння та трансплантації ембріонів.*

*Навчальний посібник призначений для здобувачів ступеню вищої освіти «Магістр» за спеціальністю 211 «Ветеринарна медицина» освітньо-професійної програми «Ветеринарна медицина» з дисципліни «Акушерство, гінекологія, андрологія та біотехніка відтворення собак і котів».*

Розглянуто та схвалено Вченою радою Дніпровського державного аграрно-економічного університету, протокол № 7 від 28 квітня 2022 р.

Розглянуто та схвалено науково-методичною радою Дніпровського державного аграрно-економічного університету,  
протокол № 4 від 27 квітня 2022 р.

Розглянуто на засіданні кафедри хірургії і акушерства с.–г. тварин Дніпровського державного аграрно-економічного університету,  
протокол № 6 від 21 січня 2022 р.

Розглянуто та схвалено науково-методичною радою факультету ветеринарної медицини Дніпровського державного аграрно-економічного університету,  
протокол № 4 від 1 лютого 2022 р.

# З М І С Т

С т о р.

<b>ВСТУП</b> .....	<b>3</b>
<b>1. МОЖЛИВОСТІ БІОТЕХНОЛОГІЇ У ВІДТВОРЕННІ ТВАРИН</b> .....	<b>4</b>
<b>2. БІОТЕХНОЛОГІЧНІ МЕТОДИ ВІДТВОРЕННЯ СОБАК ТА КОТІВ</b> .....	<b>9</b>
2.1. ШТУЧНЕ ОСІМЕНІННЯ .....	9
2.1.1. Переваги застосування штучного осіменіння .....	9
2.1.2. Історія розвитку штучного осіменіння собак .....	11
2.1.3. Відбір і утримання плідників .....	19
2.1.4. Особливості годівлі псів та котів .....	21
2.1.5. Методи одержання сперми від псів .....	22
2.1.5.1. Правила одержання сперми .....	25
2.1.5.2. Одержання сперми методом мастурбації .....	26
2.1.5.3. Одержання сперми за допомогою штучної вагіни .....	27
2.1.5.4. Метод електроеякуляції .....	28
2.1.6. Оцінка якості сперми .....	29
2.1.7. Технологія роботи зі спермою .....	36
2.1.7.1. Розбавлення і зберігання сперми .....	36
2.1.7.2. Банк сперми .....	44
2.1.7.3. Транспортування сперми .....	45
2.1.7.4. Особливості використання свіжоодержаної та замороженої сперми .....	47
2.1.8. Визначення оптимального часу осіменіння сук .....	50
2.1.9. Техніка штучного осіменіння .....	57
2.1.9.1. Інтравагінальне осіменіння .....	57
2.1.9.2. Трансцервікальне осіменіння .....	59
2.1.10. Штучне осіменіння кішок .....	62
Ветеринарно-санітарні правила при штучному осіменінні .....	73
2.2. ТРАНСПЛАНТАЦІЯ ЕМБРІОНІВ .....	74
2.2.1. Історія розвитку трансплантації ембріонів .....	75
2.2.2. Етапи трансплантації ембріонів та їх характеристика .....	77
2.2.3. Ветеринарно-санітарні правила роботи при трансплантації ембріонів: .....	86
<b>3. ЛІТЕРАТУРА</b> .....	<b>88</b>

## ВСТУП

Біотехнологія (від грец. «*βιοτεχνολογία*»: «*bios*» – життя, «*techne*» – мистецтво, «*logos*» – слово, вчення) – це наука про використання біологічних процесів в техніці та промислового виробництва.

Новітня біотехнологія (біоінженерія) – це наука про генно-інженерних та клітинних методах і технологіях створення та використання генетично модифікованих рослин, тварин і мікроорганізмів з метою інтенсифікації виробництва і отримання нових продуктів різного призначення.

Основна мета і завдання біотехнології спрямовані на розробку методів і прийомів, що дозволяють отримати біологічно активні сполуки (ферменти, гормони, амінокислоти, вакцини, лікарські препарати), а також конструювання молекули нових речовин і створення форм організмів, відсутніх у природі (хімерні гібридні молекули, хімерні тваринні і рослинні тканини і організми).

Біотехнологія – міждисциплінарна галузь, що виникла на стику біологічних, хімічних і технічних наук:

- біофізики, використання якої дозволяє отримувати матеріали про молекулярну структуру і функції мембранного апарату клітин, механізми проникності мембран і метаболізму;

- кріобіології, що дає можливість розробити теорію кріоушкоджень і кріопротекції клітин, що необхідно для створення виробничих технологій тривалого зберігання генетичного матеріалу – сперми, яйцеклітин, ембріонів та їх фрагментів;

- електрорадіофізіології, яка дозволяє здійснювати пошук способів управління власними механізмами організму шляхом передачі необхідної інформації за допомогою модульованого мікрохвильового поля безпосередньо в центри ендокринних і гормональних систем;

- цитоінженерії і мікрохірургії – для проведення інженерних робіт на клітинному рівні з метою створення нових геномів, їх клонування і розмноження;

- неінфекційної імунології, що дає можливість застосовувати методи радіоімунним та імуноферментного аналізу фізіологічного стану організму;

- гібридної і клональної імунології, що забезпечує можливість створення промислових технологій виробництва високоспецифічних імунних реагентів і біологічно активних сполук;

- репродуктивної ендокринології – для вивчення та управління системами гуморальної регуляції процесів відтворення;

- кріоінженерії – для створення нових конструкцій кріогенної техніки і впровадження в практику нових біотехнологій репродукції;

- ряду інших наук, що раніше не використовувалися в біології і особливо в тваринництві.

## 1. МОЖЛИВОСТІ БІОТЕХНОЛОГІЇ У ВІДТВОРЕННІ ТВАРИН

Втручання людини в процес розмноження тварин призвело до запровадження у ветеринарній практиці та тваринництві біотехнологічних методів. Це дозволяє вирішити ряд проблем, пов'язаних із подоланням неплідності, профілактикою захворювань, збереженням видів і порід, селекційним процесом, що має на меті отримання тварин з новими продуктивними властивостями та підвищення продуктивності сільськогосподарських тварин. Найбільшого практичного значення набули методи штучного осіменіння та трансплантації ембріонів.

Досягнуто певних успіхів у підвищенні репродуктивного потенціалу, прискореному розмноженні особин із потрібними показниками і зменшенні кількості інфекційних захворювань тварин.

Методами біотехнології розмноження тварин є наступні:

- Ксенотрансплантація.
- Партеногенез.
- Клонування.
- Отримання химер.
- Виведення трансгенних тварин.
- Запліднення ооцитів *in vitro*.
- Поділ сперми за статтю.
- Ділення ембріона на частини (однойцеві близнята).
- Кріоконсервація сперми та ембріонів.
- Трансплантація ембріонів.
- Штучне осіменіння тварин.

**К с е н о т р а н с п л а н т а ц і я** (від грец. «ξένος» – «чужий» і лат. «*transplantatio*» – пересаджування, перенесення), або **м і ж в и д о в а т р а н с п л а н т а ц і я** – трансплантація органів, тканин і / або клітинних органодів від організму одного біологічного виду в організм або його частину іншого біологічного виду.

**П а р т е н о г е н е з** (від грец. «παρθενος» – незаймана та «γενεσις» – народження) – форма статевого розмноження, коли розвиток зародка відбувається без запліднення. Притаманний багатьом рослинам та безхребетним тваринам (попелиці, паличники, коловертки, деякі види цвіркунів, метеликів та бджіл), а також і деяким хребетним (риби, земноводні, ящірки). Особливі форми партеногенезу – гіногенез, андрогенез та педогенез.

**Гіногенез** (грец. *gyno* – жінка та лат. *genesis* – виникнення) – форма розмноження, за якої спермій, проникнувши до яйцеклітини, стимулює її розвиток, але його ядро не зливається з ядром яйця і не бере участі у розвитку зародку. Роль спермія обмежується активацією яйцеклітини до розвитку. Це одна з форм партеногенезу, за якої із яєць розвиваються тільки особини жіночої статі.

**Андрогенез** (від лат. *andros* – чоловік та *genesis* – походження, виникнення) – форма розмноження організмів, за якої у розвитку зародка бере



участь ядро чоловічої гаметі, але не бере участь ядро жіночої гаметі, тобто розвиток яйцеклітини з чоловічим ядром, привнесеним у неї спермієм у процесі запліднення. Андрогенез відмічений у деяких видів тварин (наприклад, наїзники *Habrobracom*) та рослин (кукурудза, деякі сорти тютюну) в тих випадках, коли ядро яйцеклітини гине до запліднення, котре при цьому є хибним (псевдогамія). Особливий випадок незайманого розвитку, або партеногенезу, іноді його називають «чоловічий партеногенез». Окремий випадок андрогенезу – мерогонія (від грец. *μέρος* – частина і *gónos* – потомство) – розвиток заплідненого фрагменту яйця, позбавленого жіночого ядра.

Педогенез (від грец. *παῖς* «дитина» → *παῖδος* «підліток» + *γένεσις, γένεση* «походження, виникнення, народження, зародження») – тип партеногенезу, за якого зародок починає розвиватися ще на личинкових (або інших ранніх) стадіях онтогенезу батьківських особин. Серед комах педогенез зустрічається у жуків (*Coleoptera*, *Micromalthus debilis*), віялокрилих (*Strepsiptera*), метеликів-мішочниць (*Psychidae*) і галиць (*Cecidomyiidae*). Також педогенез відомий для реброплавів, деяких морських гіллястовусих ракоподібних (*Cladocera*) і паразитичних плоских хробаків – трематоди.

Переваги партеногенезу полягають в тому, що він здатен значно збільшувати швидкість розмноження, та в деяких випадках за відсутності самців, самиці здатні розмножуватися самотійно, народжуючи головним чином самців.

**К л о н у в а н н я** (англ. *cloning*; давн.-грец. κλών – паросток, пагін) – поява природним шляхом або отримання декількох генетично ідентичних організмів шляхом безстатевого (в тому числі вегетативного) розмноження або партеногенезу. Термін «клонування» в тому ж сенсі нерідко застосовують і по відношенню до клітин багатоклітинних організмів.

*Клонуванням* називають також отримання кількох ідентичних копій спадкових молекул (молекулярне клонування). Нарешті, клонуванням також часто називають біотехнологічні методи, використововувані для штучного отримання клонів організмів, клітин або молекул. Групу генетично ідентичних організмів або клітин називають *клоном*.

**О т р и м а н н я х и м е р**. Химера (від грец. *χίμαιρα* – «чудовисько»; в античній міфології – вогнедишна потвора з головою та шиєю лева, з тулубом кози і з хвостом дракона; у переносному значенні – нездійсненна мрія, примха, вигадка, дивацтво) – тваринний або рослинний організм, що поєднує в собі клітини, тканини, органи чи частини тіла різних організмів. В основі утворення химери лежить об'єднання клітин, що виникли з різних зигот. Часто химерично побудованими є не цілі організми, а лише їхні окремі органи.

Химери тварин – організми, що розвиваються не з одної, а з двох і більше зигот. Химери здебільшого утворюються штучним шляхом – при трансплантаціях чи зрощуваннях, але іноді трапляються і в природних умовах, очевидно, як результат вегетативних мутацій.

У тварин-химер частина клітин має походження від однієї пари батьків, а частина – від іншої. Таким чином химерні тварини мають чотирьох батьків

і є унікальними об'єктами для теоретичних досліджень. Виникає можливість простежити, як з окремих клітин розвиваються клони, тканини, органи. У багатьох країнах були одержані химерні телята, вівці і навіть міжвидові гібриди – вівцекози. Практичне значення химер полягає в створенні високоцінних тварин, які безпосередньо використовуються у виробництві, а також підвищенні резистентності химер до ряду захворювань.

У тваринному світі химеризм може мати різну природу:

- ембріональну або онтогенестичну – коли організм формується не з двох, як належить, а з чотирьох гамет. Це стається внаслідок злиття в одну двох запліднених яйцеклітин на ранніх стадіях внутрішньоутробного розвитку;

- наслідок трансплантації – виникає після пересаджування органа або тканини (наприклад, кісткового мозку, переливання крові).

Прикладом химеризму тварин є *фримартинізм* – вид аномального гермафродитизму, за якого в самиць розвиваються і яєчники, і сім'яники. Він супроводжується неплідністю, трапляється у корів та деяких інших тварин – у жіночої статі з пар різностатевих (а отже, різнояйцевих) близнюків. Відбувається внаслідок формування анастомозів кровоносних судин між різностатевими зародками, через що між ними стається обмін статевими гормонами і попередниками статевих клітин. Схоже явище спостережено в мармозеток, проте, у них воно не призводить до неплідності.

**Т р а н с г е н н и й ( г е н е т и ч н о м о д и ф і к о в а н и й ) о р г а н і з м** – генотип якого було змінено за допомогою методів генної інженерії і має у складі свого геному чужорідні гени інших організмів. Генетична модифікація відрізняється від природного та штучного мутагенезу саме направленою зміною генотипу. При цьому генетичний матеріал переносять з одного організму в інший, використовуючи технологію рекомбінантних ДНК. Якщо при цьому ДНК, яку переносять, походить з іншого виду, отримані організми називають трансгенними.

*Трансгенні тварини* – це індивідууми, в геном яких штучно введена додаткова генетична інформація (трансген), якою є або окрема ділянка ДНК зі своїми (гомологічними) регуляторними послідовностями (еукаріотична транскрипційна одиниця), або сконструйований із різних молекул ДНК гібридний (рекомбінантний) ген. Отже, трансген – це штучно запроваджений інтегрований в ДНК тварин чужорідний ген. Під *трансгенезом* розуміють процес перенесення й інтеграції чужорідної генетичної інформацією геном тварин.

На відміну від рослин, де існує можливість отримання цілої фертильної рослини з однієї трансформованої соматичної клітини і вегетативне розмноження, отримання трансгенних тварин – дуже складний і тривалий процес.

Незважаючи на те, що перші трансгенні сільськогосподарські тварини були отримані в 1985 році введенням екзогенної ДНК в пронуклеус зигот, до теперішнього часу не розроблено ефективного методу, який би міг бути використаний для створення генетично модифікованих тварин незалежно від виду і від цілей експерименту. Розробка нових ефективних методів переносу генів в ембріональні і соматичні клітини тварин, а також вдосконалення існуючих підходів залишається актуальним завданням.

Екстракорпоральне запліднення (ЕКЗ) (лат. *extra* – зовні, *corpus* – тіло), запліднення в пробірці (IVF – *in vitro fertilisation*), штучне запліднення – метод лікування неплідності, за якого яйцеклітини запліднюються спермою поза межами жіночого організму. Досягається шляхом вилучення із яєчників ооцитів, культивування їх поза організмом з наступним після запліднення культивуванням ембріонів.

Екстракорпоральне запліднення вперше в історії людства було проведено у 1978 р. у місті Оулдхем (Англія). А засновниками методу вважаються кембриджські дослідники – гінеколог Роберт Едвардс (Robert Edwards) та ембріолог Патрік Стептоу (Patrick Steptoe).

Методика є технічно досить складною і складається з чотирьох етапів:

1. Стимулювання дозрівання яйцеклітин забезпечується різними гормональними препаратами. За мірою росту яйцеклітин проводиться аналіз крові для визначення гормональної реакції фолікула, що розвивається, та ультразвуковий контроль за ростом фолікулів у яєчниках.

2. Вилучення ооцитів (яйцеклітин). Ця операція здійснюється або за допомогою лапароскопічного методу, або за допомогою аспіраційної голки під ультразвуковим контролем.

3. Запліднення яйцеклітин в культурі. Вилучені яйцеклітини поміщають в спеціальне рідинне середовище, куди потім додають спермії.

4. Трансплантація ембріона. Здійснюється за допомогою катетера шляхом внесення зародка до матки.

За останні три десятиліття бурхливий розвиток медичних технологій доповнив початкову методику ЕКЗ новими, безпечнішими та ефективнішими методами вилучення, консервації, запліднення яйцеклітин та імплантації ембріонів. Зараз техніка ЕКЗ дозволяє вирішити проблему безпліддя не тільки у жінок, а й у чоловіків: для штучного запліднення методом інтрацитоплазматичної ін'єкції (англ. *ICSI* – *IntraCytoplasmic Sperm Injection*, дослівно – введення спермія в цитоплазму, інтрацитоплазматична ін'єкція спермія) достатньо одного спермію. Заморожені яйцеклітини можуть безпечно зберігатися протягом десятків років, що дозволяє жінці вибрати оптимальний час для вагітності.

Поділ сперми за статтю (сексування сперми) – це розділення сперми за статтю (X та Y хромосомами).

Сексований (розділений за ознакою статі) генетичний матеріал самців одержують методом проточної швидкісної лазерної цитометрії. Цей підхід дозволяє виділити із сперми фракцію, що містить 93-96% статевих клітин із потрібним типом хромосоми (X або Y). Дослідження показують, що застосування такої сперми дає гарантію отримання нащадків бажаної статі з точністю понад 90%, тобто з 10 особин молодняку щонайменше 9 будуть запланованої статі.

Ділення ембріона на частини – це вид клонування, в результаті якого отримують близнюків (монозиготні, однойцеві, гомологічні, ідентичні, схожі).

Здійснюється шляхом мікрохірургічних маніпуляцій.

**Кріоконсервація сперми та ембріонів / яйцеклітин** (грец. *κρύος* – холод і лат. *conservo* – зберігаю) – процес їх низькотемпературного збереження з можливістю відновлення їх біологічних функцій після розморожування (деконсервації).

Як правило, кріоконсервацію здійснюють за температури  $-196^{\circ}\text{C}$ , поміщаючи капсули з біологічними об'єктами до рідкого азоту. Рідше користуються вищими температурами (від  $-180^{\circ}\text{C}$  до  $-130^{\circ}\text{C}$ ), які створюють електрифіковані морозильні камери. Використання температур вище  $-130^{\circ}\text{C}$  є малоефективним і застосовується рідко (наприклад, зберігання на сухому льоду за  $-79^{\circ}\text{C}$ ). Збереження живих об'єктів за температур близько  $0^{\circ}\text{C}$  зазвичай не належать до кріоконсервації. Використання низьких температур забезпечує зупинку біохімічних процесів у клітинах, у тому числі зупиняється обмін речовин та енергії із зовнішнім середовищем, завдяки цьому живі об'єкти можуть зберігатися як завгодно довго.

**Трансплантація ембріонів (овотрансплантація)** – це штучне перенесення заплідненої яйцеклітини (зародку) до матки самки. Метод є суттєвою підмогою підвищення ефективності штучного осіменіння, за якого до організму самки переноситься не сперма, а зародок. Це дозволяє більш ефективно використовувати генетичний потенціал самки і вести селекцію гамет і зигот на основі оцінки якості потомства як самців-плідників, так і самок-донорів жіночих статевих клітин.

**Штучне осіменіння** – введення завчасно отриманої від самця сперми до статевих шляхів самки за допомогою інструментів (штучним способом). Використовується для одержання великої кількості потомства від цінних племінних самців.

Перевагою його перед природним паруванням є можливість транспортування сперми на великі відстані, більш ефективного використання сперми, подолання відмови тварин від парування.

### Питання для самоперевірки

1. Визначте можливості та перспективи біотехнології розмноження тварин.
2. Дайте визначення поняттю «ксенотрансплантація».
3. Назвіть особливі форми партеногенезу.
4. Що означає термін «клонування»?
5. Яку природу може мати химеризм? Які є його приклади?
6. Зазначте, які організми та яких тварин називають трансгенними?
7. Вкажіть, якою є методика екстракорпорального запліднення?
8. Покажіть значення застосування сексованої сперми?
9. Якою є мета поділу ембріона на частини?
10. Яке значення має кріоконсервація сперми та ембріонів?
11. Що являють собою трансплантація ембріонів та штучне осіменіння як біотехнологічні методи?

## **2. БІОТЕХНОЛОГІЧНІ МЕТОДИ ВІДТВОРЕННЯ СОБАК ТА КОТІВ**

З наведених вище методів біотехнології відтворення тварин у розведенні собак та котів більшою мірою використовується штучне осіменіння, а перспективу має трансплантація ембріонів.

### **2.1. ШТУЧНЕ ОСІМЕНІННЯ**

Штучне осіменіння є одним з найзначніших наукових та технічних досягнень ХХ століття у галузі тваринництва і на сьогодні залишається найефективнішим біотехнологічним способом відтворення тварин.

Суть штучного осіменіння зводиться до введення сперми у статеві шляхи самки за допомогою спеціальних інструментів. Статевий акт при цьому виключений, більше того, самець і самка можуть знаходитися на віддалі одне від одного (або самця вже давно може не бути в живих). Сперму від самців одержують також штучним шляхом, за допомогою спеціальних приладів і піддають її перед використанням різноманітним технологічним обробкам.

Метод штучного осіменіння ґрунтується на наступних фізіолого-біохімічних основах:

- можливості неодноразового одержання повноцінної сперми від самця в умовах, які імітують парування (одержання сперми одним із способів);
- збереження життєздатності спермії поза організмом без втрат їх генетичних властивостей;
- можливості осіменіння самок спермою, розбавленою штучними середовищами, оскільки еякулят статево зрілого самця містить значно більше сперміїв, ніж необхідно для одноразового плідного осіменіння самок;
- можливості плідного осіменіння самок при відсутності самця;
- збереження тривалий час запліднювальної здатності сперміїв при їх кріоконсервації, тобто глибокому охолодженні;
- наявності точних відомостей про закономірності овуляції у самок, пересуванню яйцеклітини і сперміїв у статевому апараті самки і збереження ними життєздатності.

#### **2.1.1. Переваги застосування штучного осіменіння**

За допомогою методу штучного осіменіння можна вирішити ряд проблем в собаківництві:

- можливість осіменіння декількох сук одночасно спермою одного пса без ризику його «виснаження» шляхом поділу одного еякуляту на кілька спермодоз;
- осіменіння суки спермою відразу від кількох псів з наступним генетичним тестом на батьківство, що дає шанси отримати в одному посліді одразу кілька генетичних ліній нащадків;
- при використанні замороженої сперми, можливе її накопичення від видатних плідників і зберігання в кріобанку протягом багатьох років для використання в майбутньому;

- використання кріоконсервованої сперми дозволяє здійснювати її міжнародний обмін без необхідності перевезення самих тварин. При цьому з'являється можливість замовного осіменіння сук спермою будь-якого пса;

- простіше виконувати карантинні обмеження, які перешкоджають переміщенню тварин з однієї країни в іншу;

- запобігання виникненню захворювань, що передаються статевим шляхом.

Важливою перевагою штучного осіменіння є можливість проведення тестів на препотентність плідника. За природного осіменіння провести дослідження ознак плідника, що передаються у спадок, було значно складніше. З урахуванням цієї переваги, штучне осіменіння відкриває нові можливості для імбридингу, полегшуючи створення кривих ліній, що дають якісне потомство.

Крім цього, штучне осіменіння може також рекомендуватися в ряді випадків, коли в'язка у природних умовах неможлива:

- неможливість природного парування внаслідок вроджених аномалій піхви (вужької і коротка) у самок;

- надмірно агресивної поведінки тварин під час парування по відношенню один до одного;

- низьке лібідо (надмірна нервозність або недосвідченість) самців;

- низька ефективність природного парування внаслідок певних породних особливостей собак (різниця у розмірах пса і суки, дуже великі і важкі породи і т. і.);

- наявність певних захворювань у пса або суки, що не дозволяють здійснювати повноцінне парування (травми опорно-рухового апарату, захворювання кінцівок, стегна, спини і т. і.);

- запобігання стресового фактору під час транспортування тварин до місця в'язки.

Останній пункт є дуже суттєвим, адже в транспортування сперми за використання штучного осіменіння дозволяє уникнути довгих, дорогих та нерідко небезпечних для здоров'я тічної суки переїздів. Випадків, коли тварини тяжко хворіли або навіть гинули через стрес або травми, отримані в дорозі, чимало. Ще один важливий момент – деякі авіакомпанії запровадили обмеження на вагу собак, дозволивши провозити на борту тварин масою до 36 кг. Це обмеження діє у відпускний сезон, під час свят та за несприятливих метеоумов.

Не викликає сумнівів і економічна доцільність штучного осіменіння собак. Адже доставка необхідної для осіменіння дози сперми обходиться в кілька разів дешевше, ніж транспортування суки до місця в'язки і назад. Наприклад, в'язка в Німеччині коштує 1500 €. У цю суму входять витрати на транспорт та оплата господарям плідника. У той же час перевезення сперми коштуватиме не більше 300 €.

Проте штучне осіменіння може мати позитивний результат лише за належної кваліфікації спеціалістів, за суворого дотримання ветеринарно-санітарних та зоотехнічних вимог. Відомі випадки застосування інгредієнтів

розріджувачів сперми неперевіраних за впливом на спермії компонентів, або використання сперми не перевіраних за якістю нащадків плідників, що стало причиною масової неплідності.

### 2.1.2. Історія розвитку штучного осіменіння собак

Історія такої галузі як біотехніка розмноження тварин починалася з проведення перших досвідів з штучного осіменіння самок сільськогосподарських тварин. Таємниця зародження живих істот із найдавніших часів хвилювала людські уми і спроби отримувати нащадків від тварин без статевого акту робилися давно. Існує легенда про те, що за 800 років до н. е. ассірійці вводили губку в піхву кобили і після коїтусу з жеребцем переносили її зі спермою в піхву іншої кобили для отримання високоякісного потомства.

В арабському літописі зазначається, що в 286 р. нової ери один бедуїн з Північної Африки, не маючи можливості отримати приплід від жеребця, що належить його супернику, ввів у піхву однієї з кобил, що паслися з цим жеребцем, пучок кінського волосся. Потім витяг його після коїтусу, швидко перевіз і ввів у піхву своєї кобили і таким чином штучно осіменив її.

Є згадки, що араби застосовували штучне осіменіння вже в XIV ст.

Безумовно, ці дані несуть на собі деякий відбиток фантастики, проте ігнорувати ними не можна.

Як фізіологічний досвід штучне осіменіння вперше застосував в 1763 р. німецький дослідник Стефан Якобі на рибах. Цьому передувало ряд відкриттів. Так, у 1677 р. нідерландський натураліст Антоні ван Левенгук за допомогою сконструйованого ним мікроскопа спостерігав спермії всіх доступних йому ссавців, вивчав їхнє проникнення в матку після парування. У 1672 р. нідерландський анатом та фізіолог Реньє де Грааф описав яєчниковий фолікул, який понад сто років приймали за яйце у ссавців.

У ссавців перший досвід зі штучного осіменіння було проведено саме на собаках в Італії в 1780 (за іншими даними – 1782) р. всесвітньо відомим італійським фізіологом Ладзаро Спалланцані (Lazzaro Spallanzani), якого Луї Пастер назвав «найвидатнішим експериментатором з тих, що будь-коли народилися на землі». Він увів шприцем кілька крапель (є навіть точні дані – 19 г) сперми пса тієї ж породи (шпіца, за іншими даними – спанієля) в статеві шляхи суки на кличку Барбет, яка успішно завагітніла, і через 2 міс народила двох (за іншими даними трьох і навіть шістьох) цуценят схожих на батька. У той час панувала теорія преформізму, згідно якої зародок вже сформований у статевих клітинах, а його подальший розвиток полягає лише у збільшенні у розмірах: анімалькулісти (від лат. *animalculum* – звірятко, мікроскопічна тварина) вважали, що зародок міститься у сперміях, а овісти (від лат. *ovum* – яйце) – в яйцеклітинах. Спалланцані вважав, що основну роль у заплідненні відіграють не спермії, а сім'яна рідина, що збуджує до росту організм, який нібито перебуває в яйці в готовому вигляді.

Успіх Л. Спалланцані дав поштовх до вивчення статевих клітин та фізіології запліднення та послужив початком створення теоретичної бази для розвитку штучного осіменіння. Для виявлення ролі сперміїв та рідини у процесі

запліднення Л.Спалланцані профільтрував сперму і використовував розділені частини її для осіменіння. Рідина виявлялася стерильною, тоді як осад мав високу здатність до запліднення. Були з'ясовані деякі особливості спермій.

У той час не було нічого відомо і про жіночі статеві клітини тварин. Лише в 1825 (1826) році російський ембріолог німецького походження Карл фон Бер (Карл Ернст Ріттер фон Бер Едлер фон Хутхорн чи, як його називали в Росії, Карл Максимович Бер) виявив яйцеклітину у ссавців та людини, а у 1876 році зоологи німець Оскар Гертвіг і швейцарець Герман Фоль описали процес запліднення. Було також встановлено, що овуляція у багатьох ссавців відбувається під час тічки та охоти незалежно від статевого акту. Поступово зникли сумніви щодо правильності дослідів Л. Спалланцані та з'явилася впевненість у необхідності продовження робіт із штучного осіменіння багатьох видів ссавців.

Тепер поняття запліднення отримало нове трактування. Переосмислили і суть дослідів Спалланцані, які до того називали штучним заплідненням. У 1879 р. англійський біолог Вальтер Хіп запропонував називати введення сперми у статеві шляхи осіменінням, а не заплідненням.

У 1891 р. російський гінеколог М. Онанов подав у Паризьку академію наук доповідь про успішне запліднення яєць ссавців поза організмом та пересадку таких зигот у статеві шляхи самки. Виділивши з яєчників оперованих самок яйцеклітини, він змішував їх із суспензією спермій і вводив в черевну порожнину самки.

У XIX ст. цим методом зацікавилися акушери-гінекологи та використовували його як засіб боротьби з неплідністю. Причому проблеми штучного осіменіння широко висвітлювалися в медичній літературі. Це привернуло увагу тваринників і послужило стимулом до застосування цього методу в практиці тваринництва. Насамперед метод використовували собаківники. Так, селекціонер собак Everett Millais в період з 1884 по 1896 р. штучно осіменив 19 сук, з них 15 народили щенят. У світлі цієї роботи У. Хіпп писав, що штучне осіменіння легко здійсненне, викликає запліднення, як і коїтус, і що один еякулят може бути використаний для осіменіння кількох сук. Він вважав, що штучне осіменіння буде використано в основному для схрещування різних порід собак, коли через різну величину їх неможливий коїтус.

Вперше штучне осіменіння у широкій практиці було застосовано в Росії Іллею Івановичем Івановим. На початку своєї діяльності (1899-1902 рр.) І.І. Іванов, проводячи досліді на морських свинках, кроликах і собаках, спростував думку Штейнаха про те, що для запліднення яйцеклітин необхідні секрети додаткових статевих залоз. Використовуючи масу спермій, вилучених з придатка сім'яника і розведених розчином натрію бікарбонату, він встановив, що єдино необхідною умовою для запліднення є зустріч і з'єднання спермій з яйцевою клітиною, тоді як секрети додаткових статевих залоз, як і власне статевий акт, за якого ці секрети виділяються, не обов'язкові для процесу запліднення. Ним також встановлено, що спермії протягом деякого часу можуть зберігатися поза організмом не тільки свою рухливість, але й здатність до запліднення, якщо створити їм сприятливі умови.



Виходячи з цих положень, він запропонував два варіанти штучного осіменіння – сперміями, що містяться в природному середовищі, тобто в секретах придаткових статевих залоз, і сперміями, розбавленими синтетичними розріджувачами. Для практичного застосування була розроблена техніка штучного осіменіння, а саме, гудковий метод отримання сперми та інструменти для введення її в статеві шляхи самки, а також методика приготування суміші секрету придатка з розріджувачами.

Подальший розвиток технології штучного осіменіння був пов'язаний з розробкою нових способів та вдосконаленням методики отримання сперми. У 1913 році італійський фізіолог Джузеппе Амантеа вперше запропонував штучну вагіну для одержання сперми від пса. Вона складалася з гумової груші, всередину якої наливали теплу воду, а потім вставляли в нього гумовий мішечок і закріплювали за допомогою кільця; другий мішечок з більш тонкої гуми вводили всередину першого, він служив спермоприймачем (рис. 1).

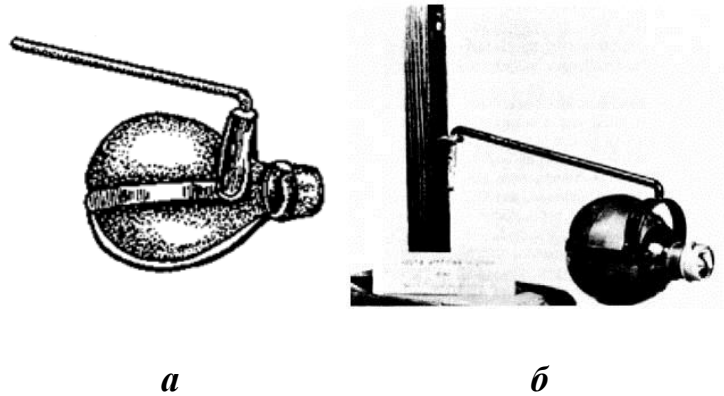


Рис. 1. Штучна вагіна конструкції Д. Амантеа: а) рисунок; б) фото

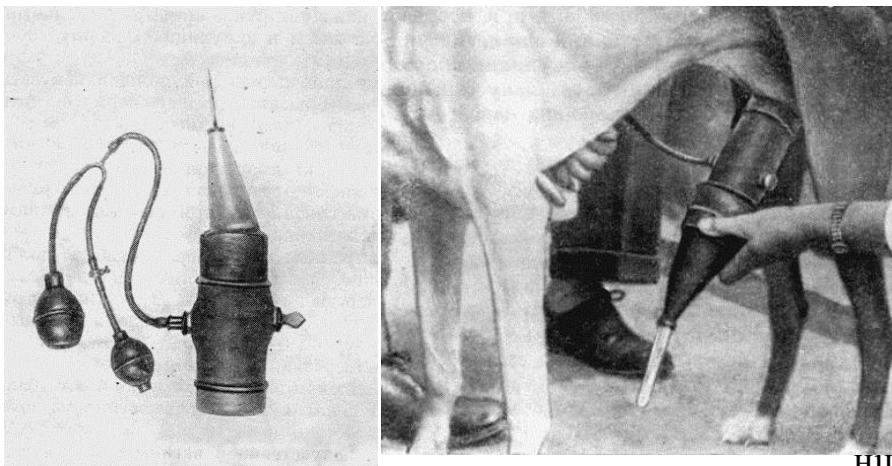


Рис. 2. Одна з перших конструкцій штучних вагін для одержання сперми від пса та приклад її використання

Удосконалені штучні вагіни являли собою циліндр, що складається з двох трубок: зовнішньої – пластмасової (довжиною 15-20 см) і внутрішньої – гумової. Гумова трубка повинна була бути довшою за пластмасову, так щоб кінці внутрішньої трубки заходили на зовнішню і їх можна було фіксувати на ній гумовими кільцями. Внутрішня трубка на зовнішню повинна бути рівномірно натягнута. Між двома трубками утворюється порожнину, куди через отвір, що є на зовнішній трубці, наливають гарячу воду. Один кінець штучної вагіни залишають відкритим, а на іншому – зміцнюють спермоприймач для збирання сперми. Отвір, через який наливають воду, з'єднують із гумовим балоном гумовою трубкою. Цей балон призначений для повітряної пульсації у вагіні під час еякуляції (рис. 2).

Удосконалені штучні вагіни являли собою циліндр, що складається з двох трубок: зовнішньої – пластмасової (довжиною 15-20 см) і внутрішньої – гумової. Гумова трубка повинна була бути довшою за пластмасову, так щоб кінці внутрішньої трубки заходили на зовнішню і їх можна було фіксувати на ній гумовими кільцями. Внутрішня трубка на зовнішню повинна бути рівномірно натягнута. Між двома трубками утворюється порожнину, куди через отвір, що є на зовнішній трубці, наливають гарячу воду. Один кінець штучної вагіни залишають відкритим, а на іншому – зміцнюють спермоприймач для збирання сперми. Отвір, через який наливають воду, з'єднують із гумовим балоном гумовою трубкою. Цей балон призначений для повітряної пульсації у вагіні під час еякуляції (рис. 2).

У 30-ті роки швидкому впровадженню штучного осіменіння у практику сприяли створення нових інструментів та приладів для отримання сперми від плідників та розробка таких розріджувачів сперми, які дозволяли порівняно довго зберігати її.

Вивчення біохімії сперми дало можливість удосконалити методи розведення, зберігання та перевезення сперми. Особливо велику роль відіграло повідомлення Phillips у 1939 р. про сприятливий вплив на виживання спермійв при температурах близько 0<sup>0</sup>С у жовтково-фосфатних розріджувачах та про важливе значення жовтка у розріджувачі.

Важливе значення мало також глибоке вивчення функції статевих органів у самців і самок і виявлення двох типів природного запліднення – маткового та вагінального. Це дозволило запропонувати методи оптимального використання плідників і проводити запліднення самок в найбільш підходящі терміни з урахуванням типу їх природного осіменіння. Все це сприяло більш широкому використанню штучного осіменіння тварин у практиці.

У 30-40-50-х роках ХХ ст. в літературі з'явилася низка робіт з вивчення складу сперми собак. Так, Аліфанов (1934 р.) провів дослідження сперми у 30 собак і встановив, що обсяги їх еякулятів коливалися від 1,5 до 2,5 мл. Найменший обсяг еякуляту був у собак, які сук зовсім ігнорували. 1 мл сперми містив у середньому 189 млн. спермійв. Автор також визначив, що сперма пса дозріває (після еякуляції) через 24-72 год.

Фрейберг (1935 р.) встановив, що сперма складається із трьох частин: 1) виділення уретральних залоз (від 1 до 2 мл), 2) спермовмісної частини (від 2 до 4 мл), 3) виділення передміхурової залози (досягає 30 мл).

Емберт Мак-Кензі (1940 р.) доповнив відомості про сперму пса. Він встановив, що об'єм еякуляту досягає 2-19 мл з кількістю спермійв від 10 до 90 млн. в 1 мл.

Петерс (1943 р.) заявив, що середній об'єм еякуляту в його обліку дорівнював 3,2 мл, а відповідності між густиною та об'ємом не помічено.

Ханкок Ровланд (1949 р.) довів, що середній обсяг еякуляту дорівнює 6,5 мл і що обсяг варіює обернено пропорційно густоті. Визначення густоти спермійв дало середню цифру, що дорівнює 27 млн. на 1 мл.

Нудер (1950 р.) у дослідженнях встановив, що об'єм еякуляту коливається від 1 до 20 мл. На його думку хороша сперма повинна мати в 1 мл від 88 до 588 млн. спермійв.

З більшості цих досліджень випливало, що хороший зразок сперми не повинен містити більше 20% патологічних спермійв.

Харроп (1954 р.), отримуючи за допомогою штучної вагіни сперму собак різних порід, дійшов висновку, що середній об'єм еякуляту становить 9,5 мл, причому більш дрібні породи в більшості випадків дають меншу кількість сперми, ніж крупніші. Він детально вивчив ті фракції (частини) сперми, про які йшлося раніше. Це було зроблено встановленням чистої градуйованої пробірки у штучну вагіну після того, як щоразу була отримана рідина. Перша фракція, об'єм якої варіював від 0,25 до 2 мл, складалася з чистої рідкої рідини і містила трохи (або зовсім не містила) спермійв. Він передбачав, що це,

напевно, секрет залоз слизової оболонки уретрального каналу. Друга частина майже білого кольору і набагато менш в'язкої консистенції мала об'єм від 0,5 до 3,5 мл і містила спермії. Третя частина, що складається з виділень передміхурової залози, була теж прозорою на вигляд і водянистою за консистенцією. Об'єм цієї фракції коливався від 3 до 20 мл відповідно породі та величині собак, причому і ця фракція може значно варіювати у одного і того ж самця при різних випадках. Сперміїв вона містить дуже мало чи не містить зовсім.

Паралельно проходили дослідження збереження одержуваної сперми. Проведені ще у тридцятих роках ХХ ст. дослідження показали, що виживання сперміїв поза організмом можна збільшити шляхом сповільнення їх рухливості, зниження інтенсивності у них обмінних процесів, ослаблення несприятливої дії на спермії секретів додаткових статевих залоз і мікроорганізмів. Досягти цього можна шляхом розрідження сперми та відповідного режиму її зберігання. Тому пошук середовищ для розбавлення сперми був окремим напрямком.

Ще кінці ХІХ ст. І.І. Іванов вперше застосував ізотонічні розчини натрію хлориду, натрію бікарбонату та рідину Лока для розрідження сперми при осіменінні кролів, морських свинок, собак, а пізніше й корів та кобил. При цьому було відмічено надзвичайно високе пристосування сперміїв до навколишнього середовища. Вони добре зберігали рухливість у ізотонічних розчинах хлористого натрію, калію, барію, магнію, вуглекислого та двовуглекислого калію і навіть у розчинах дифтерійного токсину, антитоксину та антидифтерійної сироватки.

Проте згодом виявилось, що у чистих фізіологічних розчинах хлориду натрію та інших нейтральних солей спермії виживають гірше, ніж у їх сумішах.

У 1928 році в Японії Ямане і Като запропонували для розрідження сперми суміш 5%-го розчину глюкози з фосфатним буфером (рН 7,2-7,4), в якій вдалося збільшити виживання сперміїв.

Однак одного розрідження, як виявилось згодом, недостатньо для збільшення виживання сперміїв. Як відмітив ще в свій час Л. Спалланцані, збільшити виживання сперміїв можна, застосовуючи, поряд з розрідженням, охолодження сперми. Проте за швидкого охолодження у сперміїв настає температурний шок (холодовий удар). К.Н. Кржишковський та Г.Н. Павлов (1927 р.), В.К. Милованов та І.А. Селіванова (1932 р.) встановили, що захистити спермії від холодового удару можна за допомогою фосфоліпідів, а Філліпс і Ларді у США, враховуючи високий вміст фосфоліпідів (лецитину) у жовтку курячого яйця, включили його до складу розріджувача.

У 1941 році Г. Солсбері, Х. Фаллер і Е. Віллет, враховуючи кращу розчинність жирових кульок жовтка у цитраті натрію, ніж у фосфаті, запропонували жовтково-цитратний розріджувач. У п'ятдесятих роках широкого розповсюдження набув глюкозо-цитратно-жовтковий розріджувач, до складу якого входять глюкоза, цитрат натрію та жовток курячого яйця.

Заслуговують на увагу дослідження М.П. Шергіна, який у 1945 році встановив, що сперма, розріджена молоком, краще виживає, ніж у 1%-му ро-

зчині хлористого натрію; молоко виявилося фізіологічним середовищем для спермій. На цій підставі Н.Н. Михайлов запропонував молочні розріджувачі для сперми.

Свою історію має розробка оптимальних композицій середовищ для розведення клітинних суспензій з метою їх кріоконсервації, яка включає низку періодів, що відображають динаміку рівня теоретичних досягнень у галузі кріобіології. Були відкриті різні кріопротектори – як ті, що проникають до клітини (гліцерин і поліоли), так і не проникні (різні цукри та полімери). Потім слідує період докладного вивчення механізмів кріопошкодження і кріопротекції клітин і розробки технологій заморожування і тривалого зберігання клітинних суспензій (сперми, крові, різних рослинних і тваринних тканин і органів). Ці методики відрізнялися створенням дуже складних композицій кріопротекторних середовищ, хитромудрих графіків зниження температури та громіздких установок, приладів та апаратів з електронним і навіть комп'ютерним управлінням.

Становище значно спростилося після робіт, в яких довели, що комбінація проникаючих (гліцерин) і непроникних (лактоза, цукроза, рафіноза) кріопротекторів дозволяє істотно спростити застосовувані середовища і методику заморожування сперми і відмовитися від складної апаратури.

Розробляючи методи зберігання сперми, вчені виходили з наявності у природі двох станів живих організмів: життєдіяльного та нежиттєдіяльного. У життєдіяльному стані істота може проявляти повну активність (біоз) чи дещо уповільнену активність (гіпобіоз); у нежиттєдіяльному стані вона може перебувати в анабіозі (тобто не проявляючи функції життєдіяльності), або ж у мезабіозі (проявляючи лише процеси дисиміляції, тобто розпаду речовин клітини).

Тривале зберігання сперми при низьких температурах є найбільшим досягненням у галузі штучного осіменіння другої половини ХХ сторіччя.

Проблема біологічної дії холоду на спермії бере свій початок з досліджень Л. Спаланцані (1787 р.), П. Мантегаца (1866 р.), І.І. Іванова (1907 р.), К.Н. Кржижковського та Г.Н. Павлова (1922 р.). Було встановлено, що тривале зберігання гамет можливе лише в умовах повного анабіозу, при якому гальмуються всі біохімічні процеси.

При вивченні явища анабіозу у рослинних та тваринних клітин П.Г. Бахметьєв (1902 р.) прийшов до висновку, що однією з причин їх загибелі є втрата води їх протоплазмою при охолодженні. Академік Максимов (1913) довів, що додавання до заморожуваних рослинних клітин гліцерину захищає їх від зневоджування протоплазми, денатурації білка, кристалізації льоду. Згодом це підтвердили на сперміях А.Д. Бернштейн та В.В. Петропавловський (1936 р.), які вивчали зміни живучості спермій при їх охолодженні до  $-15...-23^{\circ}\text{C}$ . Проте цей факт не був критично оцінений і використаний. Дещо пізніше Янель (1938) встановив, що спермії людини володіють надто високою стійкістю до охолодження у рідкому азоті ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) і навіть у рідкому гелії ( $-269^{\circ}\text{C}$ ).

Серед холодних агентів, що випробовувалися при заморожуванні сперми, слід згадати сухий лід чи сніг ( $-78,9^{\circ}\text{C}$ ), рідке повітря ( $-193,5\dots-183^{\circ}\text{C}$ , залежно від співвідношення азоту та кисню) його компоненти – рідкий азот ( $-195,8^{\circ}\text{C}$ ), рідкий кисень ( $-182,8^{\circ}\text{C}$ ), рідкий водень ( $-252,8^{\circ}\text{C}$ ) та рідкий гелій ( $-268,9\dots-272^{\circ}\text{C}$ ). Але найпридатнішим виявився рідкий азот – він не отруйний, хімічно інертний, не утворює вибухових сумішей, не горить і не підтримує горіння, хоча, безумовно, при роботі з ним потрібно дотримуватись певних передосторог.

Нині сперму заморожують у формі не облицьованих чи облицьованих гранул, у поліпропіленових соломинках, полістиролових піпетках, для цього опрацьовані відповідні рецепти середовищ та технологія заморожування.

Перші щенята із застосуванням розведеної охолодженої сперми були отримані лише в 1954 р., із застосуванням заморожено-відталої – аж у 1969 р. Саме в цьому році у Техасі група ветеринарних лікарів під керівництвом доктора С.У. Зігера (S.W. Seager) розробила рецептуру розбавників (зокрема лактозного) для заморожування сперми, що дало можливість отримати перший приплід від суки, яка була штучно осіменена деконсервованою спермою.

У Європі перший дослідний центр штучного осіменіння собак був створений у ветеринарному інституті м. Осло (Норвегія) на базі лабораторії професора А.К. Андерсена (A.C. Andersen). Скандинавські заводчики не могли в'язати своїх сук з псами, що проживали за кордоном через суворі карантинні бар'єри. Крім того, в Скандинавії були напрацювання зі штучного осіменіння клітинних лисиць, що дозволило вдосконалювати ці методи для собак.

У 1981 р. м. Мезон-Альфоре (Франція) професор Ветеринарної школи доктор Тере отримав завдання Центрального Кінологічного суспільства і Міністерства сільського господарства почати дослідження щодо заморожування сперми пса і вдосконаленню методик штучного осіменіння. У квітні 1982 р. вперше було отримано цуценят в результаті штучного осіменіння сук замороженої спермою.

Тільки в 1985 р. там же була створена реальна комерційна структура (центр досліджень проблем репродукції собак) для координації досліджень і збору інформації в галузі штучного осіменіння собак, управління банком консервованої сперми і навчання ветеринарів-спеціалістів в цій галузі. До 1988 р. були детально вивчені всі аспекти штучного осіменіння собак, розроблені методики і конкретні рекомендації заводчикам.

У 2005 році один з найбільш визнаних світових постачальників систем для допоміжної репродукції компанія Minitube представила повну лінійку обладнання та витратних матеріалів для штучного осіменіння собак. Це була розробка експертів і ветеринарних фахівців в тісному співробітництві з університетами та приватними практиками по всьому світу. На сьогодні спектр продукції, що виробляється компанією Minitube, дуже широкий і представлений інструментами для одержання сперми, її технологічної обробки (одержання розбавлення, зберігання, транспортування, деконсервації) і штучного осіменіння.

Нині штучне осіменіння є досить поширеною процедурою у всьому світі. Завдяки розвитку медичної техніки та винаходу розріджувачів сперми, що зберігають її якість, дана технологія дозволяє отримувати потомство від давно загиблих псів.

Успіх у штучному осіменінні залежить від трьох основних факторів:

- якості введеної сперми у статеві шляхи самки;
- вибраного часу для штучного осіменіння;
- здоров'я самки.

Тому до процедури штучного осіменіння допускаються лише здорові суки з діагностованою овуляцією. Перед введенням у статеві шляхи самки сперма проходить контрольну оцінку. Штучне осіменіння свіжоотриманою спермою краще проводити наступну добу після овуляції з повтором через добу. Заморожено-відталою спермою краще осіменяти через 2 доби після овуляції.

В даний час кількість фахівців, які проводять процедуру штучного запліднення свіжозібраної та охолодженої спермою, досить багато, так як процедура дуже популярна і не вимагає придбання коштовного обладнання. Тому в багатьох містах є ветеринарні клініки, де можуть надати цю послугу. Що стосується роботи з кріоконсервованою спермою, для цього, крім спеціально навченого персоналу, потрібна наявність обладнаного приміщення (спермобанк) та медичної техніки. Тому ветеринарні центри репродукції на даний момент нечисленні і існують поки що у великих містах.

Штучне осіменіння собак вже застосовується в багатьох країнах світу – Америці, Канаді, Англії, Австралії, Данії, Швеції, Фінляндії і т. д. Для осіменіння використовують свіжоодержану, охолоджену або заморожену сперму.

Комерційне застосування штучного осіменіння у собаківництві (експорт, імпорт сперми, вимоги до батьківських пар, правила реєстрації потомства тощо) регламентується Національними кінологічними федераціями.

Однак, його застосування нині стримується переважно відсутністю відповідних нормативних документів з урахування походження тварин та певним консерватизмом кінологічної громадськості. Однак і тут є перспектива – наприклад, Кеннел Клуб (The Kennel Club – клуб собаківництва, найбільша у Великій Британії організація, що займається реєстрацією чистокровних собак і порід собак) дозволив штучне осіменіння з племінною метою, обмовивши обов'язкову участь уповноваженого ветеринарного фахівця в реєстрації документів цуценят, що народилися в результаті штучне осіменіння.

Усі маніпуляції зі штучного осіменіння (одержання сперми від псів, визначення фертильного періоду у сук та їх штучне осіменіння) повинні проводитися згідно вимог Закону України № 3447-IV від 21.02.06 р. «Про захист тварин від жорстокого поводження», згідно основних принципів «Європейської конвенції із захисту хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та наукових цілей», Всесвітньої декларації прав тварин та декларації «Про гуманне ставлення до тварин», а також «Загальних етичних принципи експериментів на тваринах» ухвалених на I Національному конгресі з біоетики (2001 р.). Тварини мають право на позбавлення від болю

(знеболення), відновлення їх стану, здорові умови утримання. Умови утримання тварин повинні відповідати їх біологічним, видовим та індивідуальним особливостям, задовольняти їх природні потреби в їжі, воді, сні, рухах, контактах із собі подібними, у природній активності та інші потреби.

Головним завданням ветеринарних спеціалістів України разом з Кінологічними Союзами законодавчо прописати застосування штучного осіменіння сук як додаткового методу покращення популяції високопородних собак, сертифікувати технологію штучного осіменіння сук та створити державні центри репродукції собак з кріобанками сперми видатних псів, розробити нормативну базу де будуть чітко прописані права та обов'язки замовника та виконавця даних послуг. Корисним буде створити на спеціалізованих кафедрах факультетів ветеринарної медицини відповідні курси підвищення кваліфікації щодо осіменіння сук, що передбачає розробку програми та виділення державного фінансування для посилення досліджень щодо заморожування сперми псів та розробки нових підходів до осіменіння сук.

Роботу зі штучного осіменіння собак проводять у такому порядку:

- одержання сперми;
- оцінка якості одержаного еякуляту;
- розведення, зберігання та транспортування сперми;
- вибір часу запліднення самки; введення сперми в статеві шляхи самки.

Однак цьому передує робота з відбору, утримання плідників, їх годівлі та експлуатації.

### **2.1.3. Відбір і утримання плідників**

Правильний вибір плідників дрібних тварин дуже важливий, тому що саме він має великий вплив на породу, як на її поліпшення, так і на погіршення, враховуючи, що самець використовується значно більше, ніж самка.

Безсистемне використання племінних тварин може завдати значної шкоди породі, особливо там, де присутні спадкові недоліки, наприклад, такі, як прогресуюча атрофія сітківки ока, катаракта, дисплазія, генетичним носієм яких може бути тварина, яка сама при цьому ніяких ознак цих патологій не має.

Знання про генетичні недоліки самця, як явні, так і непомітні, без сумніву, мають велике значення. Відносно явних недоліків слід пам'ятати, що вони можуть бути наслідком помилок при вирощуванні. Наприклад, недорозвинений кістяк може бути наслідком незбалансованої годівлі в ранньому віці.

Дуже важливо, щоб генетичні можливості самок дрібних тварин були пов'язані з потенціалом самців, бо кожний з батьків дає половину генетичного «внеску» в кожную народжену тварину. Тому також важливо, щоб плідник, підібраний до самки, не мав саме таких недоліків, як у неї.

Іноді популярний в породі плідник виявляється дуже препотентним – всьому потомству від будь-якої тварини жіночої статі він передає свої хороші ознаки або якості. Так буває, якщо ці ознаки визначаються домінантним геном, а плідник по даній парі генів є повною домінантою. Слід пам'ятати, що часто препотентність плідника лише маскує зовнішні недоліки самки, які вона

передає нащадкам. Нащадки такого плідника від однієї самки будуть мати не тільки добрі зовнішні ознаки, але й добру спадковість, тому що отримують по одному «гарному» гену від кожного з батьків. Нащадки цього ж плідника від інших самок, зовнішньо також вдалі, насправді успадковують від матері небажану ознаку (і відповідальний за нього рецесивний ген), який обов'язково проявиться в наступних поколіннях. Таким чином, для того, щоб нащадки були «чистими» за якою-небудь ознакою обидва батьки не повинні нести рецесивного гену, який визначає зміну або погіршення цієї ознаки.

Для того, щоб племінний плідник залишався в хорошій кондиції, був сильним, здоровим і добре виконував свою роботу, за ним потрібні належні утримання та догляд у відповідності до норм Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження».

Самці дрібних тварин, незалежно від їх розміру, повинні мати повноцінний раціон. Так, раціон для хижих тварин має містити багато тваринного білка, який є необхідним для будови організму, повинен бути добре збалансованим і включати сире м'ясо, рибу і молочні продукти. Крім того, в раціон плідника необхідно додавати вітаміни і мікроелементи, а саме вітаміни групи В і вітамін Е. Вода повинна бути доступна пліднику завжди.

Крім збалансованого раціону, племінний плідник для збереження своєї форми потребує достатньо тривалих прогулянок як з примусовою фіксацією, так і без неї.

Також плідник потребує регулярного догляду, його потрібно щоденно оглядати і не допускати ніяких паразитів, як зовнішніх, так і внутрішніх. Місця, де розміщуються плідники, утримують в ідеальній чистоті і дезінфікують.

Кігті необхідно регулярно оглядати: ті, які надмірно вирости – підпилювати або відкушувати спеціальними щипцями. Важливо, щоб кігті були короткими, так як плідник з гострими і довгими кігтями може поранити самку під час парування.

Племінному пліднику ще в ранньому віці роблять всі необхідні щеплення, а потім чітко дотримуються строків щорічної ревакцинації.

Слід утримувати в особливій чистоті зовнішні статеві органи плідника. При найменших ознаках підозрілих виділень з препуцію слід проводити спринцювання шкірного мішка препуцію різними антисептичними розчинами.

**Режим використання (статевого навантаження) плідників.** Навантаження на плідника залежить від можливостей даного конкретного самця, але чітких правил відносно цього не існує. Псів рекомендують допускати до в'язки у віці 2-8 років. Однак, з урахування строків настання фізіологічної зрілості, не слід використовувати для парування раніше 12 міс. псів дрібних порід, 15 міс. – середніх, 18 міс. – крупних і 22 міс. – гігантських.

За молодим фізіологічно зрілим псом-плідником у перший рік репродуктивного життя закріплюють 3-4 суки (6-8 в'язок), а за дорослим (у віці 3-8 років) – 10-15 (20-30 в'язок). За іншими рекомендаціями молодих самців мо-



жна використовувати в режимі 1-2 в'язки на тиждень або 30-40 самок на рік, повновікових – 2-6 в'язок на тиждень чи 30-80 самок на рік.

Молодого пса, якщо його готують до племінної роботи, не можна використовувати до 10 міс. Перше парування має дуже велике значення, адже при цьому пса потрібно тактично навчити тому, що від нього потребують. Другий раз його можна використати у віці 14 міс., а надалі – не частіше 1 разу на місяць до віку 18 міс. або 2 роки. Занадто часте використання потенційно доброго племінного плідника до віку 18 міс. є необачним, адже він, без сумніву, буде виснажений і згодом стане непридатним для відтворення.

Перше парування молодого пса завжди проводиться зі зрілою сукою, переважно з такою, яка парується з охотою, спокійна і має добрий характер. Можливо, що для плідника-початківця краще підійде сука з того ж розплідника, котру він добре знає. Небажано парувати молодого пса з сукою, яку ще не парували. Дуже важливо також упевнитися в тому, що сука готова до парування, щоб вона не злякала або навіть не вкусила пса.

Буває й так, що досвідчений племінний плідник віддає перевагу деяким самкам – з однією парується швидко, в той же час відмовляється паруватися з іншою.

Деякі плідники залишаються активними до кінця свого життя, але якщо доведеться використовувати старого плідника, то краще парувати його з молододу самокою. Більшість плідників проявляють активність при паруванні до 10 і навіть більше років. У віці 18 міс. сильний, міцний і активний плідник, який має добрий вигляд, може паруватися з сукою найчастіше 1 раз на тиждень. Але, якщо в нього будуть якісь відхилення при паруванні, йому слід надати відпочинок.

Часто буває так, що протягом одного тижня у сук всього розплідника розпочинається тічка. Добре підготовлений плідник легко парується зі всіма цими суками і дає в приплодах нормальну кількість цуценят, але після такого інтенсивного використання необхідно надати пліднику відпочинок протягом кількох тижнів.

Коти досягають статевої зрілості і починають виробляти сперму в середньому у віці 9 міс. з коливаннями від 6 до 18 міс. Зазвичай кота не використовують, доки він не досягне 12-міс. віку, як правило, у віці півтора-двох років і використовується протягом 5-6 років. Якщо кіт є цінним у племінному відношенні, то його починають використовувати для парування не раніше 2-річного віку. Повновікові коти можуть паруватися до 3 разів на тиждень, але тривале використання такого режиму може мати негативний вплив на якість сперми. Тому узагальненою нормою є використання котів для парування 2-3 рази на місяць.

#### **2.1.4. Особливості годівлі псів та котів**

Протягом років вважалося, що пси і коти за потребою в їжі дуже схожі одні на одних, але тепер стало очевидно, що в цих потребах між ними є значні розбіжності. Багато з них можуть бути обумовлені такими факторами, як число хромосом (у котячих 36 або 38 хромосом, а у псових – від 38 до 78),

анатомія зубів і черепа (у котів 30 постійних зубів, а у псів – 42), співвідношенням довжини тонкого кишечника і довжини тіла (4:1 – у котів і 6:1 – у псів) і набагато меншим співвідношенням ваги цекальної тканини відносно ваги тіла у котів. Багато з цих даних узгоджуються з тим фактом, що раціон собак вміщує більше рослинної їжі, ніж раціон котів. Дійсно, собаку слід розглядати скоріш як всеїдну тварину, ніж строго м'ясоїдну, яким є кіт. Тому в їх раціоні обов'язково має бути присутнє м'ясо. Для представників сімейства котячих протеїн (білок) є основним джерелом енергії, внаслідок чого котам необхідно більший вміст білка в їжі, ніж, наприклад, собакам. М'ясо - це не тільки протеїн, а й необхідні котам поживні речовини, такі як таурин (для серця і зору), арахідонової кислоти (для здоров'я шкіри та шерсті) і вітамін А (для шерсті та зору).

Кожна тварина індивідуальна — крім породних відмінностей, у собак і кішок різний ступінь активності, характери, і навіть обмін речовин. Тому підбір раціону необхідно робити для кожного окремого вихованця, орієнтуючись на його особливості. Також існує ряд станів, що впливають на особливості раціону.

При підборі збалансованого раціону для котів і псів слід обов'язково брати до уваги ряд взаємопов'язаних факторів, які не можна розглядати окремо. До них належить вміст поживних речовин, енергії, перетравність і смакові якості корму. Збалансованим раціоном можна вважати такий, що не допускає ні чистого приросту, ні втрати поживних речовин із організму для забезпечення стану метаболічної рівноваги. Цей раціон є джерелом всіх ключових поживних речовин, які необхідні для задоволення добових потреб самця, а також енергії, яка необхідна для забезпечення нормального перебігу життя тварини. Роль збалансованого раціону полягає в тому, що він сприяє підтримці довгого і здорового життя тварини і знижує її сприйнятливості до хвороб.

Головні компоненти корму, тобто білки, жири і вуглеводи, забезпечують тварину джерелом енергії внаслідок розщеплення в кишечнику і наступному всмоктуванні. Білки і вуглеводи виділяють приблизно однакову кількість енергії на одиницю ваги, тоді як жири звільнюють вдвічі більше енергії.

Якщо всі ключові компоненти їжі збалансовані з її енергетичним вмістом, тоді тварини, які потребують більш інтенсивної годівлі, наприклад, у період вагітності і лактації, будуть використовувати більше енергії, що призведе до більш високого використання усіх основних поживних речовин. Чотири основні групи (м'ясо і риба, молочні продукти і яйця, злаки і овочі, жири й олії) можуть забезпечити організм найбільш різноманітними речовинами в різних кількостях (табл. 1 та 2).

### **2.1.5. Методи одержання сперми від псів**

У псів сперму отримують способом мастурбації, на штучну вагіну і за допомогою електроеякуляції.

Таблиця 1. Вміст поживних речовин у готових кормах для собак і котів

Вид корму	Вологість, %	Білок, %	Жир, %	Зола, %	СНО, %	Са, %	Р, %	МЕ, МДж/100 г	БЕ, %
<b>Собаки</b>									
Вологий корм М'ясо в желе	8,3	7,0	4,5	1,5	4,0	0,3	0,2	0,32	37
М'ясні шматочки в желе	79	7	4,5	2,5	7,0	0,5	0,4	0,36	32
М'ясо в желе для цуценят	80,0	9,0	6,0	2,5	2,5	0,4	0,3	0,39	39
Напіввологий корм	21,0	17,0	8,0	8,0	45,0	1,2	1,1	122	23
Сухий корм Повноцінний	6,0	30,0	11,0	7,0	46,0	1,3	1,1	1,47	34
Змішаний бісквіт	6,0	13,0	7,5	7,0	66,5	1,3	0,5	1,44	15,0
Змішаний корм Консервований м'ясний корм для собак і бісквіт (у ваговому відно- шенні 3:1)	63,0	10,0	6,0	3,0	18,0	0,6	0,5	0,63	23,0
<b>Коти</b>									
Вологий корм М'ясо в желе	83,0	9,0	5,0	2,5	0,5	0,5	0,4	0,29	52,0
М'ясні шматочки в желе	80,0	7,5	3,5	2,5	6,5	0,5	0,4	0,34	38
М'ясо в желе для кошенят	80,0	11,0	5,5	2,0	1,5	0,3	0,2	0,36	52,0
Сухий корм Повноцінний	7,0	33,0	6,5	7,0	46,5	0,9	1,1	1,3	43

Таблиця 2. Вміст поживних речовин у готових кормах для собак і котів

Вид корму	Білок, г/100 г	Жир, г/100 г	Кальцій, г/100 г	Фосфор, г/100 г	Калій, г/100 г	Енергія, МДж/100 г
1	2	3	4	5	6	7
<b>Сире пісне м'ясо</b>						
Свинина	20,6	7,1	0,008	0,2	0,09	0,62
Яловичина	20,3	4,6	0,007	0,18	0,15	0,52
М'ясо молодого баранця	20,8	8,8	0,007	0,19	0,1	0,68
Телятина	21,1	2,7	0,008	0,26	0,36	0,48
Куряче м'ясо	20,6	4,3	0,01	0,2	0,32	0,51
Качине м'ясо	19,7	4,8	0,012	0,2	0,29	0,51
М'ясо індики	21,9	2,2	0,008	0,19	0,3	0,45
М'ясо кроля	21,9	4,0	0,022	0,22	0,36	0,52
<b>Лівер</b>						
Вим'я	11,0	15,3	0,01	0,24	0,13	0,76
Жирні легені	17,2	5,0	0,01	0,19	0,15	0,48
Легені вівці	16,9	3,2	0,01	0,20	0,19	0,40
Мозок	10,3	7,6	0,01	0,34	0,4	0,46
Шлунки свинячі	11,6	8,7	0,03	0,11	0,14	0,52

Продовження таблиці 2

1	2	3	4	5	6	7
Селезінка	17,0	6,5	0,03	0,22	0,4	0,52
Нирки (яловичі)	15,7	2,6	0,02	0,25	0,23	0,36
Серце	14,3	15,5	0,02	0,18	0,32	0,83
Серце приготоване	18,9	3,6	0,005	0,23	0,28	0,45
Печінка свіжа	21,1	7,8	0,001	0,36	0,4	0,68
Необроблений рубець	12,3	11,6	0,01	0,1	0,12	0,66
Обріз рубця	9,0	3,0	0,08	0,04	0,06	0,26

Одержання сперми – перший найістотніший захід у системі штучного осіменіння тварин, який повинен забезпечити нормальний прояв статевих рефлексів у плідника з виділенням повноцінного, незабрудненого еякуляту. Техніка його проведення повинна бути простою, легко доступною, безпечною для здоров'я псів, не викликати у них больових відчуттів. Адже Європейська конвенція з захисту домашніх тварин №125 від 13.11.87 р. регулює питання захисту кімнатних тварин і передбачає охорону їх здоров'я, захист їх від експлуатації при дресируванні, комерційному розведенні і т. і.

Усі методи отримання сперми від плідників поділяються на хірургічні, вагінальні та уретральні.

Хірургічні методи полягають у вилученні сперміїв із придатків сім'яників убитого самця або після його кастрації. Такий спосіб при штучному осіменіння собак фактично не використовують.

Піхвові методи отримання сперми полягають у збиранні сперми з піхви самки після її природного осіменіння. Сутність методу полягає у використанні губки, яку після відповідної обробки вводять у піхву самки, що перебуває у стані статевої охоти, а потім допускають коїтус з самцем. Після еякуляції губку вилучають із піхви, віджимають руками або спеціальним пресом.

Практика та спеціальні спостереження показали, що губковий метод має багато недоліків і через це майже не використовується у собак.

Уретральні методи дозволяють отримувати сперму безпосередньо з уретри самця. Ці методи є найпоширенішими. До уретральних методів відносять масаж ампул сперміопроводів, мастурбації, електроеякуляції, спермозбирача та штучної вагіни.

Всі застосовувані способи засновані на відтворенні нервових подразнень закінчень статевого члена, ампул сперміопроводів та спинного мозку плідника та отримання від нього повноцінного еякуляту.

До методів отримання сперми пред'являють такі вимоги:

- 1) отримувати весь еякулят без жодних втрат;
- 2) не знижувати кількості та життєздатність сперміїв;
- 3) гарантувати здоров'я плідників від травм та інфекційних хвороб;
- 4) технічна простота;
- 5) забезпечення асептичності одержуваної сперми.

### 2.1.5.1. Правила одержання сперми

Сперму одержують від здорових, фізіологічно зрілих племінних самців-плідників з дотриманням ветеринарно-санітарних правил та не більше трьох разів на тиждень. Еякуляти гарної якості отримують, якщо інтервал між взяттями сперми становить 2...5 діб. При тривалій сексуальній абстиненції або нерегулярному (з інтервалом 10 діб і більше) одержанні сперми в еякуляті суттєво зростає частка сперміїв з морфологічними аномаліями та різко знижується активність сперміїв. Для кріоконсервації сперму від самців-плідників отримують щотижня два еякуляти з перервою 1...2 год.

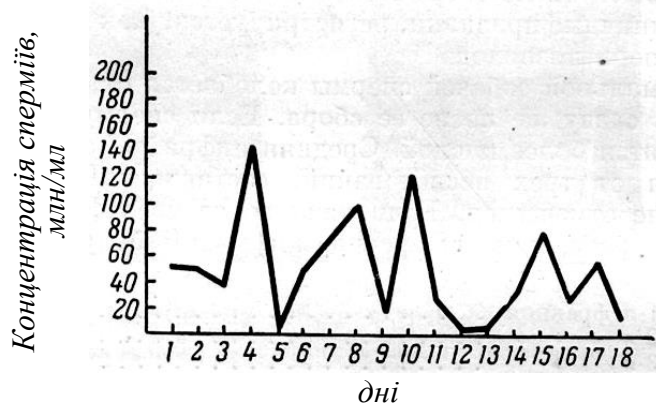


Рис. 4. Вплив частоти отримання сперми на концентрацію сперміїв

просторого приміщення та ідеальної чистоти з метою зменшення мікробної та грибкової забрудненості сперми. За 1,5-2 год до отримання сперми в приміщенні та лабораторії вмикають бактерицидні лампи.

Плідників ретельно чистять. При чищенні плідників особливу увагу звертають на нижню частину живота, область препуційного отвору, яку обмивають теплим 2%-ним розчином соди, фурациліном 1:5000. Особам, які отримують сперму від плідників, не слід бути присутніми при ветеринарно-санітарних обробках, особливо таких, що завдають тваринам біль. У примі-

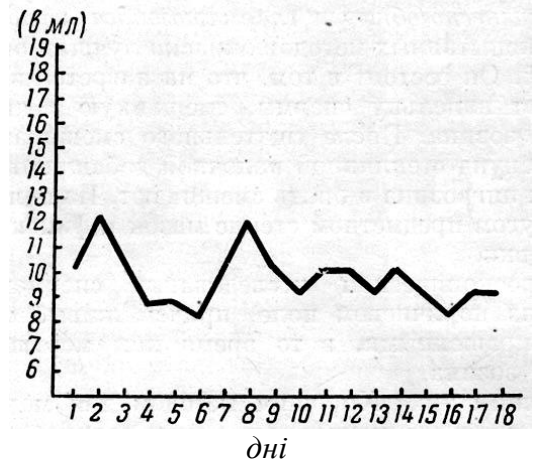


Рис. 3. Вплив частоти отримання сперми на об'єм еякуляту

Частота одержання сперми впливає на об'єм еякуляту, концентрацію сперми і активність сперміїв (рис. 3-5).

Найвищу фертильність мають самці-плідники віком від 18 місяців до 4 років. Після 4-річного віку у самців часто реєструють патологію простати (дисгормональної чи запальної природи), що призводить до суттєвого зниження запліднюючої здатності їх сперми.

Отримують сперму від плідників в умовах теплового, світлого,

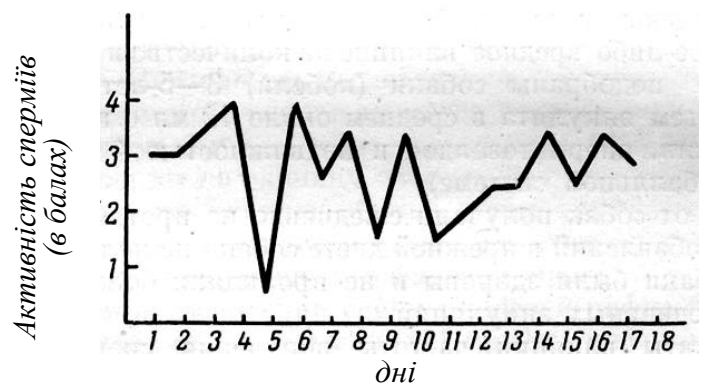


Рис. 5. Вплив частоти отримання сперми на активність сперміїв

щенні, призначеному для отримання сперми, забороняється проводити ветеринарні заходи (вакцинація, взяття крові та ін.) для запобігання утворенню умовних гальмівних рефлексів. Пліднику перед отриманням сперми необхідний вигул, що посилює прояв статевих рефлексів. Для покращення якості еякуляту перед отриманням сперми самця збуджують самкою, бажано в охоті.

### 2.1.5.2. Одержання сперми методом мастурбації

Мастурбація – подразнення голівки статевого члена тертям пальців руки через препуціальний мішок, яке викликає ерекцію, а потім і еякуляцію. Технічно цей спосіб нескладний – необхідно лише рукавички (рис. 6), лійки та пробірки (рис. 7), а також спермадобротний гель (рис. 8). Важливою умовою є присутність суки в охоті.



Рис. 6. Рукавички для одержання сперми (Minitube)



Рис. 7. Система для збирання сперми: а – лійки; б – пробірки (Minitube)

Перші декілька разів

сперму краще брати в присутності самки в охоті. Оператор (з активною правою рукою) розташовується ліворуч від самця, якому дозволяють обнюхати самку, зробити кілька садків, не допускаючи коїтус. Потім через препуціальний мішок рукою масажують статевий член. При появі ознак ерекції препуціальний мішок відводять назад і виводять назовні краніальну частину стате-

вого члена (рис. 9).

Після ерекції пес може виконувати тазом енергійні пошукові й фрикційні рухи. Після настання повної ерекції пес починає перевертатися, що відповідає фазі зклевцуння, яка повинна тривати 10-15 хв. Зклевцуння імітують також тим, що одну з тазових кінцівок піднімають на руку, котра проводить мастурбацію.



Рис. 8. Спермадобротний гель (Minitube)



Рис. 9. Одержання сперми від пса методом мастурбації

Еякуляція відбувається в три не чітко розрізнені фази (рис. 10):

- перша – прозора, опалесцююча, слабкокислої реакції, з яскраво вираженим запахом. Це не що інше, як секрет, що виділяється мускусними залозами, розташованими в уретрі, і призначений для очищення сечостатевого каналу від залишків сечі і, як правило, не містить спермійв;

- друга – напівпрозора, сіро-білого, білого або молочно-білого кольору, складається із спермійв і незначної кількості рідкого секрету зі слабкислою реакцією. За консистенцією нагадує знежирене чи розбавлене водою

молоко. При її виділення самці зазвичай здійснюють ритмічні штовхальні рухи тазом;

- третя – безкольорова і прозора, найбільша за об'ємом. Це продукт передміхурової залози, призначений для розрідження сперми. Має слабколужну реакцію і, як правило, не містить сперміїв.

Початкова і основна фази тривають короткий час і йдуть одна за другою. Перша фаза триває приблизно 20 с (13 с) від початку масажу сім'яників, і об'єм сперми становить у середньому 0,35 мл (0,1-2 мл). Друга фаза еякуляції є основною (коли власне виділяється основна сперма), триває 5-300 с (у середньому 52 с), об'єм сперми може становити 0,1-3 мл (1,17 мл). Третя фаза триває відносно довго – від 60 с до 20 хв (7 хв). Її об'єм може варіюватися в широких межах від 1,2 до 20 мл.

Для аналізу і для штучного осіменіння бажано окремо взяти концентровану сперму основної фази.

Чутливі пси еякують без затримки, незважаючи на нормальну реакцію (ерекція і відчутні скорочення уретри), частково або повністю ретроградно, тобто в напрямку сечового міхура.

Спосіб вважається менш фізіологічним, ніж отримання на штучну вагіну, однак має більш широке практичне застосування.

### 2.1.5.3. Одержання сперми за допомогою штучної вагіни

Штучна вагіна – це прилад, що імітує піхву самки певного виду тварин із відтворенням фізіологічних подразнень рецепторів головки статевого члена самця, характерних для коїтусу. Такими подразниками є: відповідна температура, відповідний тиск і слизька поверхня.

Штучні вагіни для пса були сконструйовані: Amantea, 1914 р. (грушоподібна вагіна без спермоприймача); Vonadorma, 1940 р. (циліндрична вагіна); Наггор, 1954 р. (циліндрична вагіна з ампулоподібним одностінним спермоприймачем і кулею для повітря).

Штучну вагіну для пса можна виготовити в умовах майстерні середньої оснащеності. Матеріалом для корпусу можуть бути міцний термостійкий посуд, жорстка гума, пластмаса, полімерні матеріали, легкі метали. Для внутрішньої камери використовують гумову камеру від штучної вагіни для барана (рис. 11).

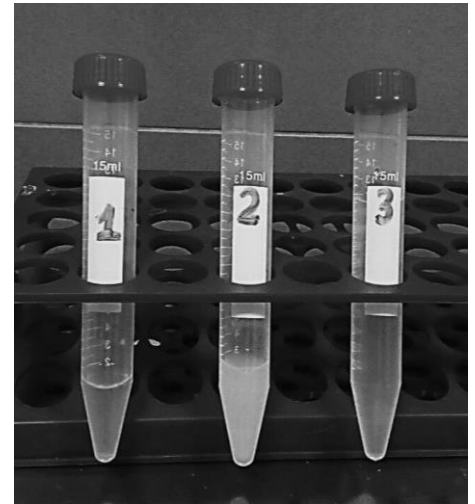


Рис. 10. Сперма пса, відібрана за фракціями (пробірка №1 – уретральна, №2 – сперматична, №3 – простатична)



Рис. 11. Штучні вагіни для одержання сперми від пса

від штучної вагіни для барана

Сперму від пса отримують за загальноприйнятою методикою. Заготовлювати сперму від псів можливо 2-3 рази протягом тижня. Попередньо внутрішню порожнину гумової камери дезінфікують тампонами, змоченими в 70 градусному спирті, а спермоприймач – кип'ятінням. Після дезінфекції гумову камеру злегка змащують стерильним розчинником. Через кран між камерою і корпусом заливають гарячу воду, а до вузького кінця вагіни приєднують спермоприймач. Температура у вагіні повинна бути 41° С, для цього в камеру заливають 250-450 мл води. Через носик крана підкачують повітря до змикання стінок гумової камери. Під час отримання сперми частина повітря може бути випущена.

Сперму від привченого пса отримують на штучну вагіну (рис. 12), бажано в присутності самки в стані охоти. Заздалегідь внутрішню порожнину препуційного мішка і волосяний покрив зовні промивають розчином фурациліну (1: 5000) і зовні просушують стерильними марлевими серветками. Під живіт підв'язують стерильний фартух з отвором для пеніса. Після декількох фрикцій пса в вагіну, настання ерекції, еякуляція всіх трьох фракцій сперми відбувається в першу хвилину. Штучну вагіну знімають з пеніса пса до закінчення ерекції, повертають вертикально, спермоприймачем вниз, щоб вся сперма поступила в спермоприймач.



**Рис. 12.** Одержання сперми від пса з використанням штучної вагіни

Далі від вагіни від'єднують спермоприймач і отриманий еякулят оцінюють макроскопічно (обсяг, колір, запах, консистенція) і мікроскопічно (густота, рухливість, концентрація, наявність патологічних сперміїв).

Штучну вагіну піддають розборці (неповній) і дезінфекції. Від'єднують кран і з камери виливають воду. Порожнину робочої гумової камери ретельно промивають 3%-ним розчином соди, просушують і промивають дистильованою водою. Корпус вагіни протирають тампонами, змоченими 0,02%-ним розчином фурациліну. Вагіну просушують і зберігають у шафі.

#### **2.1.5.4. Метод електроеякуляції**

Метод забезпечує можливість отримання сперми від самців, від яких з рефлексологічних чи інших причин неможливо отримати сперму іншими способами.

Використовують прилад для електроеякуляції – еякулятор (рис. 13). Прилад має біполярний електрод для введення в пряму кишку. Або використовують два електроди: один накладають на шийку мошонки, інший в пряму кишку. Попередньо тварині вводять невелику кількість седативних препаратів. Електричні імпульси, вироблювані електродом, впливають на соромітний і зовнішній сім'яний нерв і гладку мускулатуру статевих органів. Гладкі м'язи скорочуються, викликаючи еякуляцію. Оптимальні вихідні дані приладу: напруга 16 В, частота 50 Гц. Подають 7-8 імпульсів тривалістю 5 сек. з 10-ти сек. паузами.



Сперму збирають у пластиковий стакан, зроблений з нетоксичної пластмаси. Сперма при еякуляції надходить фракціями. Перша фракція – секрет уретри, прозорого кольору. Друга фракція – власне сперма, білого кольору, по можливості її збирають в окрему склянку. Третя фракція – секрет простати – її також збирають в окрему ємність.



Рис. 13. Прилад для електро-еякуляції – еякулятор (Minitube)

### 2.1.6. Оцінка якості сперми

В практиці штучного осіменіння дрібних тварин використовують два методи визначення запліднюючої здатності плідників – прямий і непрямий. Суть прямого методу (використовують при природному паруванні) полягає в тому, що одним самцем запліднюють групу самок, а потім враховують кількість вагітних самок та підраховують процент заплідненості. При непрямому методі (використовують тільки при штучному осіменінні) зразу визначаються якісні показники сперми, які потім співставляються з розробленими нормативними. Потім, після проведеної оцінки сперми того чи іншого плідника, осіменяють цією спермою групу самок і підраховують процент заплідненості.

Всі методи оцінки показників сперми умовно ділять на три групи: *макроскопічна* – об'єм, колір, запах, консистенція та наявність механічних домішок: *мікроскопічна оцінка* – густина, активність, концентрація, процент живих і мертвих, процент патологічних форм, живучість спермійв поза організмом: *мікробіологічна оцінка* – загальна мікробна контамінація, колі-титр, колі-індекс.

#### 2.1.6.1. Макроскопічна оцінка

Колір сперми – характерний для кожного виду тварин і залежить головним чином від концентрації у ній спермійв. Сперма пса – має колір від водянисто-сірого до молочно-білого. Червонуватий або ж буро-червоний колір сперми вказує на домішки крові, які можуть зустрічатись при частих садках чи крововиливах у статевій системі. Зеленуватий колір може бути ознакою домішок гною, а жовтуватий – сечі. Сіруватий або голубуватий відтінок сперми є також ознакою дуже низької її концентрації у спермі спермійв(олігоспермія).

Запах сперми. Нормальна сперма пса має специфічний запах. При наявності запальних гнійних процесів у сім'яниках чи додаткових статевих залозах сперма може набувати гнильного запаху, а при попаданні у сперму сечі вона має запах аміаку.

Консистенція сперми залежить від ступеня розрідження її секретами додаткових статевих залоз та концентрації спермійв. Сперма пса з високою концентрацією спермійв має консистенцію молока або розведеного молока з низькою концентрацією спермійв, буде водянистою.

Об'єм еякуляту – кількість сперми, виділеної плідником за одну садку. Він залежить від ступеня розрідження густої маси спермійів секретами додаткових статевих залоз. Для вимірювання об'єму еякуляту користуються чистими, сухими, теплими градуйованими циліндрами, мензурками, піпетками, колбами для змішування, градуйованими спермоприймачами. Об'єм еякуляту у пса залежить від його маси. У псів масою 20 кг об'єм еякуляту коливається від 1 до 22,5 мл (в середньому 5,4 мл), а у псів масою понад 20 кг об'єм еякуляту коливається від 2 до 61 мл (в середньому 12,8 мл).

### ***2.1.6.2. Мікроскопічна оцінка сперми***

Густина сперми – насичення її статевими клітинами. Цей показник, як і рухливість спермійів, має пряме відношення до запліднюваності самок. Визначення густини сперми і рухливості спермійів досліджують в роздавленій краплі за допомогою мікроскопа при збільшенні у 180-300 разів при температурі 38-40 °С.

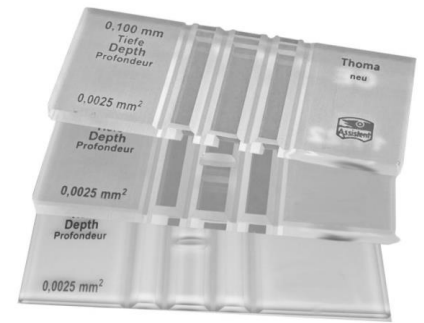
Застосовується лише при дослідженні нерозрідженої сперми. При цьому розрізняють: густу, середню та рідку сперму. В більшості еякулятів псів при їх дослідженні сперма належить до рідкої.

Активність сперми. Під активністю розуміють процентне співвідношення спермійів, які рухаються прямолінійно-поступально, зі сперміями мертвими, з маневрними та коливальними рухами. Визначають цей показник у балах. Оцінку рухомості спермійів проводять по можливості зразу ж після одержання проби. Для цього невелика крапля сперми наноситься на предметне скельце, накривається покривним і зразу ж під мікроскопом при 100-400 кратному збільшенні оцінюється відсоткова кількість рухомих спермійів в тонкому прошарку. Більша частина спермійів повинна рухатися прямолінійно-поступально (скляні предмети повинні бути чистими, завчасно прогрітими). В нормі у еякуляті вміст спермійів з прямолінійним поступальним рухом повинен становити понад 70 % (7 балів).

Концентрацію спермійів визначають у кожному еякуляті з тим, щоб знати, в скільки разів можна її розріджувати. Для цього існує декілька методів, основним серед яких є підрахунок у лічильній камері. Сперма собак з високою концентрацією повинна становити 160-600 млн спермійів в 1 мл. Але ці показники можуть змінюватись залежно від породи, окремих особливостей кожного пса, віку тварини, методу отримання сперми та інших чинників і варіює від 50 до 1758 млн (в середньому 380 млн). Пси, придатні до відтворення повинні мати мінімум 200 млн спермійів в еякуляті.

Найбільш простим є метод визначення концентрації сперми шляхом вимірювання її об'єму чи ваги. Сперму центрифугують протягом 30 хв при 4000 об./хв, визначають масу або об'єм осаду і виражають у відсотках до одиниці обсягму чи маси. Вміст клітин (П, мл) обчислюють за формулою  $P = K \times R$ , де К – вагова чи об'ємна константа для кожного виду тварин, Р – ваговий чи об'ємний відсоток осаду.

Для підрахунку сперміїв можна використовувати камери Горяєва, Бюркера та ін. (як сучасна "Thoma new" компанії Minitube – рис. 14), а також за допомогою електрофотокolorиметра, фотометра (рис. 15) та комп'ютерних спермоаналізаторів (рис. 16). Наприклад, AndroVision® є високоефективною CASA-системою для проведення стандартизованого інтерактивного аналізу сперми. Вона забезпечує як класичний автоматизований аналіз рухливості, концентрації і морфології, а й пропонує також різні опції з урахуванням флуоресцентного аналізу функціональності сперміїв. Базова система для аналізу рухливості та концентрації може бути доповнена опціональними програмними модулями.



**Рис. 14.** Лічильна камера "Thoma new"(Minitube)



**Рис. 15.** Фотометр SDM 1 (Minitube)

Відсоток живих і мертвих сперміїв визначають за допомогою мікробіологічних барвників. Метод заснований на тому, що живі спермії не сприймають фарбу, а мертві – добре забарвлюються. До краплі фарби на предметному склі додають краплю свіжої сперми, змішують краплі, роблять тонкий мазок, дають йому висохнути, під мікроскопом підраховують 500 сперміїв та виводять відсоток незабарвлених клітин. З урахуванням впливу рН, концентрації фарби та часу, за яке може відбутися фарбування клітин, слід дотримуватись однакових рецептів приготування розчинів барвників.

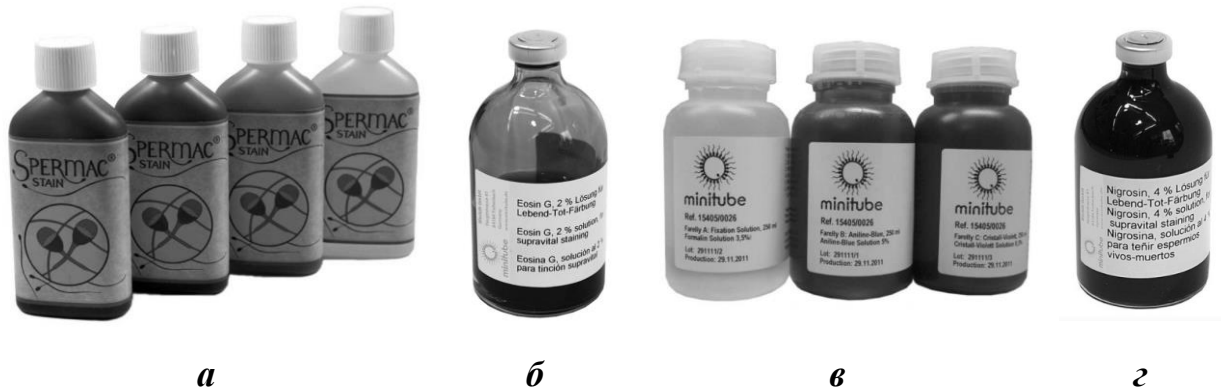
Відсоток патологічних форм сперміїв. Виявлення аномальних сперміїв є показник зниження плідності плідника. Найбільш надійним дослідженням є вивчення морфології сперміїв у пофарбовані сухі мазки під мікроскопом з імерсійною системою. Для вимірювання головок використовують окулярний гвинтовий мікрометр або роблять проекцію зображення спермію на матове скло та вимірюють до 500 сперміїв за допомогою міліметрового паперу.



**Рис. 16.** AndroVision®: CASA програмне забезпечення з ПК та монітором (Minitube)

Для зручності підрахунку розріджують сперму 1 %-м розчином натрію хлориду і роблять тоненький мазок на предметному склі, який після висушування та фіксації спиртом забарвлюють азур-еозином, метиленовою синькою чи іншими барвниками (рис. 17) і розглядають під мікроскопом та підраховують кількість нормальних і патологічних. Блом запропонував ділити спермії за їх морфологією на три види: нормальні, з первинними патологічними змінами та з вторинними змінами. У собак, які придатні до відтворення, можна спостерігати від 2,4 до 88 % вторинних змін сперміїв (у

середньому 13 %), а з первинними змінами спостерігається від 0,8-8 % сперміїв у досліджуваних препаратах.



**Рис. 17.** Барвники для морфологічного аналізу сперми (Minitube): а) Spermac; б) Eosin G; в) Farelly; г) Nigrosin

Аномалії класифікують за локалізацією:

- аномалії голівки – подвійні, конусоподібні, грушоподібні, круглі, зморщені, великі, вузькі, подовжені, зменшені, асиметричні;
- аномалії шийки – зламані шийки, безхвості голівки;
- аномалії тіла – вигнуті, розірвані, подовжені, потовщені, подвійні, ниткоподібні та рудиментарні, ненормально прикріплені до голівки;
- аномалії хвоста – звивисті, подвійні, зламані, вигнуті, закручені, зрізані.

Трапляються також потовщення акросоми. Аномальні форми виявляються зазвичай у спермі кожного плідника, але у малій кількості. Деякі порушення виникають як наслідок сперматогенезу, деякі – генетично обумовлені. Відсоток порушень збільшується у тварин із гіпоплазією сім'яників, із запальними явищами в них, при незбалансованому годівлі та високих фізичних навантаженнях.

Визначення метаболічної активності сперміїв. У практиці метаболізм частіше оцінюють за знебарвленням метиленової сині. Реакція заснована на властивості метиленової сині бути акцептором водню і втрачати свій темно-синій колір під час відновлення. У бактеріологічну пробірку вносять 0,2 мл сперми, розведеної 0,8 мл жовткового цитрату, і додають 0,1 мл розчину метиленової сині (50 мг барвника на 100 мл ізотонічного цитрату натрію), вміст змішують, покривають шаром мінерального олії завтовшки 1,25 см. Поміщають пробірку на водяну баню з температурою 46,5° С (оптимально для відновлення сині та загибелі бактерій, що потрапили в сперму). Кращі за якістю еякуляти знебарвлюють барвник за 3 хвилини та менше. На основі відновлення метиленової сині роблять оцінку окислювальних процесів (наприклад, окислення фруктози у сперміях). Дані корелюють із запліднювальною здатністю сперми.

Визначення виживання сперміїв поза організмом. При штучному осіменінні сперма зазвичай використовується після зберігання. Запліднююча здатність у своїй різних зразків сперми зберігається неоднаково. Для

визначення характеру зниження активності сперміїв протягом терміну дослідження та максимальної тривалості життя окремих сперміїв зразок сперми після стандартного розведення еякуляту залишають у холодильнику при 2-4<sup>0</sup>С і щодня визначають активність сперміїв при температурі 38-40<sup>0</sup> С до повної їхньої загибелі. Підсумовують час у годиннику, в протягом якого спостерігалася активність та активність сперміїв у балах, набувають абсолютний показник живучості.

Визначення резистентності сперміїв. Це оцінка стійкості сперміїв до розведення та зберігання при низьких температурах. В даний час майже не застосовується.

Біологічна проба сперми. Вирішальне значення для оцінки сперми має визначення запліднюючої здатності сперміїв. Встановлено, що вона може бути виявлена тільки щодо певної групи самок, що знаходяться за конкретних умов існування та часу запліднення.

Ця здатність залежить від ступеня спорідненості самки та плідника, від стану їх здоров'я, вгодованості, якості годування та ін. Поставлена біологічна проба сперми робить інші методи тільки непрямими, що лише умовно оцінюють запліднювальну здатність сперми.

Сперма вважається нормальною, якщо запліднюваність від першого запліднення становить не менше 70-75%. Самці зі зниженою запліднювальною здатністю сперми дають маложивуче потомство, їх не можна використовувати ні за штучного, ні за природного осіменіння.

Нормальні показники еякуляту наведено у табл. 3.

Таблиця 3. Основні показники сперми собак та котів

Плідник	Об'єм еякуляту в середньому, мл	Концентрація сперміїв, млрд/мл	Кількість сперміїв у всьому еякуляті, млрд	Об'єм сперміїв в еякуляті, %	Колір сперми	Консистенція сперми
Пес	10...40	до 1	до 4	1	Молочно біла	Водяниста
Кіт	0,2...0,5	до 0,5	до 0,5	0,1		

Однак у псів якісні показники еякуляту мають варіабельність залежно від фракцій (табл. 4).

Таблиця 4. Нормальні показники еякуляту псів

Фази	Об'єм в мл	Колір	Щільність (спермії/мкл)	pH	Активність, %	Патологічні форми, %
Попередня	0,2-3,0	прозорий, іноді ледь жовтуватий	відсутні або поодинокі	6,0-6,4	70-90	20
Основна	0,5-4,0	білий, від мутно-білого до молочного	2-5x10 <sup>5</sup> (1-15x10 <sup>5</sup> )	6,0-6,8		
Кінцева	2-30	ледь мутний або прозорий	поодинокі або відсутні	6,6-7,4		

Показники якості еякуляту кота наведено у табл. 5.

Таблиця 5. Показники якості еякуляту котів

Колір	Білий: висока концентрація спермійів Прозорий: низька концентрація спермійів Жовтий: контамінація сечею
Об'єм	Визначаєть з допомогою мікропробірки. Перед подальшим застосуванням об'єм може бути збільшеним додаванням буферного або ізотонічного розчину. Морфологічну оцінку спермійів проводять перед змішуванням з розчином, оскільки різниця в осмотичному тиску може збільшити різницю дефектних спермійів
Рухливість (активність)	Рухливість спермійів оцінюють за шкалою від 0 до 5. Нульовою рухливістю вважають її відсутність, за 5 вважають активне поступальне переміщення
Концентрація	Визначають з допомогою лічильної камери під мікроскопом. Загальну кількість спермійів підраховують з урахуванням об'єму і концентрації на одиницю об'єму
Відсоткове співвідношення спермійів з дефектом голівки	Забарвлений мазок (карбол-фуксин або нігрозин-еозин) досліджують під мікроскопом з 1000-кратним збільшенням. Дефектними вважають: голівку у формі "перлини", голівку, яка має звужену основу, порушення контура, недорозвинуту, відділену або вузьку голівку; а також голівку, яка має відхилення у розмірах
Інші дефекти спермійів	Мазок фіксують у формаліні і досліджують під фазово-контрастним мікроскопом при 1000-кратному збільшенні. Дефектами спермійів вважають проксимальні та дистальні вклучення, спермії без голівки, зі зміненими тілами, подвійні хвостики.
Присутність інших спермійів в еякуляті	У забарвленому мазку підраховують кількість лейкоцитів, сперматогенних клітин і дегенеративних епітеліальних клітин

У котів об'єм еякуляту складає 0,01-0,77 мл. Якщо сперму одержують з допомогою електроеякуляції, то завдяки більш інтенсивній стимуляції додаткових залоз її об'єм помітно зростає. Загальна кількість спермійів в еякуляті складає від  $3 \times 10^6$  до  $153 \times 10^6$ . Осмолярність свіжої сперми, зібраної з допомогою штучної вагіни, складає біля 320 мосм/кг і зростає при збереженні. Сперма kota має багато алкалін фосфатази, її рН коливається між 6,6 і 8,77. Вміст нормальних спермійів на рівні 60% і більше вважають нормою, менше 40% свідчить про тератоспермію.

Слід зважати на те, що спосіб одержання сперми впливає на об'єм різних фракцій еякуляту (табл. 6) та параметри якості сперми (табл. 7).

Таблиця 6 – Об'єм різних фракцій еякуляту пса, отриманого різними способами

Фракція еякуляту	Штучна вагіна		Мастурбація	
	тривалість еякуляції, с	об'єм, мл	тривалість еякуляції, с	об'єм, мл
Перша	2,7	0,9	13,5	0,1...0,3
Друга	52	2,6	54,4	0,5...4,0
Третя	480	9,2	415	1...30

Вади сперми:

- гемоспермія / уроспермія – домішка отриманого еякуляту крові / сечі;
- асперматизм – повна відсутність еякуляту при одержанні сперми;

- *олігосперматизм* – зменшення об'єму еякуляту;
- *аспермія* – відсутність в еякуляті спермійів;
- *олігоспермія* – зменшення спермійів в еякуляті;
- *тератоспермія* – збільшений вміст патологічних спермійів;
- *некроспермія* – в одержаному еякуляті всі спермії мертві;
- *астенозооспермія* – знижений відсоток спермійів з нормальною рухливістю;
- *астенотератозооспермія* – знижений відсоток спермійів з нормальною рухливістю, збільшений відсоток спермійів з морфологічними дефектами.

Таблиця 7 – Параметри сперми у котів

Параметри	Значення
Об'єм еякуляту	Штучна вагіна – у середньому від 0,034 до 0,04 мл (діапазон 0,01...0,12) За допомогою електроеякуляції – у середньому від 0,076 до 0,22 мл (діапазон 0,019...0,74 мл).
Концентрація сперми	Штучна вагіна – у середньому $1730 \times 10^6$ /мл (діапазон $96...5101 \times 10^6$ /мл) За допомогою електроеякуляції – у середньому $168...361 \times 10^6$ /мл.
Кількість спермійів в еякуляті	Штучна вагіна – у середньому $57-61 \times 10^6$ (діапазон $3...117 \times 10^6$ ) За допомогою – у середньому $12-30 \times 10^6$ ( $9...153 \times 10^6$ ).
Морфологія сперми	Велика індивідуальна варіація. У середньому від 38,2% до понад 90% нормальних спермійів. Це середнє значення відрізняється між дослідженнями, ймовірно, через різні методи фіксації та класифікації.
Рухливість (активність)	Дуже мінлива – у середньому від 56% до 84%.
pH	6.6...8.8
Осмоляльність	320...339 мОсм/кг (діапазон 274...390 мОсм/кг)
Активність лужної фосфатази	У спермі – 160 355 од/л до 480 000 од/л У передміхуровій рідині та секреті бульбоуретральних залоз – 228 до 445 од/л У рідині передміхурової залози – 281 од/л

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

Мікробіологічне характеристика сперми. В спермі самців визначають такі показники: загальна мікробна контамінація - кількість мікробних клітин в 1 мл свіжоодержаної сперми. За цим показником виділяють 5 ступенів чистоти сперми:

Стерильна – не містить мікробів:

- незначно забруднена – до 1000 мікробів;
- слабкозабруднена – до 2000 мікробів;
- середньозабруднена – до 5000 мікробів;
- сильнозабруднена – понад 5000 мікробів.

З ветеринарно-санітарних вимог до використання допускається свіжоодержана сперма самців 4-х ступенів частоти.

Колі-титр – це найменша кількість сперми, або найбільший ступінь її розрідження, в якій виявлена хоч би одна кишкова паличка (негативний

показник для нерозрідженої сперми повинен бути 0,1).

Колі-індекс – це величина, обернена колі-титру, тобто кількість кишкових паличок в одиниці об'єму (негативний показник для нерозрідженої сперми в 1 мл повинен бути 10).

У виробничих умовах якість сперми оцінюють візуально за зовнішніми ознаками, а також мікроскопічно за густиною, рухливістю та концентрацією спермій. Інші методи (біохімічні, бактеріологічні і т. п.) використовуються у наукових дослідженнях або за потреби.

## 2.1.7. Технологія роботи зі спермою

### 2.1.7.1. Розбавлення і зберігання сперми

Сперму розбавляють, щоб збільшити її об'єм для запліднення більшої кількості самок, а також щоб зберегти її запліднювальну здатність протягом усього терміну зберігання.

Зберігання сперми в зовнішньому середовищі призводить до змін складу плазми і порушення акросомного апарата спермій, що негативно впливає на життєздатність статевих клітин та їх запліднюючу здатність. Тому, чим довше не знижуються ці показники, тим більш ефективним є метод штучного осіменіння. а головне, з'являється можливість транспортування сперми на значну відстань від місця відбору сперми.



Рис. 18. Клімашафа (Minitube)

Для дрібних тварин розроблений метод короткочасного зберігання при температурі  $+16 \dots +20^{\circ}\text{C}$  та при  $+6 \dots 10^{\circ}\text{C}$ , але частіше використовується температурний режим  $+4-5^{\circ}\text{C}$ . З цією метою можна використовувати клімашафи (рис. 18), в яких за допомогою програмованого контролера може охолоджувати сперму в соломинках або інших варіантах упаковки відповідно до заданої кривої.

Використовують тільки багату сперміями фракцію сперми, вільну від простатичної рідини. Часто сперму доводиться центрифугувати, щоб відокремити простатичну рідину. Тривалість зберігання такої сперми від декількох днів до тижня, і буде залежати як від якості сперми пса, так і від використуваних розчинників – екстендерів.

Для розбавлення сперми використовують спеціальні середовища, які підтримують відповідну рівновагу мінеральних речовин та мають осмотичний тиск, що дорівнює осмотичному тиску крові собаки, забезпечують спермії речовинами для метаболічних процесів, містять захисні засоби проти токсичних продуктів метаболізму спермій, ліпопротеїди або лецитин для запобігання температурному шоку, антибактеріальні речовини для попередження розвитку патологічних мікроорганізмів.



Ступінь розведення залежить від активності та концентрації сперміїв, необхідної кількості доз та інших умов. Зазвичай сперму розбавляють у 10 (1:9) – 15 (1:14) разів.

До середовища вносяться такі компоненти:

1. Вуглеводи (глюкоза, лактоза, фруктоза, рафінозу, сахароза) або речовини-електроліти (глікокол). Сахара використовуються як живильний субстрат для метаболічних процесів, збільшують в'язкість середовища та стійкість до розвитку гнильних мікробів, виконують роль антиоксидантів, що запобігають аглютинації сперміїв, здатні затримувати чи замінювати воду. Для середовищ сперми собаки кількість цукру в середовищі має бути більшим, хоча відсоток його використання невеликий.

2. Мінеральні речовини: лимоннокислий натрій (тризаміщений, п'ятиводний), калій фосфорнокислий (однозаміщений), натрій двовуглекислий, сірчанокислий магній, натрій хлористий, калій хлористий, амоній сірчанокислий, лимонна кислота, трилон Б або хелатон, трис-буфер та ін. Найбільш сприятливі неутруйні солі з багатовалентними аніонами.

Концентрація мінеральних речовин у середовищі має бути такою, щоб забезпечити у комплексі з іншими компонентами оптимальне осмотичне тиск і рН, зменшити біохімічну активність сперміїв при температурах вище 00С та зберегти життєво важливі структури клітини. З солей готують буферні розчини з оптимальною для зберігання сперміїв рН – середньому з рН 7,7-8,0.

3. Жовток курячих яєць – не більше 1-3% у буферній суміші. Жовток, містить близько 7% неокисленого лецитину, має захисну дію.

Одночасно він є поживною речовиною, що оберігає витрачання ліпідів цитоплазми сперміїв. Яйця повинні бути обов'язково свіжими, з яскраво пофарбованим жовтком, одержані від здорових курей, яким надають повноцінні корми та достатній рух. Яйця з забрудненою шкаралупою непридатні. Перед використанням яєць шкаралупу їх необхідно опромінювати бактерицидними лампами або протирати спиртовими тампонами.

4. Гліцерин у кількості 3-10 мл на 100 мл середовища для заморожування сперми. Гліцерин замерзає при температурі -196 ° С без утворення кристалів льоду, що запобігає механічному пошкодженню сперміїв, знижує тиск на клітини. Поряд з цим спермії можуть використовувати гліцерин як джерело енергії.

5. Антимікробні речовини – сульфаніламід та антибіотики. В середовище додають пеніцилін, стрептоміцин (по 25-30 тис. ОД на 100 мл середовища), білий стрептоцид (0,12-0,14 г на 100 мл середовища) або суміш із перерахованих препаратів, що випускається за назвою «Спермосан-3». Є дані про недоцільність введення антибіотиків у сперму, оскільки вони в рекомендованих дозах не припиняють розмноження мікроорганізмів, але можуть викликати глибокі морфологічні зміни сперміїв. Біологічне та санітарна якість сперми значно покращується у середовищах із препаратом комбіспермосан-ЛАП. У ньому міститься левоміцетину сукцинат натрію – 500-700 мкг/мл, ампіциліну натрію – 1000 мкг/мл та поліміксину «М» або «В» сульфату – 1000 ОД/мл.

6. Ферменти, загусники або інші речовини (молоко). Свіже коров'яче молоко є гарним розчинником для сперми. Використовують гомогенізоване, прогріте до температури 92-98° З незбиране молоко.

Молочне середовище має велику буферність, знижує ступінь подразнення спермійв, збільшує в'язкість розведеної сперми і має рН, подібну до маткового слизу. Молоко є найбільш біологічно повноцінним середовищем для спермійв. Молочний розріджувач підвищує переживання спермійв, їх запліднювальну здатність, яка при температурі 0 С зберігається до 7 діб. Як розріджувач можна застосовувати і сухе молоко, взяте у кількості 10 г на 100 мл дистильованої води.

7. Вода дистильована використовується як універсальний розчинник при приготуванні будь-яких розбавлень.

Перед розведенням необхідно оцінити якість сперми та середовища.

Підготовлене середовище підігрівають на водяній бані до 30-35 °С. За більш високої температури жовток середовища може згорнутися. При низькій температурі спермі загинуть від температурного шоку. Тому сперма та середовище повинні мати однакову температуру. Для оцінки якості середовища на чисте предметне скло поміщають краплю перевіреної на активність сперми ній додають 2-3 краплі середовища, пробу накривають покривним склом і досліджують під мікроскопом. Свідченням непридатності є Зниження активності спермійв. У всіх випадках приготування та використання середовищ для сперми необхідно суворо керуватися чинною інструкцією зі штучного запліднення відповідного вид тварин.

На практиці для розведення та короткочасного зберігання сперми використовують готові до використання комерційні штучні середовища – Chilled semen, Cani-Plus Chill, CaniPRO™ Chill 5, CaniPRO™ та ін. (рис. 19) або трис-буферне середовище, виготовлене з окремих компонентів. До складу цього середовища входять: трис(гідроксиметил)амінометан – 6,056 г, лимонна кислота – 3,4 г, фруктоза – 2,5 г, вода бідистильована – 200 мл. Після розчинення всіх компонентів середовище стерилізують на водяному лазні протягом 10 хв з моменту закипання. Потім охолоджують до температури 35...40 °С і додають кристалічний пеніцилін (200 ОД), дигідрострептоміцин 0,2 г, а потім жовток курячого яйця у співвідношенні 1:4 (20 % від об'єму середовища).

В деяких комерційних середовищах, наприклад CaniPRO Chill 10, сперму псів можна зберігати в холодильнику при температурі 4 ... 5°С без істотно зниження її якості до 10 діб.

*Принципи та методи зберігання сперми.* З моменту отримання сперми та до внесення її в статеві шляхи самки минає час, протягом якого важливо не допустити зниження її здатності, що запліднює. Необхідно враховувати, що у тварин з маточним типом запліднення, до яких належить собака, ступінь збереження сперми відносно низька.



**Рис. 19.** Розбавник для сперми CaniPlus Chill 10 – культуральне середовище для зберігання охолодженої сперми (Minitube)

Збереження сперми поза організмом тварини та ефективне використання її можливе за дотримання наступних двох умов.

1. Сперма може зберігатись при неактивному стані сперміїв. Чим менше активність сперміїв, тим більша тривалість їх зберігання.

Зменшувати активність сперміїв вдається зниженням температури, виробництвом умов, що пригнічують обмін речовин сперміїв (кисле середовище, додавання хелатону), розведенням секретів придаткових статевих залоз розчинами, не збуджують сперміїв і не руйнують їх ліпопротеїдного покриву.

2. Запобігання інтоксикації сперміїв бактеріотоксинами та бактеріолізинами. Для цього необхідно отримувати чисту сперму і змішувати її з розріджувачами.

В даний час практично єдиним способом збереження сперми є переведення сперміїв в анабіотичний стан. Це досягається фізичним та хімічним впливом.

При зниженні температури до  $+7^{\circ}\text{C}$  спермії стають нерухомими, інтенсивність метаболізму в них знижується, але не припиняється. При температурах від  $0^{\circ}\text{C}$  до  $-5^{\circ}\text{C}$  запліднювальна здатність сперміїв зберігається кілька днів. Необхідно дотримуватися оптимальну швидкість охолодження розведеної сперми. При швидкому заморожуванні спермії можуть гинути від холодового шоку, за якого спостерігається зміна властивостей цитоплазми та плазмалемі, руйнування акросомального апарату, «крихкість» хвостика та ін. здатність повільно охолодженої сперми значно вища, ніж швидко охолодженою. З урахуванням розріджувача (жовточно-цитратний, молочний) сперму в середньому охолоджують не швидше, ніж  $0,5$  ( $0,3-0,5$ )  $^{\circ}\text{C}$  за хвилину. Застосування жовткових розріджувачів значно підвищує стійкість сперміїв до температурного шоку, але повністю не усуває його.

*Кріоконсервація* (від грец. кріо – холод і лат. conservo – зберігаю) – це низькотемпературне зберігання живих біологічних об'єктів з можливістю відновлення їх біологічних функцій після розморожування.

Великою перевагою сучасних репродуктивних технологій є те, що сперму цінного племінного пса можна консервувати і зберігати невизначено довгу кількість часу і потім використовувати в міру потреби. У зв'язку з цим отримання нащадків від давно загиблих псів вже не є рідкістю.

Кріоконсервація сперми – тривалий та трудомісткий процес. Для даної процедури собаки привозять вранці до клініки для взяття сперми, після чого лікар багато годин займається процесом її підготовки перед зануренням в азот для зберігання. Усі стадії у кріоконсервації вкрай важливі. Недотримання одного з режимів (температурного, тимчасового) та інших технологічних процесів призводить до пошкодження цілісності сперміїв, відповідно вони гинуть.

Для досягнення цієї мети необхідне дотримання трьох основних позицій:

1. Заморозка тільки якісної сперми – оцінюється морфологія сперміїв, їх рухливість і кількість, наявність ознак запальних процесів.

2. Відсутність генетично обумовлених захворювань пса, такі як, дисплазія тазостегнових суглобів, крипторхізм, гермафродитизм і

псевдогермафродитизм і деякі інші (допускаються незначні генетичні зміни, що не впливають на здоров'я майбутнього потомства за умови, що це потомство не буде використовуватися у племінних цілях).

3. Відсутність інфекційних захворювань здатних передаватися через сперму самців.

Дотримання цих позицій може забезпечуватись тільки індивідуальними програмами обстеження кожного конкретного пса репродуктора, яке розробляється додатково до стандартних обстежень перед процедурою заморожування і подальшим зберіганням.

Стандартні обстеження для всіх псів перед процедурою отримання сперми для кріоконсервації:

1. Клінічний огляд пса.
2. Дослідження статевої системи.
3. Загальний аналіз крові.
4. Дослідження на інфекційні захворювання.
5. Спермограма.

Обов'язково заводиться індивідуальна карта пацієнта, всі дослідження протоколюються. За необхідності проводяться додаткові обстеження і лікування в рамках індивідуальної програми. Це пов'язано з багатьма чинниками, які можуть бути виявлені при стандартних обстеженнях тварини:

1. Наявністю або відсутністю захворювань органів репродуктивної системи.
2. Якістю отриманого еякуляту.
3. Наявністю або відсутністю захворювань, які можуть впливати та порушувати функцію репродуктивної системи.
4. Наявністю або відсутністю інфекційних захворювань (мікоплазмоз, хламідіоз, уреаплазмоз, герпес, цитомегаловірусна інфекція, лептоспіроз).

Залежно від виявлених патологій лікар-репродуктолог приймає рішення щодо лікування та покращення стану здоров'я тварини і подальшого використання для відтворення.

Методика кріоконсервації сперми передбачає спеціальну попередню підготовку статевих клітин та зберігання їх після заморожування у рідкому азоті. Термін придатності такої сперми за дотримання відповідних умов зберігання майже не обмежений. У разі застосування такої сперми за штучного осіменіння необхідно дотримуватись відповідних ветеринарних правил роботи із статевими клітинами, які піддавались кріоконсервації.

Для розведення використовують лише другу фракцію еякулята. Після всебічної макро- та мікроскопічної оцінки еякуляту його розбавляють кріопротекторними середовищами.

На сьогодні, найвідомішим буферним розчином для кріоконсервації сперми псів вважається TRIS (гідроксиметиламінометан). Також є дані про використання знежиреного молока під час заморожування сперми та отримання результатів, близьких до таких за TRIS in vitro. Також до складу розбавників входять цукри, які підсилюють енергетичні процеси статевих клітин та підтримують осмотичний тиск і володіють кріозахисною

активністю (Dobrinski et al., 1993). Найбільш часто використовують фруктозу, глюкозу та лактозу. Глюкоза і фруктоза метаболізуються статевими клітинами, але деякі (Ponglowhapan et. al., 2014) вчені стверджують, що фруктоза працює краще та впливає позитивно на рухливість спермій після розмороження. Більшість середовищ для розбавлення сперми містить у своєму складі 10-20 % яєчного жовтка. За даними М.І. Єгорова (2001), концентрація різних поживних речовин в складі жовтка курячих яєць значно варіює залежно від стану курей та його свіжості і тому говорити про стандартний склад кріозахисного середовища не доводиться. Крім того, жовток гарне середовище для інкубування різного роду бактерій та може бути джерелом розвитку мікроорганізмів, тому статеві клітини після розмороження необхідно відмивати від нього, що, в свою чергу, спричиняє додаткові пошкодження спермії та знижує їх запліднювальну здатність. Останнім часом з'являються дані про попередні дослідження можливості заміни жовтка ліпопротейдами низької щільності (ЛПНЩ). Вчені з Лабораторії біотехнології та репродуктивної патології Національної ветеринарної школи Нанта у Франції стверджують, що 6 % ЛПНЩ можуть ефективно замінити жовток. Було експериментально підтверджено та доведено, що ЛПНЩ забезпечують кращий захист спермій у процесі заморожування та після розморожування, вищу рухливість спермій в порівнянні із середовищем, яке містить 20 % курячого жовтка та не знижують їх запліднювальну здатність. Всі кріопротектори за своєю дією поділяються на 2 групи: проникаючі і непроникаючі у клітину. До проникаючих кріопротекторів відносяться такі речовини, як гліцерин і етилен-гліцерин, вони мають здатність проникати через клітинну мембрану. Непроникаючі кріопротектори – це лактоза та протеїни, які не здатні проникнути через клітинну мембрану спермія.

За шведською технологією, або методом Упсальського університету, свіжоотриманий еякулят спочатку розбавляють трис-лимонною кислотою-фруктозо-жовтковим середовищем, що містить 3 % гліцерину, і повільно (протягом 1...2 год) охолоджують до температури 4...5 °С. Після охолодження сперму розбавляють другий раз тією ж трис-лимонною кислотою-фруктозо-жовтковим середовищем, але містить вже 7% гліцерину та 0,5% пасти Equex. Паста містить додецилсульфат натрію – поверхнево-активна речовина, що покращує збереження цілісності плазмолемі спермій у процесі охолодження та заморожування.

У клінічній практиці для розведення сперми собак застосовують також готові до використання комерційні кріопротекторні середовища – Triladyl®-Canine Freeze, CaniPRO™ Freeze A&B та ін. (рис. 20).

Наступним етапом є фасування й маркування соломинок, для чого використовують спеціальне обладнання. Наприклад, компанія Minitube виготовляє:

- MPP Uno – автоматична фасувально-закупорювальна машина для соломинок (оптимальна для обробки невеликої кількості цінних еякулятів) (рис. 21);

- EasyCoder – автоматичний принтер для соломинок 0,5 мл та 0,25 мл (термотрансферний принтер з автоматичною подачею соломинок для маркування без чорнила) (рис. 22);

- CryoSealer – пристрій для ручного закупорювання соломинок ультразвуком (забезпечує ідеальну та рівномірну герметизацію кожної соломинки) (рис. 23);



**Рис. 21.** Автоматична фасувально-закупорювальна машина для соломинок MPP Uno (Minitube)

розбавляють у співвідношенні 1:2...1:6. При низькій концентрації сперміїв еякулят центрифугують при RCF 700...1000 g протягом 5 хв. Надосадову рідину видаляють, а концентрат сперміїв розбавляють до необхідної концентрації – 100...200 млн сперміїв/мл.

Важливим етапом у технології кріоконсервації є процес еквілібрації сперми в кріозахисному



**Рис. 23.** Пристрій для ручного закупорювання соломинок ультразвуком CryoSealer (Minitube)

середовищі, у результаті чого відбувається дегідратація клітин непроникаючим кріопротектором, або ж заміщення частини внутрішньоклітинної води проникаючим. Це дозволяє клітинам виробити вищий ступінь резистентності до температурного шоку асоційованого із заморожуванням.

Розбавлену сперму охолоджують та заморожують на блоках сухого льоду у вигляді гранул об'ємом 100 мкл, або розфасовують і закупорюють промарковані пропіленові соломинки об'ємом 0,25 чи 0,5 мл і заморожують в парах рідкого азоту.



а

б

**Рис. 20.** Розбавники для заморожування сперми (Minitube): а) Equex STM – компонент розріджувача для заморожування сперми; б) CaniPlus Freeze – середовище для заморожування сперми

- пристрій для ручного закупорювання соломинок методом теплової запайки (надійна герметизація всіх видів соломинок методом теплової запайки) (рис. 24);

- пристрій для ручного закупорювання соломинок 0,5 мл кульками (рис. 25).

При високій концентрації

сперміїв еякулят

розбавляють у співвідношенні 1:2...1:6. При низькій концентрації сперміїв еякулят центрифугують при RCF 700...1000 g протягом 5 хв. Надосадову рідину видаляють, а концентрат сперміїв розбавляють до необхідної концентрації – 100...200 млн сперміїв/мл.

Важливим етапом у технології кріоконсервації є процес еквілібрації сперми в кріозахисному

середовищі, у результаті чого відбувається дегідратація клітин непроникаючим кріопротектором, або ж заміщення частини внутрішньоклітинної води проникаючим. Це дозволяє клітинам виробити вищий ступінь резистентності до температурного шоку асоційованого із заморожуванням.

Розбавлену сперму охолоджують та заморожують на блоках сухого льоду у вигляді гранул об'ємом 100 мкл, або розфасовують і закупорюють промарковані пропіленові соломинки об'ємом 0,25 чи 0,5 мл і заморожують в парах рідкого азоту.

При високій концентрації сперміїв еякулят розбавляють у співвідношенні 1:2...1:6. При низькій концентрації сперміїв еякулят центрифугують при RCF 700...1000 g протягом 5 хв. Надосадову рідину видаляють, а концентрат сперміїв розбавляють до необхідної концентрації – 100...200 млн сперміїв/мл.

Важливим етапом у технології кріоконсервації є процес еквілібрації сперми в кріозахисному середовищі, у результаті чого відбувається дегідратація клітин непроникаючим кріопротектором, або ж заміщення частини внутрішньоклітинної води проникаючим. Це дозволяє клітинам виробити вищий ступінь резистентності до температурного шоку асоційованого із заморожуванням.

Розбавлену сперму охолоджують та заморожують на блоках сухого льоду у вигляді гранул об'ємом 100 мкл, або розфасовують і закупорюють промарковані пропіленові соломинки об'ємом 0,25 чи 0,5 мл і заморожують в парах рідкого азоту.

Розбавлену сперму охолоджують та заморожують на блоках сухого льоду у вигляді гранул об'ємом 100 мкл, або розфасовують і закупорюють промарковані пропіленові соломинки об'ємом 0,25 чи 0,5 мл і заморожують в парах рідкого азоту.

Розбавлену сперму охолоджують та заморожують на блоках сухого льоду у вигляді гранул об'ємом 100 мкл, або розфасовують і закупорюють промарковані пропіленові соломинки об'ємом 0,25 чи 0,5 мл і заморожують в парах рідкого азоту.

Розбавлену сперму охолоджують та заморожують на блоках сухого льоду у вигляді гранул об'ємом 100 мкл, або розфасовують і закупорюють промарковані пропіленові соломинки об'ємом 0,25 чи 0,5 мл і заморожують в парах рідкого азоту.

Розбавлену сперму охолоджують та заморожують на блоках сухого льоду у вигляді гранул об'ємом 100 мкл, або розфасовують і закупорюють промарковані пропіленові соломинки об'ємом 0,25 чи 0,5 мл і заморожують в парах рідкого азоту.



**Рис. 22.** Автоматичний принтер для соломинок 0,5 мл та 0,25 мл EasyCoder (Minitube)

Використання поліпропіленових соломинок (пайет) дає можливість проводити їх маркування даними про породу, кличку, дату взяття сперми у пса та хто проводив цей процес.

Технологія заморожування сперми в пропіленових соломинки є основною і найбільш досконалою. Для програмного заморожування сперми в соломинках застосовують заморожувачі (рис. 26) або



**Рис. 25.** Пристрій для ручного закупорювання соломинок 0,5 мл кульками (Minitube)

більш дорогі керовані комп'ютером апарати-заморожувачі, наприклад, Ice Cube компанії Minitube (рис. 27). У малобюджетних лабораторіях соломини зі спермою заморожують вручну: на спеціальному пристрої якому лоток із заправленими та закупореними соломинками витримують у кількох сантиметрах над рівнем рідкого азоту.

Після заморожування гранули сперми збирають у промарковані кріопробірки об'ємом 1...2 мл, які також, як і соломинки з кріоконсервованою спермою, поміщають в каністри і переносять до посудини Дьюара, де зберігають у рідкому азоті при температурі  $-196^{\circ}\text{C}$ .

Компанія Minitube випускає кріопосудини об'ємом 2,2 л; 3,6 л; 5 л; 8,4 л; 11 л; 20,5 л; 33 л; 36 л; 36,5 л, 39 л та 47,7 л для зберігання сперми і (рис. 28).

Подальше зберігання такої сперми в посудині Дьюара дає можливість статевим клітинам зберігати їх біологічну повноцінність впродовж багатьох років. Заморожена сперма може



**Рис. 27.** Автоматичний заморожувач IceCube 14S-A (Minitube)

зберігатися досить довго, але точний період збереження життєздатності спермійв ще не з'ясовано. На сьогодні максимальний термін зберігання сперми псів, після розморожування якої було здійснено успішне запліднення, становив 8 років. У медицині гуманній найдовш відомий термін кріоконсервації спермійв, використання яких призвело до здорової вагітності, становить 21 рік.

Через деякий час проводиться контрольне розморожування однієї гранули або однієї соломинки з партії для оцінки якості сперми після процедури розморожування. З якості сперми проводиться складання сертифікату на сперму, де пишеться, скі-



**Рис. 24.** Пристрій для ручного закупорювання соломинок методом теплової запайки (Minitube)



**Рис. 26.** Заморожувач на 20 соломинок 0,5 мл та 0,25 мл (Minitube)

льки доз для штучного запліднення вийшло.



**Рис. 28.** Кріопосудини для зберігання та транспортування сперми (Minitube): а) MVE SC 3/3, SC 8/5, SC 11/7, SC 20/20, SC 33/26, SC 36/32; б) MVE ET 2, 3, 5, 7, 20, 35, 40, 40-6, 47-10

### 2.1.7.2. Банк сперми

Організація банків біоматеріалу, у тому числі банків сперми, дозволяє зберігати біоматеріал десятиліттями без втрати якості та життєздатності. Якщо розглядати собаківництво, то банк сперми собак допомагає зберігати сперму цінних плідників і представників породи, і використовувати її для запліднення та отримання потомства навіть тоді, коли плідник через вік втрачає фертильність, або через десятиліття, коли плідника вже немає в живих. Але крім зберігання є другий величезний плюс — заморожена сперма може бути перевезена до будь-якої точки світу та використана для запліднення. Транспортування замороженої сперми допомагає позбавити необхідності їхати на в'язку. У разі транспортування сперми собак заморожена сперма не єдина форма матеріалу, придатна для перевезень. Другий варіант - приготування та пересилання охолодженої сперми. Охолоджена сперма, на відміну від замороженої, зберігається до 7-10 діб, тому такий матеріал збирається та готується безпосередньо перед відправкою та напередодні запліднення.

Спермобанк – це ізольоване приміщення в клініці, де знаходяться спеціальні посудини з рідким азотом (посудини Дьюара) (рис. 29). Подібні посудини мають пристрій, схожий на термос. Температура рідкого азоту  $-196$  ( $195,8$ )<sup>0</sup>С. Така низька температура дозволяє дуже довго зберігати біоматеріал у незмінному вигляді. А це означає, що сперма, занурена для зберігання рідкого азоту, зберігається десятиліттями, не втрачаючи своєї якості.

Азот у судинах повільно та постійно випаровується, тому за певним графіком проводиться контроль його рівня та частки при необхідності.





**Рис. 29.** Кріобанк та посудини Дьюара різних модифікацій (стаціонарні для зберігання та транспортні)

Усередині кожної посудини є спеціальні металеві ліфти. Ці ліфти поміщають індивідуальні ємності для зберігання – гоблети або пластикові склянки, які обов'язково маркуються унікальними ідентифікаційними даними. У ємності міститься біоматеріал від конкретного плідника. Сперма може бути заморожена в строзах – соломинах різного об'єму, пелетах і т.д. Плюс подібної техніки в тому, що кожна соломина також підлягає маркуванню унікальними ідентифікаційними даними. Подальша робота з такою спермою – розморожування, перекладання, підготовка до транспортування – значно зручніша.



**Рис. 30.** Кріопосудини великого об'єму MVE Vapor XC 20 (Millennium), 21/6, 22/5, 32/8, 33/22, 34/18, 43/28, 47/11-6, 47/11-10 компанії Minitube

Компанія Minitube виготовляє кріопосудини великого об'єму (20,5 л; 21 л; 22,4 л; 32 л; 33,4 л; 34,8 л; 42,2 л та 47,4 л) для зберігання сперми (рис. 30).

Азот має властивість постійного повільного випаровування, тому періодично рівень азоту перевіряється та виробляється його доливання. У сучасних посудинах є термодатчики, які контролюють рівень азоту. Коли відбувається зниження рівня, вони включають звуковий сигнал.

Усередині кожної посудини на спеціальному утримувачі розташовані пронумеровані ємності для зберігання, куди розміщуються промарковані зразки сперми. Розроблена таким чином організація зберігання біоматеріалу дозволяє точно знати де знаходиться сперма конкретного плідника.

### **2.1.7.3. Транспортування сперми**

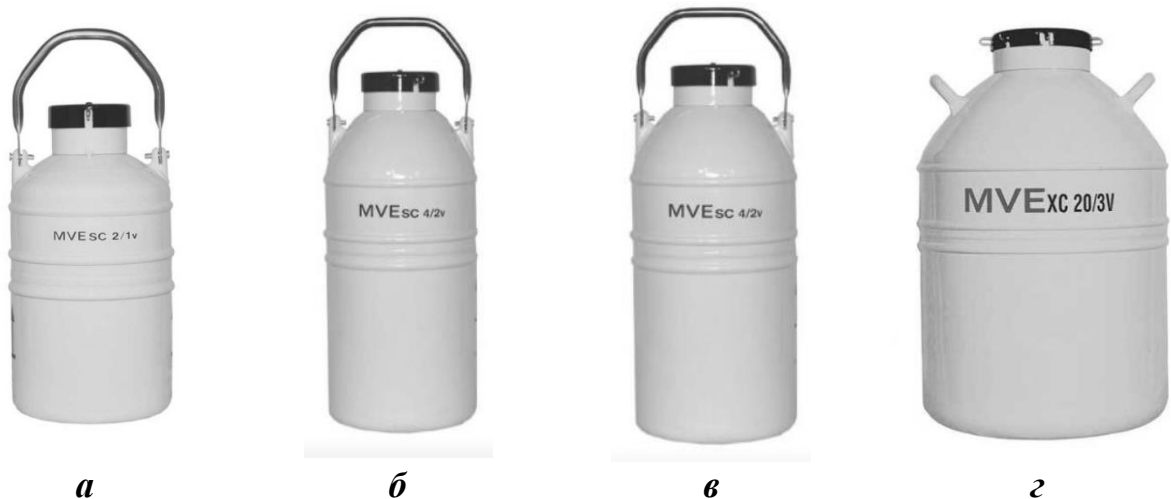
Сперму за короткочасного зберігання можна транспортувати в скляних колбах чи банках або в поліетиленових флаконах. Для цієї мети використовують дерев'яні термоси з поролоневими гніздами, або ж побутові

сумки-холодильники. Колби або флакони зі спермою закривають герметично кришками, корками чи поліетиленовою плівкою і закріплюють гумовими кільцями.

Компанія Minitube для транспортування охолодженої сперми пропонує транспортувальні бокси (рис. 31).



**Рис. 31.** Транспортувальні бокси Minitube: а) з волокна; б) з високоізолюючого неопору; в) з пінопласту



**Рис. 32.** Кріопосудини для транспортування сперми (Minitube): а) MVE Vapor Shipper SC 2/1 V, SC 4/2 V, XC20/3V; б) MVE Vapor Shipper SC 4/2 V; в) MVE Vapor Shipper SC 4/3 V; г) MVE Vapor Shipper XC20/3V

Транспортування кріоконсервованої сперми можливе у двох випадках: наземним транспортом у рідкому азоті (у посудинах Дьюара невеликого обсягу (1,5 л; 2,2 л; 3,6 л; 4,3 л; 5 л; 6,2 л; 8,4 л; 20,5 л; 36 л; 39 л; 47,7 л) – рис. 32) чи парах азоту, у спеціальних драйшипперах. Транспортування сперми авіаційним транспортом дозволено лише парах азоту, в драйшипперах (dry-shipper) (рис. 33). Такі контейнери мають спеціальне маркування на зовнішній стороні (знак літака).

Важливо, щоб у приймаючої сторони теж були контейнери для зберігання сперми (банк сперми), так як транспортні контейнери здатні підтримувати низьку температуру лише кілька днів.

Основними факторами, які негативно впливають на сперму під час транспортування, є: різкі струси, падіння холодильників-термостатів, температура та токсичність матеріалу, з якого виготовлені ємкості (скло, поліетилен та ін.). Уникнення вище перерахованих факторів значно підвищує запліднюючу здатність сперми самців.

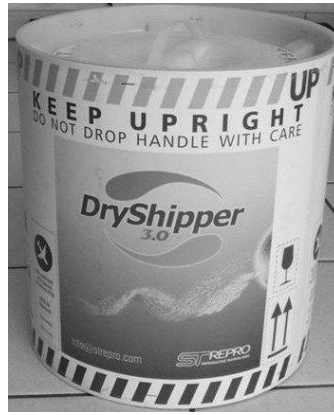


Рис. 33. Драйшиппер (dry-shipper)

#### ***2.1.7.4. Особливості використання свіжоодержаної та замороженої сперми***

Як зазначалося, для штучного осіменіння сук використовують свіжоодержану, охолоджену чи заморожену сперму. У європейських країнах приблизно у 50-55% випадках використовується свіжоодержана сперма, у 10% – охолоджена, у 35-40% – кріоконсервована. Існують особливості використання, зберігання та транспортування кожного виду сперми.

##### *Свіжоотримана сперма*

Використовується одразу після оцінки її якості. Вважається, що сперма хорошої якості, якщо частка активних сперміїв із нормальною морфологією становить щонайменше 75%. При осіменінні самки вводять весь еякулят або його частину (другу фракцію – сперматичну) з кількістю сперміїв у дозі від 200 до 1200 млн. Виняток із цього правила становлять собаки мініатюрних порід, у яких сумарна кількість сперміїв в еякуляті може складати 50...100 млн.

При використанні для запліднення частини еякуляту кількість активних сперміїв у спермодозі має бути не менше 150...200 млн. Виживання сперміїв у статевих шляхах самок після осіменіння свіжоотриманою спермою практично однакова і становить 4...6 діб, а здатність до запліднення – близько 2 діб. Враховуючи, що овуляція у собак відбувається не одномоментно, а протягом 2 діб, рекомендується друга «контрольна» в'язка або штучне осіменіння через 24-48 год, щоб спермії зустріли максимальну кількість яйцеклітин, тим самим підвищуючи можливу кількість цуценят у посліді.

##### *Охолоджена сперма*

Охолоджену сперму використовують після короткочасного зберігання за температури +4-5°C. Це найчастіші ситуації, коли необхідно переслати сперму в інше місто чи країну, або пес їде на виставку або ще з якихось причин не може приїхати на в'язку.

Транспортують сперму в термосах-оходжувачах різної конструкції. Безпосередньо перед заплідненням оцінюють активність охолодженої сперми. Наприклад, контейнери фірми Minitube (рис. 34) здатні забезпечити необхідну температуру протягом 48 годин.

Для осіменіння її використовують як у охолодженому виді, так і підігрітій на водяній бані до 37 °С.

Перед осіменінням охолоджена сперма проходить оцінку на якість (відсоткова кількість рухливих спермійв).

При осіменінні охолодженою спермою в перші 28-42 години показник виживання спермійв становить 24-72 години.

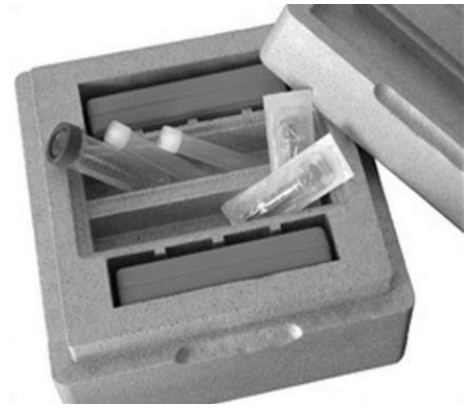
Всі матеріали, використувані для забору і приготування сперми, повинні бути несперміцидними!

При заплідненні охолодженої спермою можна використовувати всі способи осіменіння, але необхідно брати до уваги, що така сперма вже не володіє такою життєздатністю як свіжа, в статевому тракті виживає приблизно 24-72 год, тому обов'язково потрібно визначення сприятливого періоду для в'язки, тобто визначення моменту овуляції.

### *Кріоконсервована сперма*

Перед осіменінням суки сперму деконсервують (розморозжують, відтаюють). Для деконсервації сперми компанія Minitube розробила розморозжувач MT30/54 на 35°C (95°F), 37°C (98,6°F), 38°C (100,4°F), 50°C (122°F) (рис. 35).

Сперму, заморожену у вигляді гранул, розморозжують підігрітому до 37 °С ізотонічному розчині цитрату (3,0 %) або хлориду (0,9 %) натрію або у комерційному розчині-розморозжувачі, наприклад, CaniPlus AI фірми Minitube (рис. 36). Для розморозжування соломинок існує два способи— швидке або повільне. Швидке розморозжування полягає в тому, що соломинка чи гранула зі спермою поміщається на водяну баню за температури 79 °С протягом 8 с, а повільне – за температури 37 °С протягом 30 с.



**Рис. 34.** Контейнери для транспортування охолодженої сперми фірми Minitube



**Рис. 35.** Розморозжувач Minitube MT30/54

Квичко І.Л. у своїй роботі стверджує, що відтаювання сперми собак за підвищених температурах (60-80 °С) сприяє кращій активності спермій та підвищує їх виживаність. Але використання такої сперми для осіменіння сук впливає на їх заплідненість та накладає відбиток на всю технологію кріоконсервації, включаючи якість отриманого еякуляту, склад синтетичного середовища для розбавлення, спосіб розмороження, кількість і біологічно повноцінних спермій в дозі після розмороження, оптимальний час осіменіння, техніку осіменіння і місце введення сперми в статеві шляхи суки. Оскільки в процесі заморожування та розморожування може руйнуватись до 50 % статевих клітин, то спермо-дозу рекомендують вводити безпосередньо в матку, що забезпечує близько 70 % заплідненості сук.

Після відтавання соломинки просушують, кінчики обрізають, їх вміст виливають у пробірку-контейнер та набирають у шприц для проведення штучного запліднення. Залежно від способу введення та якості сперми, що використовується, для запліднення самок використовують 2...4 і більше соломинок.

Активність спермій після розморожування має становити щонайменше 50 %.

Кріоконсервація негативно впливає на активність спермій та їх переживання у геніталіях самки. Після процедури заморожування та відтавання активність спермій знижується на 20 ... 50%, а їх виживання у статевих шляхах самок скорочується до 12...24 год.

При використанні для штучного запліднення собак заморожено-відтаої сперми дуже важливо правильно вибрати час проведення запліднення.

Після розморожування необхідно її використовувати без зволікання, тому потрібне точне визначення моменту овуляції і сперма вводиться в найсприятливіший момент.

**Використовується тільки внутрішньоматкове введення сперми!**

Доза для штучного осіменіння – об'єм сперми, в якому має бути при відтаванні достатня кількість рухливих спермій для запліднення суки. Для мініатюрних і дрібних порід це не менше 100 млн., для середніх порід – 150-200 млн., для великих і гігантських порід – не менше 250 млн. добре рухливих спермій.

Часто, пересилання сперми є найбільш складним моментом при використанні штучного осіменіння. Пересилання здійснюється протягом 1-2 днів. Тільки необхідно мати на увазі, що компанії не здійснюють перевезення по вихідних і святкових днях. Тобто, якщо штучне осіменіння планується в п'ятницю, суботу, неділю або понеділок, то сперма повинна бути відправлена в четвер - при доставці в 1 день або в середу - при доставці 2 день.



**Рис. 36.** Розбавник для розморожування сперми CaniPlus AI (Minitube)

### 2.1.8. Визначення оптимального часу осіменіння сук

Запліднення може відбутися за наявності певних умов:

1. Настання овуляції.
2. Досягнення яйцеклітиною фертильності (здатності до запліднення).
3. Наявність сперміїв, здатних до запліднення.

Дозрівання яйцеклітини у сук триває до 48 годин, тому якщо спермії потрапили в яйцепроводи раніше, запліднення може не наступити або вагітність буде небагатоплідною, оскільки частина сперміїв може загинути або втратити свої властивості до запліднення. Те ж саме відбувається при спробі осіменіння, з яким запізнилися.

Власнику тварини обов'язково необхідно вдаватися до визначення оптимального часу осіменіння коли:

- штучне осіменіння суки проводять свіжоотриманою, або кріоконсервованою спермою;
- сука у стані тічки, але не проявляє рефлексів статевого потягу та нерухомості;
- попередні парування безрезультатні;
- парування відбувалось природним методом високопородним псом, спермою низької якості; можливе тільки одне парування у зв'язку з фінансовою неспроможністю власника суки на декілька повторних парувань;
- велика відстань від суки до пса-репродуктора та не має можливості утримувати їх разом декілька днів;
- необхідне визначення лабораторними методами оптимального часу запліднення суки з наступним прогнозуванням дня родів.

Одним із найбільш доступних методів є *клінічний огляд*. На стадії збудження статевого циклу підвищується кров'яний тиск, змінюється склад крові, в органах статевої системи посилюються проліферативні процеси, викликані зміною нейрогуморального статусу організму. Статеве збудження (феномен) у більшості випадків співпадає з феноменом тічки (пустовки). Статеве збудження характеризується занепокоєнням, грайливістю, злобою, послабленням нюху у мисливських і службових собак, відмовою від корму, збільшенням молочних залоз, почервонінням слизової оболонки присінку піхви, виділенням зі статевої щілини слизу, який має особливий специфічний запах, що дає псу змогу відчувати його на значній відстані. У деяких сук внаслідок сильної гіперемії та набрякості слизової оболонки піхви із вульви у вигляді півмісячного або кулеподібного утворення виступає набряклий сечостатевий клапан. Набряк слизової оболонки із закінченням охоти зменшується, а з часом і повністю зникає.

Передтічка (проєструс) – тривалість даної фази становить у середньому 9 (3-16) діб. У цей час ростуть і зріють у яєчниках фолікули, в яких інтенсивно синтезуються естрогени (фолікулін), під впливом яких виникають і проявляються характерні зміни в органах статевої системи та в поведінці суки: збільшення статевої петлі (вульви), кров'яністі виділення з неї, часте сечовиді-

лення, облизування вульви, неслухняність суки, загравання з псами, але відсутній рефлекс «нерухомості» (до спарювання не підпускає).

Еструс (тічка) – тривалість даної фази становить у середньому 6 (3-12) діб, коли тварина готова до спарювання (позитивний рефлекс «нерухомості»). У цей час петля збільшена, але менш соковита, виділення з неї світло-рожеві або безколірні. Усі дозрілі фолікули овулюють протягом 12–24 годин, але овуляція у сук супроводжується виходом недозрілих яйцеклітин, які стають здатними до запліднення лише через 3 доби перебування в яйцепроводі, а потім зберігають її впродовж однієї доби. Спермії пса, які надходять в органи статеві системи суки, зберігають запліднюючу здатність до семи діб, що і є критерієм більшості випадків або оптимальним часом для спарювання (в'язки), тобто це фактично на 2-4-у добу від прояву феномена охоти. Враховуючи можливість коливання строків початку овуляції, суку в'язуть двічі, з інтервалом у 48 годин. Прийняття самця чи контрольного пробника та прояв рефлексу відведення хвоста не можуть бути основними ознаками овуляції. Деякі суки, наприклад, допускали в'язку вже з початку проеструсу, хоча овуляція наступала лише через 30 діб. Таким чином, поведінка багатьох сук слабо співпадає із гормональним фоном, що сприяє заплідненню. Чимало сук вступає у в'язку під час несправжньої вагітності, при інфекційному запаленні сечових шляхів чи за наявності кіст яєчників, із проявом німфоманії.

Отже, клінічне дослідження сук не завжди може давати 100 % гарантії настання овуляції у них. Доцільніше керуватися інструментальними та лабораторними методами визначення овуляції. Найпоширенішими з них є: зміни базальної температури, УЗД-діагностика, ендоскопія піхви, зміни електричного опору слизової оболонки піхви, вимірювання глюкози в піхвових виділеннях, кристалізація піхвового слизу, піхвова цитологія, зміна концентрації гормонів.

*Метод вимірювання концентрації глюкози у піхвових виділеннях під час тічки.* Вміст цукрів у цервікальному слизі має вагоме значення для створення умов виживання та запліднювальної здатності сперміїв. За нестачі цукрів і надлишку хлоридів, а також вільних іонів кальцію, знижується від'ємний електричний заряд і настає їх аглютинація. Інших літературних даних і підтверджень науковими дослідженнями ми не знайшли. Цей метод не набув широкого практичного застосування, – його використовують лише окремі заводчики для визначення оптимального часу осіменіння сук. Філоненко А.І. вважає, що підвищення температури під час тічки проявляється лише у 27 % тварин, а тому діагностична цінність цього методу є досить низькою і може використовуватися лише як допоміжний метод.

Допомогти встановити оптимальний час в'язки може також метод *кристалізації піхвового слизу*, зібраного з передньої частини піхви, однак, із нашого погляду, цей метод досить суб'єктивний і фізіологічно недосконалий, на що вказує можливість кристалізації слизу під час ановуляторних статевих циклів та при кістах яєчників. Висихаючи на предметному склі, слиз формує малянок у вигляді листка папороті, що збігається з фолікулярною фазою та овуляцією, після чого він стає розмазаним, а пізніше взагалі зникає, що хара-

ктеризує лютеїнову фазу статевого циклу. Максимальний ступінь кристалізації піхвового слизу у сук спостерігається, в середньому, за 2-3 доби до предовуляторного піку лютеїнізуючого гормону.

Розрізняють 3 типи висухлої слини після кристалізації (рис. 37):

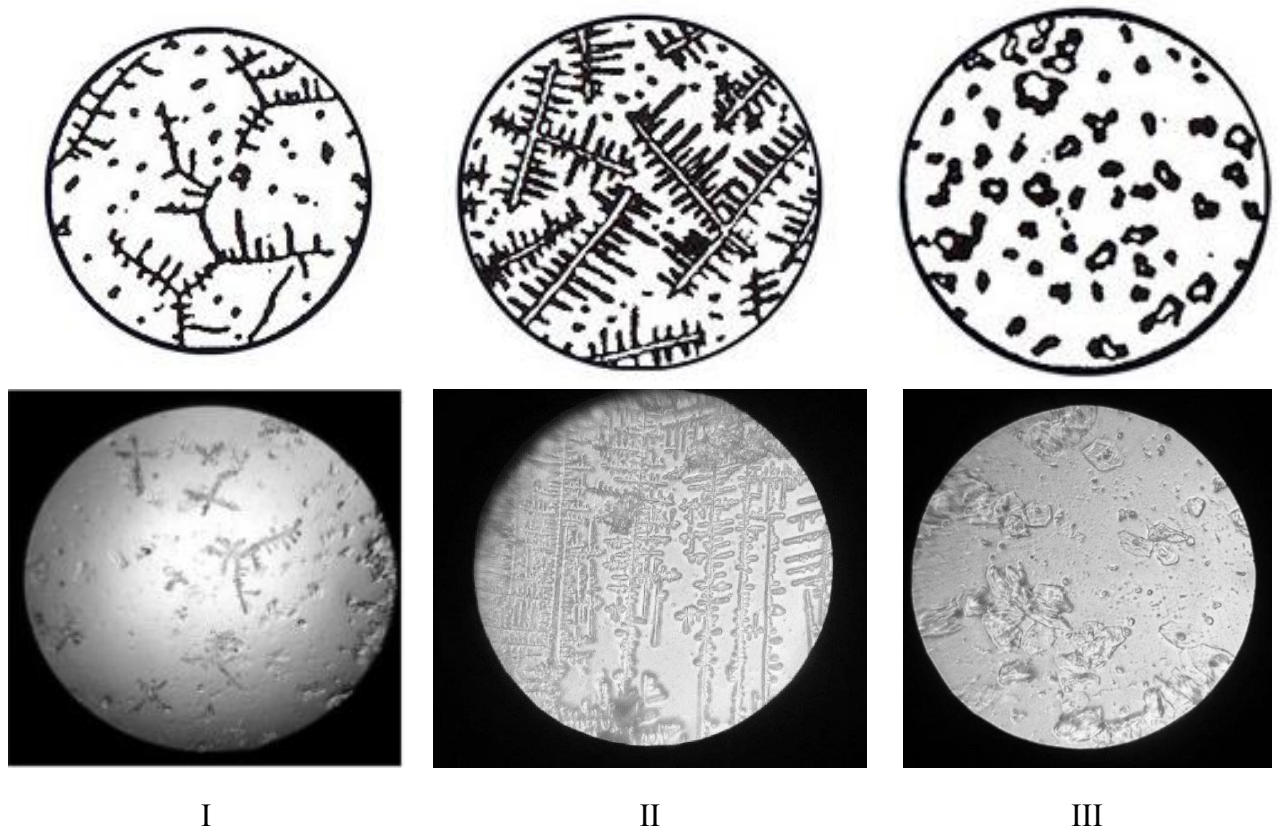


Рис. 37. Типи висухлої слини після кристалізації

I тип – дрібні кристали у вигляді тонких стеблів / велика кількість сформованих кристалів «гілочок». Запліднення вірогідне (стадія проеструсу з незначною / помірною секрецією естрогенів);

II тип – листя папороті, кристали з товстим стеблом. Вірогідність запліднення максимальна (стадія еструсу з максимальною продукцією естрогенів);

III тип – обриси піску чи гальки, кристалів немає. Запліднення маловірогідне (стадія мет- / діеструсу). Цей метод у собаківництві може бути корисним для визначення оптимального часу осіменіння сук у поєднанні з іншими.

*Вагінальна (вагінальна) цитологія (цитологія піхвових мазків)* – цитологічна діагностика клітинного складу зі слизової оболонки піхви. Це спосіб, що дозволяє оцінити зміну морфології (зовнішнього вигляду) епітеліальних клітин піхви під дією естрадіолу, що залишається практичним, простим і недорогим методом визначення оптимального часу осіменіння сук.

На гістологічну будову епітелію впливають гормони. Підвищений рівень естрогенів у крові сук викликає потовщення слизової оболонки піхви та збільшення кількості шарів клітин. У нормі в мазку виділень піхви можна знайти клітини покривного багат шарового плоского епітелію піхви і піхвової частини шийки матки, які належать до поверхневого й проміжного шарів, вста-



новлюють відсоткове співвідношення зазначених клітин слизової оболонки піхви, а також фазу циклу та приблизний час в'язки. Поява клітин базального шару спостерігається за патологічних процесів у статевих органах.

У мазках на початку фази проєструсу переважають проміжні клітини (деякі з яких кератинізовані). Спостерігається значна кількість еритроцитів; лейкоцити відсутні. У перші дві доби в мазках знаходять також поверхневі та парабазальні клітини, незначну кількість лейкоцитів. У середині фази проєструсу продовжує зростати кількість некератинізованих проміжних клітин, більшість із яких мають пікнотичні ядра. У кінці фази проєструсу зменшується кількість проміжних клітин, спостерігається збільшення поверхневих, характерна поява клітин, які не мають ядер. Із настанням фази тічки в крові різко підвищується рівень гормону естрадіолу, що призводить до збільшення кількості повністю ороговілих та кератинізованих епітеліальних клітин. Оптимальним строком для в'язки слід вважати той день, коли в препараті піхвового мазка поверхневі клітини майже на 80–90 % без'ядерні (рис. 38).

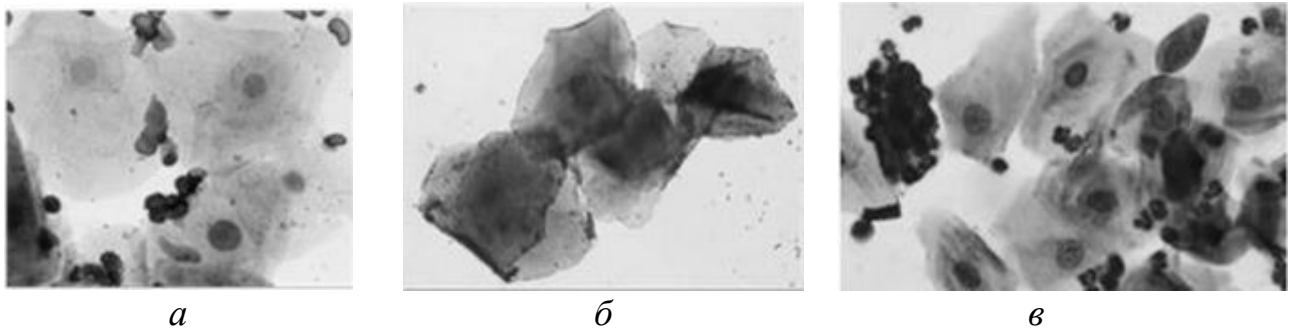


Рис. 38. Картина піхвового мазка на різних стадіях статевого циклу: а) проєструс; б) еструс; в) дієструс

Але проблема методу у тому, що він оцінює лише відповідь тканин на вплив естрадіолу. У різних сук відповідь епітелію слизової може відрізнятися. Як правило, настання охоти у більшості самок (близько 60-65%) збігається з настанням картини еструсу в мазку і зазвичай спостерігається за 2 дні до овуляції. Але, на жаль, така зручна закономірність не в усіх. У деяких сук картина еструсу в мазку видно пізніше овуляції, і при стандартних розрахунках можна запізнитися. У деяких картина еструсу спостерігається задовго до овуляції, і в'язка може статися зарано. Крім цього, одноразове дослідження не дозволяє робити прогнози.

Точність визначення оптимального періоду для осіменіння за допомогою вагінальної цитології становить близько 65%. Інші 30-40% самок вимагають більш точних методів визначення фертильного періоду. Тому, коли інтерпретація мазків викликає сумніви чи отримані результати аналізу не співпадають із клінічною картиною, коли суку треба везти в інше місто, а інколи і державу, для проведення в'язки чи штучного запліднення, власник у змозі доповнити цей аналіз більш надійним методом, а саме – кількісним встановленням рівня прогестерону в крові.

*Визначення концентрації прогестерону в плазмі крові.* Прогестерон (P4) представляє собою індикатор овуляції у сук. У сук, на відміну самок інших ссавців, прогестерон починає підніматися ще до овуляції. Пов'язано це з тим, що зрілий передовуляторний фолікул у стінці вже має клітини, синтезують цей гормон. Рівень прогестерону у сук під час тічки піднімається по-різному як до, так і після овуляції. До овуляції може підніматися в одних дуже повільно і плавно, в інших тривалий час залишатися низьким і потім активно почати рости. Але в день овуляції він дорівнює в середньому 6-8 (5-10) нг/мл у всіх собак незалежно від розміру та породи. Деякий розкид в овуляторних цифрах більше залежить від особливостей лабораторій, в яких проводиться аналіз, а не від особливостей організму собак.

Кров для аналізу беруть багаторазово (через день, починаючи з 8-го дня тічки) або одноразово (при настанні статевої охоти). Концентрацію прогестерону в плазмі периферичної крові визначають радіоімунологічним або ферментоімунологічним методом. Час осіменіння встановлюють на підставі ретроспективного аналізу результатів вимірювання концентрації прогестерону у плазмі. У більшості самок овуляція настає при концентрації прогестерону в плазмі крові 2...4 нг/мл, у деяких – 6...8 нг / мл. Оптимальний час для осіменіння сук – 2...5-а доба після овуляції, коли концентрація прогестерону досягає 10...20 нг/мл або 30...60 нмоль / л (1 нг = 3.14 нмоль).

Є кілька способів визначення рівня прогестерону: стаціонарні аналізатори та напівкількісні тести. Гормональні аналізатори діляться на більш високоточні, які виконують дослідження шляхом імунофлюоресценції в автоматичному режимі, і менш точні та операторзалежні, що працюють на основі методики імуноферментного аналізу. Для планування в'язки дуже важливо використовувати високоточні прилади та методики (наприклад, гормональний аналізатор TOSOH AIA-360 – рис. 39), оскільки через похибки у вимірюванні можна отримати невірний результат.

Цей метод дозволяє виявити період овуляції із точністю до 85%.

*Ультразвукове дослідження яєчників* не можна назвати у чистому вигляді способом визначення овуляції. Але дослідження може стати добрим помічником в умілих руках. При ультразвуковому дослідженні можна спостерігати ріст фолікулів у яєчнику на початку тічки. У момент овуляції фолікули "схлопуються", а навколо яєчника з'являється вільна рідина. Після овуляції формуються жовті тіла вагітності.

Для проведення ультразвукового дослідження необхідна наявність апарата для дослідження із високочастотним трансдуктором 7,5-15,0 мГц. Сканування починають із області сечового міхура – акустичне вікно, обов'язкове дослідження обох рогів, якщо вони незмінні. У стадію проєструсу роги матки являють собою трубчасті органи, просвіт яких не візуалізується, ендометрій нормехогенний. Товщина стінки 0,3-0,5 см, ендометрію – 0,2-0,3 мм



Рис. 39. Гормональний аналізатор TOSOH AIA-360

(рис. 40а). Яєчники мають овальну форму, нормехогенну негомогенну із гіпоехогенними множинними круглими формуваннями (0,1-0,3 см) структуру, розмір 0,8-1,8 см.

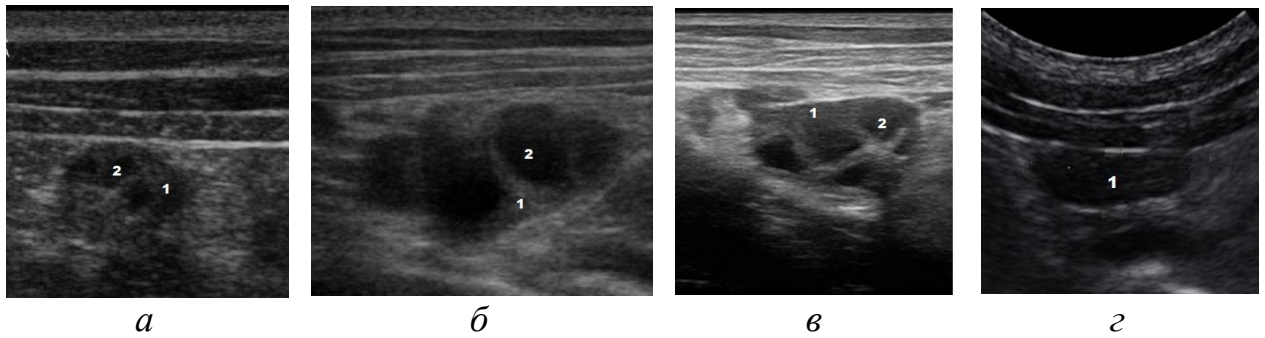


Рис. 40. Сонограма яєчника у стадію: а) проєструсу (1 – паренхіма яєчника, 2 – фолікул); еструсу (1 – паренхіма яєчника, 2 – фолікул); в) метеструсу (1 – паренхіма яєчника, 2 – жовте тіло); г) анеструсу (1 – яєчник)

У стадію еструсу ендометрій потовщується до 0,5-0,8 см, просвіт рогів матки стає видимим та має гіпоехогенну структуру. Яєчники неправильної форми, мають великі (0,6-1,2 см) анехогенні структури (фолікули) округлої чи овальної форми з тонкою капсулою (рис. 40б).

У стадію метеструсу ендометрій виглядає нормехогенним, товщина 0,3-0,5 см. Просвіт матки здебільшого гіпоехогенний, 0,5-1,5 см. Яєчники здебільшого овальні, спостерігаються гіпоехогенні включення неправильної форми (серпо-, веретеноподібної та ін.) структури з потовщеною до 0,1-0,2 см нормехогенною капсулою (рис. 40в).

У стадію анеструсу матка виглядає трубчатим органом без просвіту, товщина ендометрію 1-3 мм, яєчники овальної чи округлої форми, гомогенні нормехогенні без локальних змін (рис. 40г).

За допомогою ультразвукового дослідження визначення овуляції проводиться двічі на день, що незручно для власників. Якщо проводити дослідження рідше, можна пропустити момент овуляції, адже фолікули до та після овуляції на УЗД дуже схожі. Однак, поєднуючи цей метод з іншими тестами, наприклад, з дослідженням прогестерону, точність можна значно покращити. Крім цього, дослідження яєчників та матки на УЗД у процесі визначення термінів в'язки дозволяє виявити низку проблем, наприклад, кісти яєчників, проблеми з овуляцією, патологічні зміни у матці.

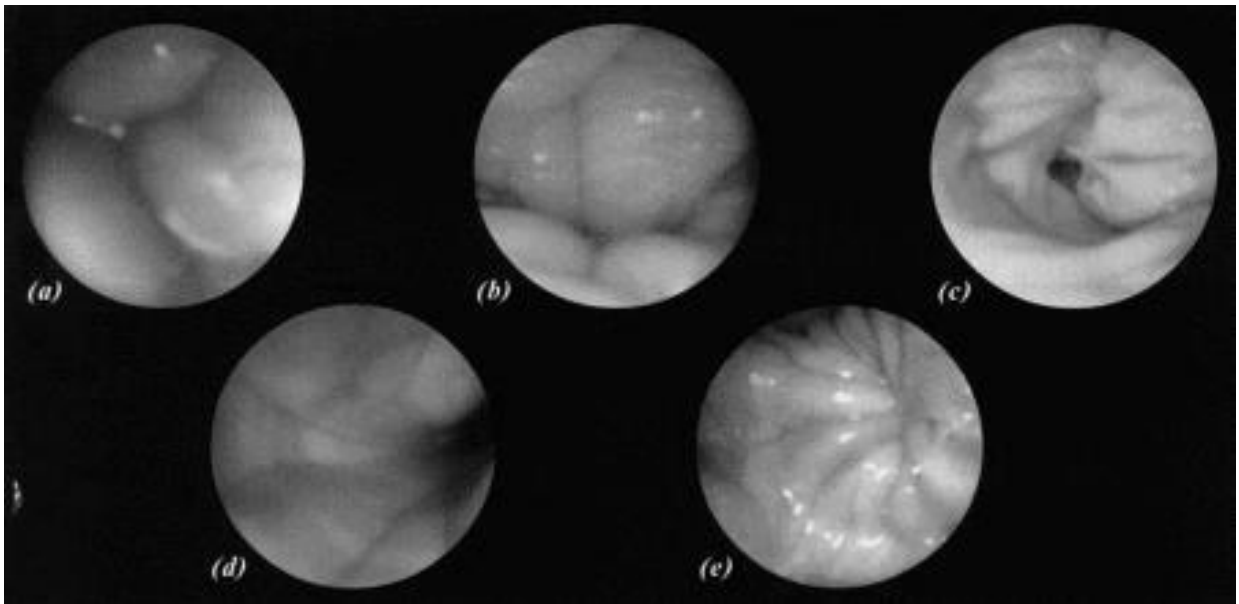
*Електрометричний метод (вимірювання резистентності чи опірності піхвового слизу)* визначення оптимального часу осіменіння базується на зміні електричного опору слизової оболонки піхви. Методика заснована на тому, що електричний опір слизової оболонки піхви зменшується у пізню фазу еструсу; широко використовується для визначення оптимального часу осіменіння ВРХ, сріблястих лисиць, зокрема у Норвегії та собак службових порід. Доведено кореляцію між електричним опором слизової оболонки та передовуляційною концентрацією гормону ЛГ. Має значення також місце знаходження зонда у статевих органах сук під час проведення вимірювань. Нині

промисловість випускає прилади для визначення оптимального часу осіменіння сук російського виробництва «Охотник» і (більш поширений) польського виробництва фірми «DRAMINSKI» (рис. 41). У міру дозрівання фолікулів електричний опір (450-600 Ом) різко знижується. Під час тічки при показниках опору слизової піхви 200-300 Ом шийка матки завжди відкрита, а при опорі понад 350 Ом може бути закритою або слабо відкритою. Оптимальний час осіменіння відмічено при 250-400 Ом. Слід враховувати, що точність цього близько 70%. Для застосування у клінічній практиці потрібні більш високоточні методики.

*Ендоскопія піхви* – дослідження слизової оболонки піхви за допомогою ендоскопа. Методика розроблена на основі змін, що відбуваються в організмі суки під час статевого циклу. У ході огляду звертають увагу на контури та окреслення складок, колір слизової оболонки піхви та наявність рідини. Під час проєструсу встановлюють набряк складок піхви. Під дією естрогенів відбувається реплікація шарів слизової оболонки піхви та її набряк, змінюється просвіт піхви та збільшується кількість складок, змінюється колір слизової оболонки. Збільшення рівня прогестерону в ході овуляції призводить до зменшення набряку, а на складках з'являються зморшки (рис. 42).



**Рис. 41.** Еструальний детектор овуляції для собак Draminski



**Рис. 42.** Ендоскопічне дослідження слизової оболонки піхви. *Динаміка змін протягом циклу:* (a) проєструс – рожеве забарвлення та набряклість; (b) початок еструсу – слизова оболонка блідне, набряк починає зменшуватися (зазвичай перед піком ЛГ); (c) середина еструсу – слизова бліда, зменшення набряку (зморщування) явно виражено, що відповідає середині фертильного періоду; (d) початок мететрусу – видно закруглені складки, при дотику слизова оболонка замикається, утворюючи розетку (e)

Значна вартість даних пристроїв та маніпуляцій на них і певні незручності, що виникають під час дослідження агресивних та неспокійних собак, – недоліки цього методу.

### 2.1.9. Техніка штучного осіменіння

Процес введення сперми в статеві шляхи самки є дуже важливим етапом методу штучного осіменіння. Сперма повинна бути введена в найбільш відповідне місце та в оптимальний час.

Методи штучного осіменіння розділяються по місці введення сперми в репродуктивний тракт самки на внутрішньопіхвовий і внутрішньо матковий (табл. 8). Техніка штучного осіменіння напряму залежить від того, яка сперма буде проводитися в процесі. Наприклад, деконсервована сперма вводиться тільки безпосередньо в матку. Якщо сперма недостатньо хорошого якості, то її теж краще вводити інтраутерально, щоб збільшити шанси на вагітність у суки. Якщо використовується свіжоодрержана сперма або охолоджена, то її, як правило, вводять у краніальну частину піхви.

Таблиця 8. Порівняння ефективності вагінального та внутрішньоматкового методів

Джерело	Посліди (%)	Посліди (%)	Різниця (%)
	Вагінальний метод	Внутрішньоматковий метод	
Linde-Forsberg et al. 1999	58,9 из 141	84,4 из 167	25,5
Thomassen et al., 2001	29 из 78	71 из 305	42

#### 2.1.9.1. Інтравагінальне осіменіння

Внутрішньопіхвове осіменіння можна проводити за допомогою спеціальних катетерів або ендоскопу. Цей спосіб на даний момент найпопулярніший, оскільки не такий складний у виконанні. Для введення сперми до піхви самки використовують жорсткі пластикові піпетки 22 см и 44 см з трубчастою насадкою та з'єднанням типу Луер (рис. 43) і спеціальні катетери довжиною 120 мм, 250 мм та 400 мм з надувним балончиком (рис. 44) для запобігання відпливу сперми, і одноразові шприци.

За інтравагінального осіменіння потрібен більший (порівняно з внутрішньоматковим) об'єм сперми – 3-10 мл, в залежності від розміру суки.

Маніпуляція починається з отримання та оцінки сперми. Сперму у пса збирають за фракціями. Для штучного запліднення використовується друга (сперматична) фракція або весь еякулят.



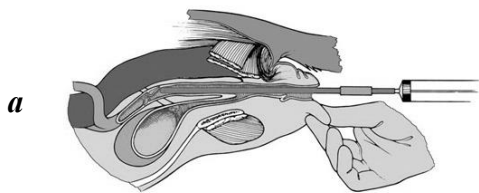
Рис. 43. Піпетка для штучного осіменіння (Minitube)

Переконавшись, що сперма собаки годиться для запліднення, проводиться процедура. Самку фіксують у стоячому положенні. Проводять обробку зовнішніх статевих органів. Далі у піхву під контролем пальця вводиться катетер, що відповідає розміру суки.

Просування катетера до шийки матки контролюється рукою через черевну стінку. Потім катетер фіксується на потрібній відстані і на ньому роздувається балончик (щоб уникнути зворотного відтоку сперми). Після цього приєднується шприц зі спермою і проводиться її введення (рис. 45).

Для кращого результату напередодні та каудальної частини піхви вводиться палець для імітації «замку» та стимулювання скорочення матки у напрямку до маткових труб (де і має відбутися зустріч яйцеклітин зі сперміями). Далі здувається балончик на катетері, після чого витягується і сам катетер. Суку піднімають за задні лапи на 10 хвилин + бажаний масаж склепіння піхви (рис. 46). Не рекомендується дозволяти суці здійснювати сечовипускання протягом 30 хв.

Хороші результати отримують при заплідненні собак свіжоотриманою спермою. За частотою настання вагітності та/або за результатами лікування ефективність внутрішньопіхвового осіменіння собак свіжоотриманою спермою досягає 47,8 ... 89%.



**Рис. 45.** Процедура інтравагінального осіменіння суки: а) схема; б) фото

яюється від 10...34,6% до 46,0...57,9%.

Ефективність інтравагінального осіменіння собак охолодженою спермою залежить від терміну її зберігання. За матеріалами С. Linde-Forsberg, при короткочасному зберіганні розведеної сперми її ефективність суттєво не відрізняється від свіжоодрержаної (45,1 проти 47,8%).

Результативність осіменіння собак заморожено-відтаною спермою не постійна: за різними оцінками вона варіюється від 10...34,6% до 46,0...57,9%.



**Рис. 44.** Катетери MAVIC для вагінального штучного осіменіння собак: 1) MAVIC AI Large, CH 36; 2) MAVIC AI Medium, CH 18; 3) MAVIC AI Small, CH 18 (Minitube)



**Рис. 46.** Утримання суки за задні кінцівки з масажем склепіння піхви

### 2.1.9.2. Трансцервікальне осіменіння

У літературі описано два нехірургічних та два хірургічних способи внутрішньоматкового запліднення собак.

Нехірургічний внутрішньоматковий спосіб осіменіння за допомогою ендоскопу (рис. 47) розроблений у Новій Зеландії. Для трансцервікального внутрішньоматкового осіменіння собак застосовують тубусний цисто ендоскоп з оптичною трубкою (довжиною 30 см, діаметром 4 мм з кутом зору 25...30°), джерелом світла та інструментальним каналом для осіменіння, гнучкий полістероловий трансцервікальний катетер із вигнутим кінчиком.

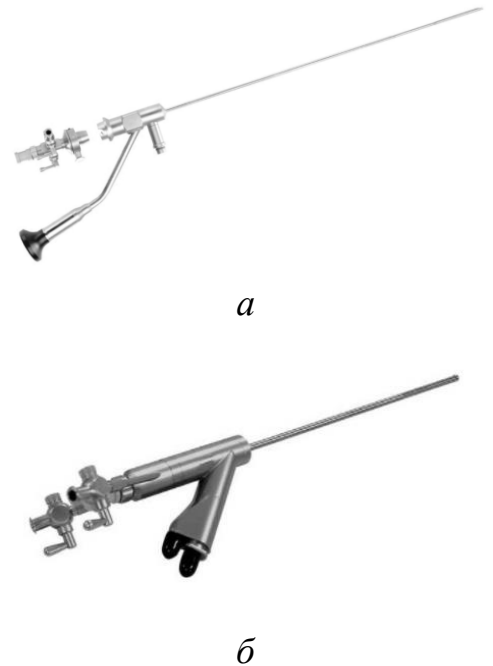
Сучасні ендоскопи забезпечені відео-системою.

Відеоендоскопи зручніші в роботі, ніж ендоскопи. Вони не тільки забезпечують показ зображення на моніторі та його прямий запис на персональний комп'ютер, але і дають можливість власнику тварини в режимі реального часу спостерігати за перебігом штучного осіменіння його собаки.



**Рис. 48.** Шунтуюча система для ендоскопів FlexiLock (Minitube)

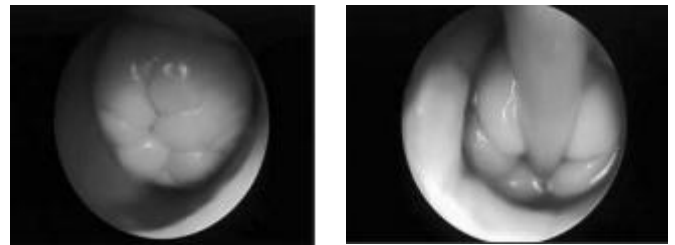
по верхньому склепіння піхви до її вузької, парацервікальної частини. Безпосередньо через оптичний окуляр трубки або за допомогою відеосистеми візуалізують вхід у шийку матки (рис. 49), який розташований між медіальною парацервікальною складкою піхви та цервікальним горбком. Під візуальним контролем через інструментальний канал приладу цервікальний канал направляють гнучкий полістероловий трансцервікальний катетер із вигнутим кінчиком (рис. 50). Вигнутий кінчик катетера полегшує його введення у цервікальний канал. Після внутрішньоматкового введення сперми задню частину тулуба підніма-



**Рис. 47.** Традиційний (а) та інноваційний (б) ендоскопи Minitube для трансцервікального штучного осіменіння

Компанією Minitube розроблено шунтуючу систему для ендоскопів FlexiLock – пристрій для фіксації та стимуляції самки собаки за ендоскопічного осіменіння (рис. 48).

Самку фіксують у положенні стоячи на столі. Прилад вводять



**Рис. 49.** Візуалізація входу в цервікальний канал та введення (проведення) трансцервікального катетера в порожнину матки

ють, ендоскоп і катетер для запліднення вилучають із статевих органів. Щоб мінімізувати ймовірність рефлюксу введеної в матку сперми назовні, самку утримують у похилому положенні протягом 5...10 хв.

Для трансцервікального внутріматочного запліднення можна також використовувати гнучкий ендоскоп, який вводять у піхву собак за допомогою інтубаційної трубки з надувною манжеткою. Процедура досить трудомістка: на відшукання шийки матки за допомогою гнучкого відеоендоскопа та введення катетера в порожнину тіла матки потрібна в середньому 7,5 хв.



Рис. 50. Положення рук та інструментів при внутрішньоматковому заплідненні собаки під контролем відеоендоскопу

За частотою настання вагітності та/або за результатами лікування ефективність трансцервікального запліднення собак заморожено-відтанутою спермою під ендоскопічним контролем досить висока і досягає при використанні свіжоодрержаної сперми 100%, заморожено-відтаянної – 64...100%.

Недоліки способу: він неприйнятний для нервових самок і самок з довгим піхвою; процедура внутрішньоматкового запліднення дуже складна і трудомістка, пов'язана з використанням дорогих інструментів та необхідністю спеціальної попередньої підготовки.

Нехірургічний внутрішньоматковий спосіб запліднення собак за допомогою норвезького катетера, що застосовується для запліднення лисиць, розроблений у Швеції.

Катетер складається із захисної нейлонової оболонки товщиною 10 мм, тонкої металевої трубки діаметром 1...2 мм, робочий кінець якої (вужчий, товщиною 0,75...1 мм), тупий з бічним вихідним отвором, інший (вхідний) – відкритий з роз'ємом для приєднання шприца. Випускають три моделі норвезького катетера: довжиною 20, 30 і 40 см. Катетери довжиною 20 см призначені для запліднення дрібних собак, 30 і 40 см – середніх та великих за розміром самок, відповідно.

Катетера вводять до входу в цервікальний канал і висувають із захисної оболонки. Обережно маніпулюючи катетером та шийкою матки, відшукують вхід у канал шийки матки. Цервікальний канал проходять, обертаючи катетер та відтягуючи шийку матки вперед та вниз. Довжина каналу шийки матки становить лише 0,5...1 см. Сперму вводять, упевнившись, що кінчик катетера знаходиться в тілі матки. Катетер вилучають.

Самці надають похило положення і утримують в ньому протягом 10 хв, ввівши у піхву великий палець.

Досвідчений ветеринарний лікар на відшукання шийки матки та введення катетера в порожнину тіла матки витрачає близько 1 хв. Ефективність катетеризації цервікального каналу та введення сперми в порожнину тіла матки досягає 95,5...98,0%.



Метод пройшов широку клінічну апробацію та довів свою високу ефективність при використанні як свіжоодержаної, так і заморожено-відтаної сперми. Так, при використанні для запліднення свіжоотриманої сперми ефективність досягає 65,2...84%, охолодженою – 65,2%, заморожено-відталою – 52...90,9%.

Недоліки способу: неприйнятний для нервових та опасистих собак; пов'язаний із ризиком травмування та інфікування статевих органів самки; технічно важковиконані – необхідні спеціальна підготовка та постійна практика.

Хірургічний внутрішньоматковий спосіб осіменіння через розріз черевної стінки полягає в наступному. Самок витримують на голодній дієті 18...24 год. Із загальним наркозом фіксують на столі у спинному положенні. Кришку операційного столу переводять у похиле положення, щоб викликати усунення внутрішніх органів вперед та полегшити процедуру виявлення рогів матки в черевній порожнині. З дотриманням правил асептики та антисептики готують операційне поле та роблять розріз білою лінією живота. Після топографічної орієнтації в черевній порожнині з операційної рани витягають і за допомогою пластикового катетера, одягненого на голку, пунктують один або обидва роги матки. Після проколу катетер просувають вперед по просвіту рога матки, витягають голку і через роз'єм катетера в його порожнину за допомогою шприца вводять сперму в невеликому обсязі (приблизно 0,5...3 мл). Після вилучення катетера місце пункції притискають стерильним тампоном. Черевну стінку зашивають звичайним способом.

Процедура осіменіння дуже проста, але трудомістка, пов'язана з використанням загального наркозу і можлива лише за умов клініки. На підставі ретроспективного аналізу результатів хірургічного внутрішньоматкового осіменіння собак свіжоодержаною, охолодженою заморожено-відталою спермою D.M. Burgess et al. встановили, що ефективність методу при вмісті в спермодозі не менше 200 млн. активних сперміїв становить у середньому 73,1%. За матеріалами S.J. Mason, N.R. Rous, при використанні заморожено-відталою спермою в дозі 100 млн активних сперміїв, ефективність сягає 45%.

В даний час цей метод запліднення має обмежену кількість прихильників. У деяких країнах Європи його практичне застосування з етичних міркувань заборонено (Велика Британія).

Хірургічний внутрішньоматковий спосіб осіменіння за допомогою лапароскопа та спеціальної піпетки з голчастим наконечником розроблений у Японії та докладно описаний у роботі L.D.M. Silva et al. Самку витримують на голодній дієті. Під загальним наркозом фіксують на операційному столі в похило спинному положенні. Вентральну поверхню живота голять, обробляють антисептиками. За допомогою голки в черевну порожнину накачують діоксид вуглецю. Відступивши від пупка 1 см назад по білій лінії, за допомогою троакара спочатку в черевну порожнину вводять світловод діаметром 8 мм, з'єднаний з камерою лапароскопу, і відшуковують роги матки, потім на правій стороні живота, відступивши 2 см у бік від молочної залози, вводять другий троакар діаметром 5 мм. Ендоскопічні щипці, введені в черевну порожнину через канюлю троакара, захоплюють тіло матки і підтягують до ве-

нтральної поверхні черевної стінки. Черевну стінку та ріг матки проколюють голкою, через просвіт якої вводять внутрішньоматковий катетер. Голку витягають і через катетер запліднюють самку.

За матеріалами T. Tsutsui et al., при використанні свіжоотриманої сперми, ефективність одноразового внутрішньоматкового осіменіння під контролем лапаротомії досягає: при вмісті в спермодозі 20...40 млн активних спермійів – 100%, 10 млн – 90%, 3...5 млн – 28%. За даними L.D.M. Silva et al. ефективність дворазового з перервою 48 год внутрішньоматкового осіменіння собак 1 мл свіжоодержаної сперми (250...460 млн спермійів) під контролем лапароскопу склала 60%.

Недоліки способу: дуже складний, трудомісткий, пов'язаний з використанням дорогої апаратури, малоприматний для виробничого застосування. При проколі черевної стінки існує ризик пошкодження великих судин та внутрішніх органів.

### 2.1.10. Штучне осіменіння кішок

Для племінного розведення відбирають тварин, що відповідають породним стандартам, позбавлених дефектів і відрізняються добрим темпераментом. Кішки повинні мати в минулому неускладнені роди і мати виражений материнський інстинкт. Метою племінного розведення є отримання здорових кошенят, а не кількох виставкових екземплярів, вибраних з посліду, що має вроджені дефекти або відхилення від породних стандартів. Інбридинг може протягом певного періоду часу сприяти народженню кошенят із чудовим екстер'єром, проте надалі стає причиною вроджених дефектів, практикувати його не рекомендується, особливо при розведенні рідкісних, нечисленних порід.

Роботи зі штучного осіменіння домашньої кішки проводяться переважно в наукових цілях, оскільки її біологія має схожість з біологією диких котят, проте розроблені методи штучного осіменіння та збереження сперми можуть знайти застосування у племінному розведенні кішок. Чисельність племінних тварин у багатьох порід обмежена, зокрема, через те, що більшість котів піддається кастрації у зв'язку з поведінковими проблемами (наприклад, завдання сечових міток), що ускладнюють їх утримання в домашніх умовах. Нестача плідників, а також дисбаланс чисельності некастрованих і кастрованих котів рано чи пізно призводить до інбридингу та дегенерації, що обертається поширенням уроджених дефектів та захворювань. Заморожування сперми дозволяє забезпечити не лише її експорт у будь-яку країну світу, а й можливість отримувати потомство навіть від кастрованих чи загиблих котів. Крім того, штучне осіменіння значно знижує ризик поширення захворювань.

Перед в'язкою проводять обстеження обох партнерів, виявляючи ознаки захворювань, і можливі дефекти, які мають спадковий характер. Проводять протипаразитарні заходи. Рекомендується проведення тестів на наявність вірусів лейкемії та імунодефіциту кішок. Племінні тварини повинні бути вакциновані від герпесвірусної та каліцівірусної інфекцій та панлейкопенії. Проведення андрологічного та гінекологічного обстеження перед в'язкою не

практикується, проте рекомендується оглядати сім'яники та пеніс самця. Якщо в анамнезі є вказівки на порушення репродуктивної функції, обстеження, включаючи аналіз сперми, проводять більш ретельно.

Потреба у штучному осіменінні кішок виникає у випадку:

- низького лібідо (коли кіт не виявляє інтересу до кішки або робить 1-2 садки на день, що не призводить до овуляції);
- агресія (якщо кішка не підпускає кота, якщо кіт набагато більший і агресивніший до кішки - при міжвидовому схрещуванні);
- поведінкові особливості (кішка в процесі в'язки падає на бік, кіт не може провести пов'язану в'язку);
- різниця в розмірі (якщо кіт і кішка значно відрізняються по довжині тіла, в процесі в'язання кіт просто не може коректно себе позиціонувати).

Штучне осіменіння проводиться у тому випадку, коли природне парування протипоказане або неможливе і, як правило, застосовують у крайньому випадку, коли пропущені строки парування.

Котячі мають ряд факторів, що впливають на успішність процедури. У кішок овуляція індукована, тобто запускається при механічному подразненні слизової оболонки піхви в процесі численних в'язок. Якщо проводиться штучне запліднення, овуляцію викликають медикаментозно (введенням певних препаратів) та механічно, якщо це можливо у конкретної кішки. Ще один фактор – якість та обсяг отриманої сперми.

Заплідненість кішок від штучного осіменіння настає у 75%.

Пік еструсу у кішки можна визначити за ознаками поведінки самки, а також проводять вагінальну цитологію, для визначення оптимальних строків її осіменіння.

Сперму одержують за допомогою штучної вагіни або електроеякуляції. Крім двох названих методів практикується лаваж піхви після в'язки або вилучення сперміїв із хвоста придатка після кастрації.

Сперму від кота отримують на спеціальну штучну вагіну, яку можна виготовити з гумового «пальця» від піпетки

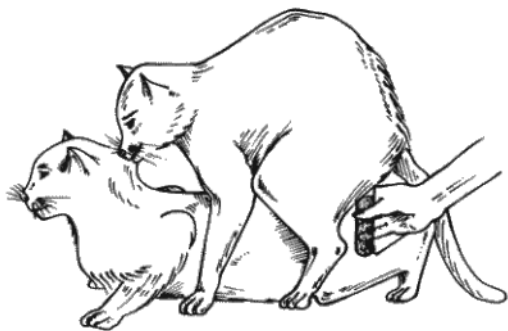


Рис. 52. Отримання сперми від кота за допомогою штучної вагіни

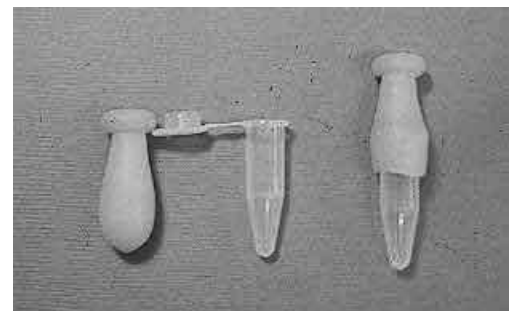


Рис. 51. Штучна вагіна для збору сперми складається з гумового «пальця» та пробірки

Пастера та невеликої пробірки (рис. 51). Самцю дозволяють зробити садок на тічну самку і підносять штучну вагіну, направивши до неї пеніс самця (рис. 52). До недоліків даного методу можна віднести необхідність присутності збудженої самки, і навіть неможливість проведення маніпуляції без попередньої підготовки самця, що займає 2-3 тижні.

Процедура завершується успіхом лише у 2/3 випадків. Збір сперми за допомо-

гою штучної вагіни ефективний при роботі з лабораторними тваринами, але рідко практикується в клінічних умовах.

На практиці найчастіше користуються двома способами – уретральною катетеризацією чи електроєякуляцією. Але ці методи вимагають особливого протоколу анестезії. Тому перед проведенням процедури необхідно оглянути тварину та виключити кардіопатології: зробити ЕХО КГ (УЗД серця на предмет гіпертрофічної кардіоміопатії та інших захворювань, які протікають приховано). Якщо відхилень не виявлено, проводиться анестезія. Для успішного забору сперми у котів у адекватній кількості та обсязі розроблено кілька протоколів анестезії, порушення яких може призвести до відсутності результату. Ця процедура вимагає пильного контролю пацієнта лікарем-анестезіологом, моніторингу параметрів життєдіяльності (підключення до спеціалізованих моніторів та вимірювачів насичення крові киснем), тому проводиться лише стаціонарно у клініці. Найбільш гуманним і швидким є метод уретральної катетеризації (рис. 53), який дозволяє отримати хороший обсяг матеріалу, як для дослідження, так і для проведення штучного осіменіння. Якщо ж ця методика не дає результату, переходять до електроєякуляції (стимуляція певних нервових сплетень, що спричиняє єякуляцію).



Рис. 53. Процедура одержання сперми у kota методом уретральної катетеризації

До цієї маніпуляції самець привчається за 3 тижні. Для збудження kota використовують підставну кішку з ознаками еструсу.

Сперму від kota можна отримати й іншим методом – електростимуляції. Маніпуляція не вимагає попередньої підготовки kota, проте проводиться під загальною анестезією для того, щоб тварина не відчувала неприємних відчуттів.

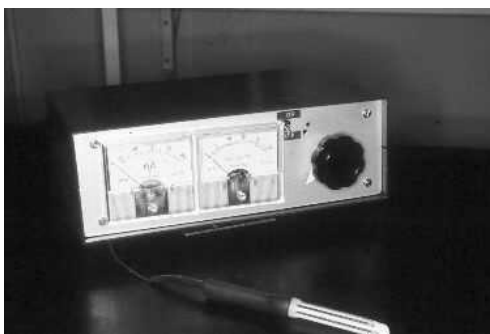


Рис. 54. Обладнання для електроєякуляції у котів – електричний стимулятор та ректальний зонд з трьома електродами

У пряму кишку вводять ректальний зонд (1 x 12 см), виготовлений з нетоксичного пластику та з'єднаний з електричним стимулятором (рис. 54). Зонд забезпечений трьома електродами (1,5 мм x 5 см), два з яких (зовнішні) з'єднують між собою, а центральний має протилежну полярність. Для запобігання попаданню слизової прямої кишки між зондом і електродами останні повинні щільно прилягати до корпусу зонда. Використовують електроєякулятори, що працюють на частоті 50 Гц, з трансформатором, що забезпечує тривалі імпульси потужністю від 0 до 30 вольт. Прилад працює від джерела напруги 220 вольт. Сила струму та напруга регулюються за допомогою вольтметра та амперметра.

Сила струму та напруга регулюються за допомогою вольтметра та амперметра.

Після проведення анестезії зонд змащують та обережно вводять у пряму кишку на 7-9 см, спрямовуючи електроди вентралью. Пеніс оголюють легким натисканням на його основу та підносять до нього лабораторну пробірку.

Серія з 80 імпульсів потужністю від 2 до 5 вольт забезпечує еякуляцію (рис. 55, табл. 9). Загальна послідовність маніпуляцій включає три серії: 30 стимуляцій (по 10 при 2, 3 та 4 вольтах), 30 стимуляцій (по 10 при 3, 4 та 5 вольтах) та 20 стимуляцій (по 10 при 4 та 5 вольтах). Між серіями роблять паузи тривалістю 2-3 хвилини. Стимуляцію починають, підвищуючи напругу протягом 1 секунди з 0 вольт до необхідного, після чого витримують 2-3 секунди при цій напрузі і різко знижують його до 0, знову витримуючи 2-3 секунди. Існують інші методики, що передбачають інші напруги та тривалість стимуляцій. Кожен розряд супроводжується реакцією, що виражається у витягуванні задніх кінцівок, що вказує на адекватність подразнення.

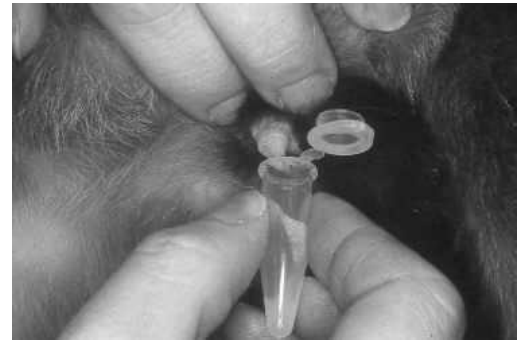


Рис. 55. Одержання сперми у kota за електроеякуляції

Таблиця 9. Методика проведення електроеякуляції

Серія	1			2			3	
Кількість стимуляцій	10	10	10	10	10	10	10	10
Напруга	2	3	4	3	4	5	4	5

Відсутність реакції при напрузі 2 вольт і більше свідчить про неправильне положенні електродів або про наявність у прямій кишці калових мас. У ході еякуляції частина сперміїв потрапляє в сечовий міхур, ця особливість еякуляторного процесу є нормою для домашніх кішок, але може посилюватися внаслідок застосування альфа-2 стимуляторів адренорецепторів (ксилазин та медетомідин) для седації.

*Вагінальний лаваж після в'язки.* Метод не поширений у клінічній практиці, оскільки лише деякі коти здатні до в'язання в незнайомому місці, тим більше в клініці. Інший недолік методу полягає в необхідності призначення кішці седативних препаратів, а також у тому, що секрет піхви та рідина, яка використовується для процедури (сольовий розчин, підігрітий до 37 °C), можуть впливати на якість сперми. Метод практикують за неможливості отримати сперму із застосуванням штучної вагіни або електроеякуляції.

Якщо в результаті забору не вдалося дістати сперму жодним способом, то наступним етапом має стати біопсія сім'яника. Зазвичай тонкогілкової аспірації (коли з яєчка тонкою голкою набирають клітини) достатньо, щоб зрозуміти, чи є в сім'яниках сперматогенез. Якщо він відсутній, такі ситуації здебільшого необоротні.

Метод *одержання сперми з епідідімісу* можна застосувати після кастрації. Сперму отримують з хвоста придатка шляхом вимивання сперміїв з протоки придатка чи подрібнення хвоста придатка. Метод застосовують при зборі сперми для наукових досліджень або за необхідності зберегти сперму рідкісного виду диких тварин, загиблих у неволі або внаслідок нещасного випадку.

### ***Оцінка якості сперми***

Об'єм еякуляту у кішок у нормі вкрай малий: приблизно 1-2 краплі. Тому для вивчення його розбавляють специфічними середовищами. Отриманий матеріал перевіряють на рухливість та підраховують кількість живих, мертвих, нормальних та сперміїв з дефектами.

Варто сказати, що у котятчих в нормі досить погана якість сперми. Якщо для собак нормальних сперміїв в еякуляті має бути не менше 60-70%, то у котів за наявності всього 25% нормальних сперміїв та достатньої концентрації зазвичай із плідністю проблем немає. Навіть якщо цей відсоток нижчий, багато котів дають потомство. Така знижена якість компенсується багаторазовими в'язками та швидшим сперматогенезом. Тому при прикордонних результатах спермограми буває часом важко пов'язати безпліддя та знижену якість сперми.

Всі матеріали, що торкаються сперми, повинні бути підігріті до 37 °С для запобігання холодовому шоку.

### ***Колір***

Біла: висока концентрація.

Прозорий: низька концентрація.

Жовтий: контамінація сечею, що надає руйнівний вплив на сперму, часто спостерігається при підвищенні напруги понад 8 вольт при електроеякуляції.

### ***Об'єм***

Вимірюється за допомогою мікропробірки. Перед подальшим застосуванням невеликий обсяг може бути збільшений додаванням буферного або ізотонічного розчину. Оцінку морфології сперміїв проводять перед змішуванням з розчином, оскільки різниця в осмотичному тиску може збільшити кількість дефектних сперміїв.

### ***Рухливість***

Рухливість сперміїв оцінюють за шкалою від 0 до 5 – за 5 приймають активне поступальне просування.

### ***Концентрація***

Вимірюють за допомогою спеціальної камери (камера Бюркера) під мікроскопом.

Загальну кількість сперміїв підраховують з урахуванням обсягу та концентрації на одиницю об'єму.

#### *Відсоткове співвідношення сперміїв з дефектом головки*

Забарвлений зразок (карбол-фуксин або нігрозин-еозин) досліджують під мікроскопом із 1000-кратним збільшенням. Дефектними вважають: головку у формі «перлини»; головку, що має звужену основу, порушення контуру, недорозвинену, відокремлену чи вузьку голівку; а також головку, що має відхилення у розмірах.

#### *Інші дефекти сперміїв*

Зразок фіксують у формаліні та досліджують під фазово-контрастним мікроскопом при 1000-кратному збільшенні. Дефектами сперміїв вважають проксимальні включення, дистальні включення, втрату головки, дефекти акросоми, зміни акросоми, зміни тіла, подвоєння хвостів. До дефектних також відносять спермії, зчеплені хвостами. Крім того, підраховують кількість сперміїв, які не мають дефектів.

Присутність інших клітин в еякуляті У пофарбованому зразку підраховують кількість лейкоцитів, сперматогенних клітин та дегенеративних епітеліальних клітин (за Папаніколау).

#### *Нормальна якість сперми*

У котів об'єм еякуляту невеликий – до 0,01-0,77 (0,03-0,3) мл. Якщо сперму збирають за допомогою електроеякуляції, то через більш інтенсивну стимуляцію додаткових залоз її обсяг помітно більше, ніж при отриманні за допомогою штучної вагіни.

Концентрація сперміїв становить  $100-5000 \times 10^6$ /мл, а загальна кількість сперміїв в еякуляті коливається в межах від  $3 \times 10^6$  до  $153 \times 10^6$  і зазвичай вище, коли сперму збирають за допомогою штучної вагіни, ніж якщо її одержують методом електроеякуляції.

Рухливість сперміїв різна і може бути пов'язана із тривалістю сексуальної помірності – 56-85%.

Осмоляльність свіжої сперми, зібраної за допомогою штучної вагіни становить близько 320 мосм/кг і зростає при зберіганні.

Сперма містить багато алкаліну фосфатази, її рН коливається між 6,6 і 8,77.

Зазвичай вміст нормальних сперміїв складає 38-95%. За рівня 60 % і більше вважають нормою, за показником меншим 40% можна говорити про тератозооспермію. Однак зв'язок між якістю сперми та фертильністю у домашніх кішок потребує подальшого вивчення. У природних умовах нормальна фертильність спостерігається і при менш ніж 40% зміст нормальних сперміїв в еякуляті. Якщо сперму отримують методом електроеякуляції двічі за короткий проміжок часу, то в другому зразку, як правило, відзначається велика рухливість і вищий відсоток здорових сперміїв. Проведено експеримент: від 15 котів різних порід 2 рази за час однієї анестезії брали сперму методом еле-

ктроеякуляції. Виявилось, що кількість здорових сперміїв у першому еякуляті становить 40,9 %, тоді як у другому зростає до 54,6 %, при тому, що перший еякулят відрізняється вищою концентрацією. З викладеного слід, що з визначення фертильності доцільно проводити кілька аналізів сперми.

### **Зберігання сперми**

Сперма для штучного осіменіння може бути свіжою і нерозбавленою, якщо вона використовується відразу після одержання, і охолодженою, розбавлена у разі короткочасного зберігання, або заморожена-відтала після зберігання протягом тривалого періоду часу.

### **Охолоджена розбавлена сперма**

Для зберігання сперми при температурі 4-5<sup>0</sup>С застосовують буфер Test-T (табл. 10), що містить 20% яєчного жовтка та 5% гліцерину.

Таблиця 10. **Тест-буфер для охолодження і заморожування сперми кота**

Інгредієнт	Кількість
Н-трисгідроксиметил-метил-2-амінометансульфонова кислота (тест)	11,2 г в 150 мл дистильованої води
Трисгідроксиметиламінометан (Трис)	2,9 г в 75 мл дистильованої води
Жовток курячого яйця	15-20%
Гліцерин (можна не використовувати для охолодження)	7-7,5%
Пеніцилін G	1000 МО/мл
Стрептоміцин	1 мг/мл

### **Заморожування сперми**

Сперму котів заморожують у спеціальних середовищах (табл. 11 та 12).

Таблиця 11. **Жовтково-лактозний розбавник для кріоконсервації сперми котів**

Інгредієнт	Кількість
Лактоза	11 г
Гліцерин	4 мл
Стрептоміцину сульфат	1000 мкг/мл
Пеніцилін G	1000 МО/мл
Жовток яйця	20 мл
Дистильована вода	до 100 мл

Зразок сперми центрифугують при 700 обертах протягом 6 хв і осадок сперми ресуспендують в Uppsala Equex Extender 1 до подвійної кінцевої концентрації сперми. Найкращу концентрацію для кріоконсервації сперміїв кота ще потрібно визначити. Після 1 год охолодження від кімнатної температури до 4<sup>0</sup>С додають рівний об'єм Uppsala Equex Extender 2. Потім заповнюють соломинки об'ємом 0,25 мл і заморожують в парах рідкого азоту, а потім занурюють повістю в рідкий азот.

Сперму розморожують на водяній бані при +37<sup>0</sup>С протягом 15 с, після чого з'єднують з таким же об'ємом Uppsala Equex Thaw Medium при +37<sup>0</sup>С і



дають урівноважитись при цій температурі протягом 5 хв перед оцінкою якості та виконанням штучного осіменіння.

Таблиця 12. Розріджувачі для кріоконсервації сперми котів

Інгредієнт	Розбавник/ кількість		
	Uppsala Equex Extender 1	Uppsala Equex Extender 2	Uppsala Equex Thaw Medium
Tris	2,4 г	2,4 г	2,4 г
Лимонна кислота	1,4 г	1,4 г	1,4 г
Глюкоза	0,8 г	0,8 г	0,8 г
Натрію бензил-пеніцилін	0,06 г	0,06 г	0,06 г
Стрептоміцину сульфат	0,1 г	0,1 г	0,1 г
Жовток яйця	20 мл	20 мл	20 мл
Гліцерин	3 мл	7 мл	–
Паста Equex STM*	–	1 мл	–
Дистильована вода	до 100 мл	до 100 мл	до 100 мл

### Етапи технології штучного осіменіння кішок

#### *Визначення часу штучного осіменіння кішок*

Для підтвердження фертильного періоду кішок може бути використана вагінальна цитологія. Для цього невеликий ватний тампон змочують фізіологічним розчином, вводять у піхву і накатують по слизовій оболонці, щоб отримати епітеліальні клітини зі стінки піхви. Роблять мазок на предметному склі і забарвлюють, наприклад, за Гімза. У позитивному випадку більше 80% вагінальних клітин ороговілі, а фон мазка чіткий. Важливо пам'ятати, що ця процедура може викликати овуляцію.

Спермії kota мають фертильну тривалість життя, яка принаймні дорівнює часу між індукцією овуляції та овуляцією (26-29 год), оскільки овуляція індукується паруванням, і вагітність може настати після одноразового осіменіння. Вагітність може настати після парування або штучного осіменіння протягом 49 год після індукції овуляції.

Шийка матки відкрита лише протягом певного періоду під час тічки. У більшості кішок шийка матки відкрита під час середньої та пізньої фази тічки, з деякими індивідуальними змінами. Час відкриття шийки матки зазвичай збігається з часом, коли клітини вагінального мазка ороговіли. Тому сперму вводять слід під час середньої або пізньої фази тічки та протягом 49 год після індукції овуляції.

Осіменіння повторюється два рази, або два дні поспіль, або з другим осіменінням через два дні після першого. Це збільшить ймовірність того, що шийка матки буде відкрита хоча б один раз.

### *Індукція овуляції*

Обов'язковим етапом технології штучного осіменіння кішок є індукція овуляції, що є їх видовою особливістю. У кішок спонтанної овуляції, як у більшості самок, не відбувається – вона рефлекторна, тобто настає тільки внаслідок множинних парувань. При статевому акті піхва кішки подразнюється шорсткою голівкою статевого члена kota, що стимулює вироблення в гіпофізі лютеїнізуючого гормону.

На третій день від початку тічки проводиться обстеження кішки: за допомогою УЗД оцінюється розмір фолікулів у яєчниках.

Виключаються протипоказання до анестезії – огляд тварини лікарем та обстеження серця (ЕХО КГ на предмет прихованих кардіопатологій).

Кардіообстеження можна провести заздалегідь і надати лікарю висновок від кардіолога.

Якщо ці обстеження відповідають нормі, починають стимуляцію овуляції.

За відсутності в'язки овуляцію стимулюють за допомогою ін'єкції людського ХГ, що підвищує секрецію ЛГ. Індукція овуляції найефективніша на 3 день еструсу і настає через 26-29 год після ін'єкції людського ХГ, а запліднення може відбуватися в інтервалі до 49 год після індукції.

Внутрішньом'язове введення 100 МЕ людського ХГ забезпечує овуляцію у більшості кішок, підвищення дози призводить до гіперстимуляції яєчників та дегенерації ооцитів.

Слід зважати на те, що анестезія може пригнічувати овуляцію, якщо проводиться після її індукції або безпосередньо перед овуляцією. Як альтернативний метод можна використовувати внутрішньом'язове введення 25 мкг ГнРГ.

Результативність овуляції оцінюється УЗД через 24 год після її індукції.

Якщо овуляція відбулася, переходять до одержання сперми. Але попередньо kota обстежують (огляд і ЕХО КГ на предмет прихованих кардіопатологій).

Якщо протипоказань немає, проводять одержання сперми та її оцінка і за належної якості еякуляту проводять осіменіння.

Осіменіння у кішок, як і сук, можливе кількома методами: внутрішньопіхвове, коли катетер вводиться в піхву і сперма вводиться біля шийки матки, та внутрішньоматочно на відкритій операції через прокол стінки матки або при введенні катетера в шийку матки під контролем пальпації (що у кішок вкрай складно). Але всі способи осіменіння у котів вимагають анестезії. Навіть при внутрішньовагінальному введенні кішка не дасть правильно ввести катетер і протягом 10 хв утримувати себе в потрібному положенні.

Є повідомлення про успішне осіменіння свіжою спермою (як вагінальному, так і внутрішньоматковому). Якщо осіменіння спермою, розведеною 0,1 мл фізрозчину, проводять на день введення людського ХГ та повторно через 24 год, тобто в момент овуляції, забезпечується більш надійне запліднення порівняно з одноразовим заплідненням у день введення людського ХГ.

Хірургічне внутрішньоматкове запліднення забезпечує найкращі результати, якщо проводиться через 31-50 годин після введення людського ХГ.

За хорошої якості отриманої сперми зазвичай внутрішньопіхвового осіменіння буває достатньо і операція не потрібна. Плюсом його є мала інвазивність та можливість повторити осіменіння через 12 годин, якщо є показання. Якщо якість сперми та її об'єм знижені, може знадобитися внутрішньоматкове запліднення в процесі відкритої операції. Оптимальна методика осіменіння для цієї конкретної пари визначається лікарем залежно від багатьох факторів. І часом остаточне рішення приймається після забору та оцінки якості сперми кота.

#### *Штучне осіменіння свіжоодержаною спермою*

Виходячи з того, що довжина присінка піхви домашньої кішки становить 1-2 см з діаметром 2,5-3,0 см, то для інтравагінального осіменіння може бути використаний французький катетер калібру 3,5. Його вводять на 45-50 мм у піхву до шийки матки, видавлюють сперму (рис. 56), після чого протягом 10 хв тварину утримують у положенні з піднятою тазовою частиною. Для осіменіння свіжою спермою в спермодозі повинно бути не менше  $5 \times 10^6$  спермійв.

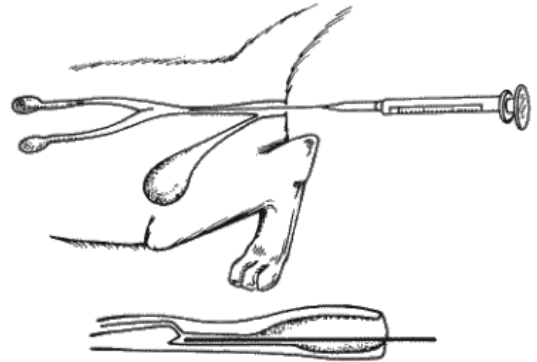


Рис. 56. Вагінальне запліднення кішки. Сперму вводять у краніальний відділ піхви ближче до шийки матки

#### *Штучне осіменіння замороженою спермою*

Повноцінне потомство можна отримати за допомогою осіменіння замороженої (після неї) розморожування) спермою. Імовірність настання вагітності становить близько 10% при природної та гормональної стимуляції тички. Низька ефективність такого методу пояснюється, ймовірно, ушкодженнями акросом у процесі заморожування та подальшого розморожування, навіть якщо спермії відрізняються гарною рухливістю.

Важливим фактором є коректний вибір як часу проведення маніпуляції, так і методу осіменіння: як і у собак, найкращі результати спостерігаються в результаті внутрішньоматкового осіменіння, особливо якщо йдеться про використання замороженої сперми.

Хірургічне внутрішньоматкове осіменіння не практикується у багатьох країнах у зв'язку з етичних міркувань.

Внутрішньоматкове осіменіння через шийку матки значно підвищує результативність цієї процедури. Для цього використовується спеціальний катетер і методики (рис. 57-59).

Результативність процедури штучного осіменіння у кішок становить 20-70% з різних досліджень і багато в чому залежить і від кішки, і від кота. Якщо овуляція відбулася, якщо якість отриманої сперми хороша, шанс на вагіт-

ність досить високий. У нашій практиці близько 60% кішок завагітніли і мали багатоплідні посліди після запліднення.

Техніка вимагає анестезії для обох учасників процесу, непроста у прове-

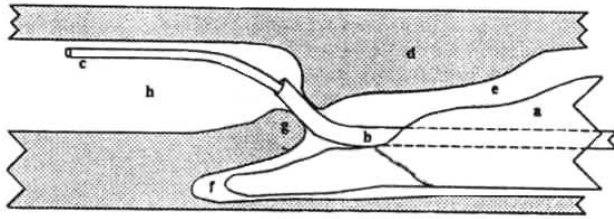


Рис. 58. Зовнішній вагінальний катетер (а) входить у вентральне вагінальне склепіння (f) і вирівнює трансцервікальний катетер (b) з каналом шийки матки (g), забезпечуючи внутрішньоматкове депонування сперми через внутрішній катетер (c) в матку (h). Дорсальна середина зацервікальна складка (d), піхва (e)

*Кількість спермій за штучного осіменіння кішок*

Результати вагітності після осіменіння замороженою спермою значно нижчі, ніж результати за використання свіжоодрержаної сперми. Є повідомлення, що принаймні  $5-50 \times 10^6$  спермій необхідні для стабільних результатів вагітності від 40 до 67% після вагінального осіменіння свіжоодрержаною спермою кота. За іншими даними для отримання результату вагітності 77,8% з вагінальним введенням свіжоодрержаної сперми необхідно  $80 \times 10^6$  спермій.

За хірургічного внутрішньоматкового осіменіння потрібно лише  $8 \times 10^6$  спермій, щоб отримати результат вагітності 80%. Повідомляється про рівень вагітності 10,7% при використанні  $50-100 \times 10^6$  спермій замороженовідталої сперми для вагінального осіменіння.

При використанні  $50 \times 10^6$  спермій деконсервованої сперми для внутрішньоматкового осіменіння повідомляють про рівень вагітності 57,1%.

Штучне осіменіння кішок, у тому числі одержання та зберігання сперми, не є поширеним методом племінної роботи за розведення котів, однак може стати таким у самому найближчому майбутньому. Завдяки зростанню знань

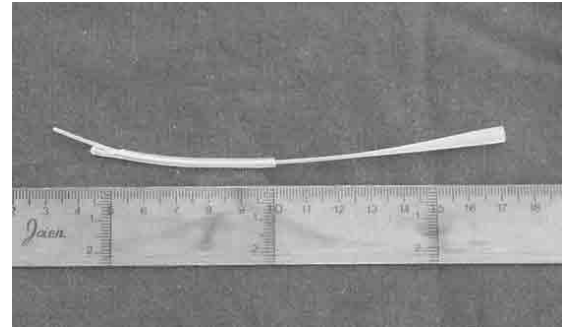


Рис. 57. Катетер для трансцервікального осіменіння кішок

денні, іноді вимагає запліднення на відкритій операції, суворого дотримання таймінгу.

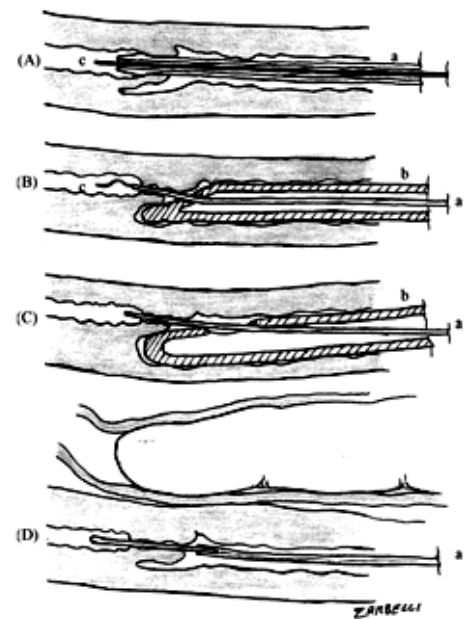


Рис. 59. Методика внутрішньоматкового штучного осіменіння кішок з використанням трансцервікального катетера від 1 до 2,7 мм (а) і дзеркала (b), описаного Hurlbut et al. 1988 (A), Swanson et al., 1994 (B), Chatdarong et al., 2001 (C), Zambelli et al., 2005 (D)

про репродуктивну фізіологію котів і вдосконаленню методів зберігання сперми, штучне осіменіння має потенціал стати такими ж цінними інструментами в розведенні кішок, як і для розведення інших видів тварин.

### **Ветеринарно-санітарні правила при штучному осіменінні**

При проведенні штучного запліднення сук необхідно суворо дотримуватись ветеринарно-санітарних правил, встановлених ветеринарним законодавством, а також при штучному заплідненні самок інших тварин.

За 4-5 год до роботи проводять генеральне прибирання приміщення за допомогою деззасобів, що не пахнуть, опромінюють бактерицидними лампами.

Зовнішні статеві органи тварини ретельно обмивають теплою водою з милом, зрошують теплим розчином фурациліну (1:5000), після чого витирають насухо ватним тампоном.

Перед операцією штучного запліднення необхідно ретельно мити руки з милом, спиртом за допомогою щітки, а потім обробляти їх 70% спиртом, садна, піднігтьові простори, згини суглобів пальців змащувати 5% йодом, потім одягати одноразові стерильні рукавички.

Інструменти та обладнання до та після використання стерилізують та зберігають, згідно з інструкціями, що додаються до них.

Після закінчення роботи також проводять ретельне механічне очищення приміщення з подальшою дезінфекцією.

### **Питання для самоперевірки**

1. Якими є переваги застосування штучного осіменіння?
2. Назвіть основні віхи в історії розвитку штучного осіменіння собак.
3. Зазначте вимоги відбору і утримання плідників.
4. Вкажіть особливості годівлі псів та котів.
5. Визначте правила одержання сперми від самців.
6. Які Ви знаєте методи одержання сперми від псів та котів?
7. Якими методами оцінюють якість сперми псів та котів? Назвіть допустимі показники.
8. Назвіть технологічні етапи роботи зі спермою.
9. Якими правилами користуються при розбавленні і зберіганні сперми?
10. Що являє собою банк сперми? Яке його призначення?
11. Які Вам відомі способи транспортування сперми?
12. Зазначте особливості використання свіжоодержаної та замороженої сперми.
13. Які методи використовують для визначення оптимального часу осіменіння сук?
14. Якою є техніка інтравагінального та трансцервікального штучного осіменіння сук?
15. Визначте особливості штучного осіменіння кішок.
16. Яких ветеринарно-санітарних правил необхідно дотримуватись за штучного осіменіння.

## 2.2. ТРАНСПЛАНТАЦІЯ ЕМБРІОНІВ

Трансплантація ембріонів – це біотехнологічний метод прискореного відтворення цінних у генетичному відношенні самок. Суть його полягає у перенесенні зародків із статевих органів тварин-донорів до статевих органів тварин-реципієнтів з розвитком в організмі останніх зародків і плодів за нормальної вагітності. Метод трансплантації зародків дозволяє більш ефективно використовувати генетичний потенціал самки і ввести селекцію гамет і зигот на основі оцінки за якістю потомства як самців-плідників, так і самок-донорів жіночих статевих клітин.

Теоретичною передумовою трансплантації ембріонів є можливість використання біологічних резервів репродуктивних органів самок, адже відомо що в яєчниках самок закладено завідомо надлишкову кількість фолікулів. Так, самки народжуються, маючи декілька десятків (навіть сотень) яйцеклітин, тоді як фактично «використовується» лише близько одного-двох десятків.

Задача ж полягає у стимуляції розвитку «резервних» фолікулів, що досягається гормональною обробкою тварин. Сучасні методи суперовуляції дозволяють збільшити у рази (десятки) яйцеклітин, що утворюються в яєчниках.

Враховуючи те, що за рік донора можна використовувати як мінімум декілька разів, перспективи трансплантації ембріонів стають більш, ніж очевидними.

Значення та переваги методу трансплантації ембріонів полягають у наступному:

1. Одержання від генетично цінних маток більшої кількості нащадків.
2. Пришвидшення темпів створення нових ліній, типів, порід тварин.
3. За ранньої ідентифікації статі створюється можливість для пересаджування лише одностатевих зародків, що дозволяє попередити народження фримартинів.
4. Пересадка зародків може проводитись самкам з метою усунення неплідності (якщо, скажімо, воно викликане непрохідністю яйцепроводів, спайками яєчників з яєчникомовою кишенею, порушенням умов у матці внаслідок старіння та в інших випадках).
5. Пересадка зародків дає можливість одержувати ідентичних близнюків (шляхом поділу морули чи ранньої бластоцисти на дві чи більше часток, переносити ядра соматичних клітин в зиготи і відтворювати потім подібних особин).
6. Великі можливості відкриває трансплантація зародків для розвитку генної інженерії (одержання трансгенних, химерних тварин і т. і.).
7. Пересадку зародків можна використовувати для вивчення багатьох питань фізіології і патології вагітності, міжвидової гібридизації.

8. Тривале зберігання зародків дозволяє створювати запаси (банки зародків) цінного зародків високопродуктивних і рідких порід тварин і можливість більш вигідного експортування чи імпортування генетичного матеріалу.

9. Можливість одержувати цінний у племінному відношенні приплід від тварин місцевих порід, що мають імунітет до окремих хвороб.

У сучасному собаківництві трансплантація ембріонів, ембріональне та соматичне клонування використовуються лише у лабораторних експериментах. Варто зазначити, що розробка методів трансплантації ембріонів вже успішно здійснена у багатьох свійських тварин і навіть у кішок.

Метод трансплантації ембріонів є інструментом в реалізації технології створення рідких та зникаючих видів тварин. У родині котячих (Felidae) ця проблема стоїть особливо гостро. І саме в цій родині на сьогодні є найбільші успіхи у застосуванні технологій, які є базовими при створенні кріобанку ембріонів, – кріоконсервації ембріонів та їх трансплантації.

### 2.2.1. Історія розвитку трансплантації ембріонів

Спроби дослідників пересадити запліднені яйцеклітини на ранніх стадіях розвитку в матку прийомної матері тривалий час закінчувалися невдачею. Головною причиною цих невдач було недотримання принципу синхронності статевого циклу донорів і реципієнтів.

Роком народження ембріотехнології вважається 1890 р. (за іншими даними – 1891 р.), завдяки вдалому дослідженню британського зоолога Уолтера Хіпа (Walter Heape) з Кембриджського університету. Він отримав два чотириклітинні ембріони 32-годинного віку від чистопородної ангорської кролиці і відразу ж переніс їх до матки кролиці породи бельгійський чемпіон, спарованої з самцем тієї ж породи. За місяць вона народила чотирьох бельгійських та двох довгошерстих ангорських кроленят.

У перших дослідках по трансплантації переслідувалися чисто наукові цілі – вивчався вплив навколишнього середовища матки реципієнта на зміну фенотипічних і генотипічних ознак пересаженого ембріону, а з 1930 р. після виявлення американськими дослідниками Х. Коулом (H.H. Cole) та Г. Хартом (G.H. Hart) в крові жеребих кобил у період з 40-го по 140-й дні вагітності гонадотропинів, здатних викликати множинну овуляцію (суперовуляцію) фолікулів у самок, з'явилася реальна можливість практичного використання методу трансплантації ембріонів у програмі розведення молочної худоби.

У 1933 р. з'явилися публікації про успішні експерименти на щурах (J.S. Nicholas), наступного (1934 р.) – на вівцях (B.L. Warwick et al.), в 1942 р. – на мишах (E. Fekete & C.C. Little), а в 50-60-70-х рр. – на інших тваринах і людині:

1950 р. – свині (О.В. Квасницький);

1951 р. – корови, хірургічний спосіб (E.L. Willet et al.);

1964 р. – корови, нехірургічний спосіб (L.R. Mutter et al.);

1968 р. – тхори (M.C. Chang);

1974 р. – коні (N. Oguri & Y. Tsutsumi);

1976 р. – бабуїни (D.C. Kraemer et al.);

1978 р. – людина (P.C. Steptoe & R.G. Edwards);

1978 р. – коти (M.D. Sehriver & D.C. Kraemer);

1979 р. – собаки (G.M. Kinney et al.).

Теоретичні основи і технологія хірургічної трансплантації були розроблені до початку 70-х рр. у Кембриджському університеті (у корів). До середини 70-х рр. центр досліджень перемістився до країн Північної Америки. Удосконаленню технології трансплантації ембріонів багато в чому сприяло створення інструментів та нехірургічного способу вилучення та пересадки ембріонів, у результаті чого вдалося значно спростити і здешевити техніку трансплантації зародків.

Комерційний інтерес до трансплантації ембріонів виник наприкінці 1960-х років, коли в США та Австралії вчені зайнялися удосконаленням м'ясної породи шароле, показавши явну перевагу над традиційними м'ясними породами.

Перший комерційний центр трансплантації ембріонів було створено при Макдональдському коледжі (Канада), співробітниками якого в період з 1965 по 1969 рр. успішно здійснено ембріотрансфер у кролиць, овець та свиней, а з 1973 р. – і у корів. Одночасно комерційні об'єднання виникали і в інших країнах. До 1976 р. було відкрито 20 комерційних фірм з трансплантації ембріонів у Північній Америці, 3 – в Австралії, 6 – в Новій Зеландії.

У Європі (Шотландія) в 1973 р. відкрився комплекс трансплантації ембріонів, перша комерційна фірма була створена в Данії у 1974 р., а 1976 р. – комерційний центр у Бремерхавені (ФРН).

Паралельно з відпрацюванням техніки трансплантації ембріонів проходили дослідження та в галузі кріоконсервації (заморожування в рідкому азоті) ембріонів лабораторних та сільськогосподарських тварин. У 1972 р. було вперше зареєстровано народження живої миші, яка розвинулася із заморожено-відталого ембріона, а наступного року з'явився на світ знаменитий Фрості-Морозко, бичок такого ж походження. Однак, трансплантуючи ембріони після заморожування, вчені отримували лише 34% приживлюваності. Пізніше було подолано 50%-ний рубіж приживлюваності розморожених ембріонів.

Вирішення низки складних проблем вимагало об'єднання зусиль, тому у 1974 р. було організовано Міжнародне товариство з трансплантації ембріонів (MOTЕ). Щорічні конференції товариства, обмін інформацією, обговорення невирішених проблем сприяли швидкому прогресу у галузі трансплантації ембріонів у країнах-учасниках, особливо Великобританії, США, Японії, Канаді, Франції.

У 1978 р. зародки миші вперше було розділено на дві половинки на стадії морули з наступною результативною пересадкою їх реципієнтам. У наступні роки було проведено успішні дослідження з одержання ідентичних двієнь шляхом розділення на половинки зародків корів, овець і коней, а масштаби застосування способу трансплантації зародків різко зросли.

Бурхливий розвиток наукових досліджень, поліпшення техніки пересадки ембріонів обумовили суттєве покращення результатів, які досягалися у виробничих умовах.



У подальшому було розроблено нові методи одержання зародків монозиготних близнюків – двієнь від корів, коней, свиней і овець, а також з 4-8-клітинних зародків – четверень корів і овець. Одержано і близнюків з четвертих частин зародків.

Для одержання запліднених яйцеклітин *in vitro* і наступної пересадки їх реципієнтам розроблені способи культивування ооцитів з яєчників забитих тварин (фолікулярних ооцитів). Досягнуто успіх запліднення *in vitro* тубальних (одержаних з яйцепроводів) зрілих ооцитів і наступної пересадки їх реципієнтам. У 1978 р. народилася (шляхом кесарева розтину) дівчинка у 30-річної жінки, якій було пересаджено запліднену поза організмом яйцеклітину. У 1982 р. вперше після запліднення тубальних ооцитів *in vitro* було одержано теля.

### 2.2.2. Етапи трансплантації ембріонів та їх характеристика

Метод трансплантації зародків включає ряд прийомів: викликання суперовуляції у донорів та їх осіменіння, вилучення запліднених яйцеклітин, синхронізацію статевої охоти у реципієнтів чи зберігання одержаних зародків до моменту пересадки реципієнтам з природною статевою охотою; пересадку зародків реципієнтам.

В основі технологічних рішень трансплантації лежать загально біологічні відомості щодо нервово-гормональної регуляції статевої функції, запліднення, внутрішньоутробного розвитку зиготи.

Роботу по трансплантації проводять у наступному порядку:

- добір донорів і реципієнтів;
- викликання множинної овуляції (суперовуляції) у донорів та їх осіменіння;
- одержання зародків від донорів;
- оцінка, культивування та зберігання зародків;
- синхронізація статевого циклу реципієнтів зі статевим циклом донорів; пересадка зародків на стадії морули чи бластули реципієнтам.

Добір донорів і реципієнтів. Донор – це високоцінна в генетичному відношенні тварина, від якої після гормонального викликання поліовуляції і осіменіння спермою перевіреного плідника-поліпшувача одержують декілька зародків з метою наступної пересадки реципієнтам.

Вимоги для донорів наступні:

1. Високі селекційні ознаки (породність, екстер'єр, конституція та ін.).
2. Повновікові тварини репродуктивного віку.
3. Закінчений фізіологічний перебіг післяродового періоду, повноцінний синхронний природний статевий цикл і яскраво виражені феномени, нормальний стан статевих органів і відтворний статус у попередній репродуктивний період.

4. Відсутність інфекційних та інвазійних захворювань та наявність ветеринарних свідоцтв і проходження відповідних ветеринарно-карантинних обробок.

5. Заключний добір донорів проводять після встановлення реакції яєчників на суперовуляцію – введення гонадотропних препаратів з пробним вилученням ембріонів.

Реципієнт – тварина, якій трансплантують (пересаджують) в матку зародки на ранній стадії їх розвитку. Після пересадки в організмі реципієнта повинні бути забезпечені оптимальні умови для подальшого розвитку зародку і народження життєздатного плода.

В якості реципієнтів використовують інтактних чи молодих самок з перевіреною здатністю до запліднення. До тварин-реципієнтів пред'являються ті ж вимоги, що й до донорів, за виключенням племінної цінності:

1. Тварини повинні бути добре розвиненими (фізіологічно зрілими).

2. Не можна використовувати дрібні породи для трансплантації їм зародків, одержаних від донорів крупних порід.

3. Тварини повинні бути здоровими, без ознак порушення обміну речовин, з хорошим фізичним розвитком, в стані середньої вгодованості, мати крупний, правильної форми таз.

4. Статеві цикли повинні бути регулярними і повноцінними, з синхронним формуванням стадії збудження; яєчники і матка повинні бути нормально розвинені, без патологічних змін.

5. Пересадка зародків реципієнтам проводиться при наявності функціонуючого жовтого тіла.

Викликання супер- (полі-) овуляції. Трансплантація зародків може бути ефективною в тому випадку, коли за один прийом від донора буде одержано декілька статевих клітин. А це можливо лише в результаті штучного викликання суперовуляції. Обробці підлягають лише ті тварини, які позитивно реагують на введення гормональних препаратів (див. вимоги до донорів), які вводяться суворо в середині естрального циклу (лютеальній фазі, тобто при наявності функціонуючого жовтого тіла), зберігаються і використовуються у відповідності до вимог інструкції.

Викликати суперовуляцію можна шляхом застосування гонадотропіну СЖК (сироватки жеребних кобил) чи очищеного ФСГ (фолікулостимулюючого гормону). Ці гормони застосовують в окремо чи в комплексі з гонадотропін-рилізінг-гормоном, простагландинами, естрогенами, хоріонічним гонадотропіном.

Гонадотропін СЖК одержують з сироватки вагітних кобил в період з 40-го по 130-й дні жеребності. Головна його перевага полягає в тому, що він має довгий (50...120 год.) період напіврозпаду, завдяки чому для викликання суперовуляції достатньо однократного введення тварині всієї дози препарату, що дозволяє скоротити витрати праці і зменшити стресову дію на тварин.

До переваг ГСЖК можна також віднести їх доступність, а головний недолік полягає у її високих антигенних властивостях, що імунізує оброблених тварин і робить проблематичним повторне використання донорів. Однак попередити небажані явища можна введенням антисироватки на СЖК.

За використання очищеного ФСГ одержують більш стабільні результати. Препарати ФСГ дають таку ж ефективність, але їх важче одержати. Їх одер-

жують з гіпофізу тварин (частіше за все свиней) або сечі клімактеричних жінок. ФСГ має нетривалий (біля 6 год.) період напіврозпаду, у зв'язку з чим, для підтримки необхідної для суперовуляції концентрації в крові, його вводять в організм протягом 4...5 діб вранці і ввечері з інтервалом між ін'єкціями 12 год.

Препарати ФСГ також мають різні назви у залежності від фірми-виробника: ФСГ-П (США), фоллітропін (Литва), "ФСГ-СУПЕР" (Росія), фоллікотропін (Чехія) та ін.

Загальноприйняті методики викликання суперовуляції передбачають введення через 48...56 год. після початку обробки гонадотропінами простагландину F<sub>2α</sub> чи його синтетичного аналогу клопростенолу, в результаті чого ознаки охоти настають через 48...72 год. Найбільш широко використовуються в наш час як лютеолітичні засоби препарати Естрофан, Ремофан (Спофа), Ензапрост (Угорщина), Еструмат (Англія), Простін (США).

Естрогени вводяться для підвищення заплідненості, а хоріонічний гонадотропін – для прискорення овуляції.

В оброблених тварин число овуляцій варіює у значних межах, що залежить від дози і якості гормональних препаратів, індивідуальних особливостей тварин та ряду інших факторів. Збільшення дози ГСЖК збільшує число зрілих фолікулів, але відсоток овуляцій може знизитись. Великі дози препарату нерідко викликають утворення кіст яєчників, геморагічних фолікулів чи їх лютеїнізацію. Деякі тварини зовсім не реагують на введення гонадотропних гормонів (їх може бути до 40 %). Існує і ряд інших проблем. Так, велика кількість фолікулів, що визрівають, призводить до подовження процесу овуляції на декілька діб, а це негативно відображається на заплідненості яйцеклітин і приживленості їх після пересадки реципієнтам. За множинних овуляцій заплідненість знижується, частина запліднених яйцеклітин втрачається внаслідок збільшення яєчника і нездатності лійки яйцепроводу сприймати їх. На результати обробки чинять вплив порода, вік тварин, сезон року (в зимові місяці число овуляцій знижується), лактація та ін.

Інший підхід одержання достатньої кількості зародків, який знаходиться в стадії розробки, – одержання яйцеклітин без посередньо з яєчників з подальшим створенням умов для їх визрівання та запліднення *in vitro*.

У кішок синхронізації донора і реципієнта досягають шляхом одночасного осіменіння донора і провокуючим овуляцію коїтусом реципієнтів з вазектомованим кролем.

Можна провокувати овуляцію у реципієнтів також і внутрішньом'язовим введенням лютеїнізуючого гормону.

Осіменіння донорів. Донорів осіменяють, дотримуючись тих же правил асептики, що й при штучному осіменінні звичайних тварин.

Для їх осіменіння беруть сперму видатних плідників, перевірених за якістю потомства і визнаних поліпшувачами. Добір самців і роботу зі спермою проводять з дотриманням ветеринарно-санітарних правил.

У тварин, оброблених гонадотропінами, охота настає через 3-5 діб, а при комбінованій обробці гонадотропінами та простагландину F 2 $\alpha$  – 75 год. після введення останнього.

При появі у тварин охоти їх осіменяють штучно і, оскільки охота й овуляція у оброблених з метою викликання суперовуляції тварин розтягується на 36-48 год., сперму вводять 3-4 рази збільшеною дозою сперми.

Після гормональної обробки донорів у 10-12% тварин ознаки стадії збудження статевого циклу не проявляються, тому осіменіння слід починати через 48...54 год. після введення простагландину.

Одержання зародків. Запліднення яйцеклітин відбувається у яйцепроводі. Зиготи, що утворилися, підлягають дробленню і потрапляють до матки. Тож вилучають їх саме звідси. Ембріони повинні бути на стадії пізньої морули або ранньої бластули.

Для одержання зародків використовують два способи: нехірургічний та хірургічний. За нехірургічного способу, перш за все, визначають кількість жовтих тіл в кожному яєчнику і проводять туалет та дезінфекцію зовнішніх статевих органів з промежиною.

Для вимивання зародків з матки застосовують різні інструменти. Частіше використовують дво- чи триходові катетери (типу Фоллея) з латексної гуми з пружним мандреном і надувним балончиком чи телескопічним комбінованим триходовим інструментом з внутрішнім еластичним катетером.

Інструмент вводять до порожнини матки через її шийку. В якості середовища для промивання матки використовують фосфатно-сольовий буфер Дюльбекко.

За хірургічного вилучення зародків підготовка тварини така ж, як і за порожнинного оперативного втручання. Для вимивання використовують двоканальний катетер Фолея з надувною кулькою з латексної гуми та спеціальною тупою голкою.

Вилучення зародків проводять при загальному чи місцевому знеболенні. Після розрізу черевної стінки підтягують один з рогів матки до поверхні рани, роблять невеликий розріз поблизу його основи (тіла матки) і вставляють в його порожнину катетер до згину у бік верхівки.

Хірургічний спосіб придатний для всіх видів тварин і людини. Однак, він складний, працемісткий, потребує великих витрат, його не можна часто повторювати, так як у післяопераційний період утворюються спайки, з-за чого виникають труднощі у вилученні зародків, а потім можуть розвиватись незворотні зміни, що призводять до неплідності донорів (табл. 13).

Пошук, оцінка та маніпулювання з зародками. Робота з пошуку і оцінки ембріонів проводиться в спеціальному стерильному боксі за температури 20-25°C. Зібрану в циліндр рідину відстоюють 20-35 хв. в термостаті при температурі 37°C, щоб зародки осіли на дно. Після чого верхню частину відсмоктують за допомогою сифону.

Якщо в промивальній рідині багато слизу і крові, то до неї додають розчини для вимивання ембріонів. Після додавання розчину осад гомогенізується і його центрифугують протягом 3-5 хв. при 3-5 тис. об./хв. Рідину, що за-

лишилася, виливають в чашки Петрі, дно яких для зручності пошуку розкреслено на квадрати 1×1 см.

Таблиця 13. Порівняльна оцінка методів вимивання ембріонів

Хірургічні	Нехірургічні
<i>Переваги</i>	
Донор нерухомий Забезпечення стерильності Безпосереднє маніпулювання з маткою Точна оцінка стану яєчників Потрібна невелика кількість промивної рідини	Донор відносно нерухомий Можливість пересадок у виробничих умовах Непотрібна голодна витримка Менші затрати часу Немає хірургічного ризику
<i>Недоліки</i>	
Утворення спайок Ризиковане застосування загального наркозу Складності застосування методу у лактуючих тварин Необхідне складне хірургічне обладнання Потрібна голодна витримка тварин	Необхідна висока техніка маніпулювання з рогами матки Потрібно набагато більша кількість промивної рідини на один ріг Важко забезпечити стерильність Іноді неможливо пройти цервікальний канал

Для проведення дослідження рідину чашки Петрі кілька разів коливають по колу, щоб виявити ембріони, які прилипли до стінок.

Знайдені ембріони піпеткою Пастера переносять на стерильні годинникові скельця або малі чашки Петрі з поживним середовищем для короткочасного зберігання ембріонів.

Якість ембріонів визначають наступними методами:

- візуально морфологічна оцінка;
- прижиттєве фарбування з використанням люмінесцентних фарбників;
- культивування за межами організму на протязі 24-48 год.

Морфологічну оцінку якості ембріонів проводять під мікроскопом або біокулярною лупою при 100-150-кратному збільшенні. Визначають стадію розвитку ембріонів (незапліднені яйцеклітини, ранні та пізні морули і бластоцити), а також їх якість (відмінні, добрі, задовільні, умовно придатні, непридатні).

Відстаючі від нормального розвитку ембріони з ознаками асинхронності дроблення бластомерів, їх дегенерації є непридатними для трансплантації. Ембріони з невеликими морфологічними змінами вважаються умовно придатними.

Однак на основі морфологічної оцінки не можна зробити остаточне заключення про їх життєздатність. Все залежить від їх розвитку в процесі культивування і приживлення в розі матки реципієнта.

*Прижиттєва оцінка ембріонів з використанням барвників* базується на різних ступенях проникнення барвників через прозору оболонку живих або мертвих ембріонів. Для фарбування використовують флюоресцеїн діацетат, 4,6-діаміно-2-фенілліндол та ін.

Прижиттєву оцінку ембріонів проводять таким чином: його розміщують на предметному склі, додають відповідний барвник, проводять інкубацію і досліджують під люмінесцентним мікроскопом. Живі ембріони дають червонувате свічення, мертві – зелене.

*Оцінка життєздатності ембріонів методом культивування.* Біологічно повноцінні ембріони при створенні оптимальних умов культивування продовжують свій розвиток. В якості поживного розчину використовують середовища: ТС-199, сольовий розчин Дюльбекко та інші з різними біологічними і синтетичними добавками. Осмотичний тиск середовищ чи розчинів повинний бути 300 міліосмолей, рН – 7,2-7,4.

Культивування ембріонів проводить у поживному середовищі в годинникових скельцях, на яке переносять піпеткою 25 крапель стерильного вазелінового масла, після цього шприцом з тонкою голкою підпускають під вазелінове масло 0,1 мл поживного середовища. Годинникове скельце розміщують в чашки Петрі і встановлюють в ексікатор, який ставлять в термостат при температурі 37<sup>0</sup>С. Протягом 10-20 хвилин через ексікатор пропускають газову суміш, яка має 90 % азоту, 5 % вуглекислого газу і 5 % кисню. Після цього з годинникових скельць, що знаходяться в ексікаторі, шприцом видаляють поживне середовище і в свіжій порції поживного середовища поміщують ембріон під вазелінове масло чашки Петрі з годинниковими скельцями знову переносять в ексікатор при 37<sup>0</sup>С і знов пропускають газову суміш, попередньо фільтруючи і зволожуючи її. Ексікатор щільно закривають, шланги для вводу газової суміші герметично перекривають зажимами і залишають в термостаті на період інкубації. Для контролю за рН в ексікатор ставлять бюкс з поживним середовищем, в яке додають індикатор феноловий червоний. При рН 7,2-7,3 феноловий червоний в розчині має оранжево-червоний колір. При залужуванні колір контрольного середовища буде малиновим, при закисленні – оранжевим.

*Культивування ембріонів в репродуктивних шляхах проміжного реципієнта (in vivo)* для транспортування і після реконструкції ембріона. Проміжним реципієнтом може бути лабораторна тварина (кролі, миші), тому що передімплантаційний ембріон толерантний до чужорідного середовища гетерогенного реципієнта.

Кращим місцем репродуктивного тракту проміжного реципієнта є яйцепровід. Зберігати ембріони можна на протязі такого часу, який вони знаходяться в природних умовах, не пізніше денудації. Знаходячись в яйцепроводах реципієнта, ембріони продовжують розвиток, але він може бути повільнішим у порівнянні з нормою. Ці обставини необхідно враховувати при виборі ступеня синхронізації кінцевого реципієнта.

Техніка підготовки проміжного реципієнта не складна. Перед введенням в яйцепровід ембріонів, його перев'язують поблизу матково-трубного з'єднання. В кожний яйцепровід можна пересадити звичайним способом до 25 ембріонів в невеликій кількості поживного середовища.

Відстаючі від нормального розвитку ембріони з ознаками асинхронності дроблення бластомерів, їх дегенерації – непридатні для трансплантації.

Незапліднені яйцеклітини мають правильні сфери, прозорий перивітеліновий простір, гомогенне розміщення цитоплазматичних тілець. Дегенеративні незапліднені яйцеклітини відрізняються деформацією прозорої оболонки; цитоплазма інколи займає весь перивітеліновий простір, відбувається зміщення ядра до одного з полюсів або периферії.

Морула являє собою скупчення бластомерів не завжди однакових за розмірами із-за асинхронного дроблення. Цитоплазма гомогенна, бластомери мають полігональний зв'язок. Перивітеліновий простір вільний від гранул і включень.

*Оцінка ембріонів з використанням люмінесцентних фарбників* ґрунтується на різному ступені проникнення фарбників через прозору оболонку живих і мертвих ембріонів. Для фарбування використовують акридиноранж, флуоресцеїндіацетат, 4,6-діаміно-2-феніліндол, 2,7-діаміно-10-етіл-9-фенілфенантри-діум бромід, 1-аніліно-нафталін-8-сульфанат.

Ембріони з рідиною розміщують на предметному склі і додають фарбник. Інкубацію ембріонів проводять на протязі 10 хв. при кімнатній температурі в темноті, після чого фарбник змивають розчином Локка і накривають покривним склом. Оцінку життєздатності проводять під люмінесцентним мікроскопом на протязі 1,5 хв. Живі клітини набувають червонуватого відтінку, а мертві – зеленуватого.

*Оцінку ембріонів методом культивування* проводять виходячи з того, що в біологічно повноцінних ембріонів при оптимальних умовах продовжується розвиток. Для культивування ембріонів застосовують поживні середовища: ТС-199, сольові розчини Дюльбекко з різними біологічними і синтетичними добавками.

Осмотичний тиск поживних середовищ повинен бути близько 300 міліосмолей, рН 7,2-7,4. Культивують ембріони в чашках Петрі в краплях поживних середовищ на годинникових скельцях під шаром вазелінового масла, і витримують їх у газовому середовищі, яке містить 90 % азоту, 5 % кисню, 5 % двооксиду вуглецю.

Більш простий спосіб – культивування ембріонів в пробірках і соломінах. Ембріони переносять в пробірку з 1 мл поживного середовища і після додавання трьох крапель вазелінового масла закривають алюмінієвою фольгою. Ембріони можна культивувати протягом 95 год.

Зберігання ембріонів. Крім зберігання ембріонів методом культивування, розроблено метод довготермінового зберігання із застосуванням глибокого заморожування (кріоконсервування) в рідкому азоті при температурі  $-196^{\circ}\text{C}$ .

Перевагою кріоконсервування являється тривале зберігання ембріонів, можливість їх транспортування і введення реципієнтам при необхідності (по мірі приходу реципієнтів спонтанно в охоту).

Заморожування ембріонів проводиться за допомогою автоматичних програмних приладів. Автоматичні програмні заморожувачі складаються із трьох основних частин: з електронного блоку, камери для заморожуван-

ня і ємкості з рідким азотом. Як холодоагент використовуються пари рідкого азоту.

*Підготовка ембріонів до заморожування.* Для заморожування використовують свіжоотримані ембріони відмінний та доброї якості. Роботи по заморожуванню проводять в стерильному боксі з використанням стерильних реактивів, посуду і обладнання.

З метою захисту ембріонів готують фосфатно-сольовий буфер (ФБС), до складу якого вводять 100000 од/л пеніциліну і 20 % сироватки крові. Концентрація кріопротектора – гліцерину складає від 1,0 М до 1,4 М. Починають насичувати ембріони з меншої концентрації, а готують кріопротектор, починаючи з більших концентрацій.

Насичення ембріонів гліцерином приводять при кімнатній температурі в малих чашках Петрі або на годинниковому склі, куди поміщають ембріони, що мають певну концентрацію. Ембріони відмінної якості можна насичувати в розчинах 1,0 або 1,4 концентрації гліцерину на протязі 30 хвилин без попередньої проводки. Підготовлені до заморожування ембріони переносять в скляні пробірки 50×6 мл або ампули місткістю 1 мл чи пластикові соломинки об'ємом 0,25 мл.

В кожен пробірку чи ампулу поміщають 1-4 ембріони одного донора в 0,3-0,4 мл розчину кріопротектора. В соломинках заморожують 1-2 ембріони. Заправку компонентів в соломинку проводять в такій послідовності: розчин гліцерину (2/5 об'єму), пухирець повітря, ембріони в 1,4 М розчині гліцерину (2/5 об'єму соломинки). Стовпчик розчину кріопротектора повинен доторкнутись до піжа в соломинці.

Пробірки з ембріонами закривають фольгою, скляні ампули за паюють, соломинки закривають спеціальними пластиковими пробками. Ємкість маркують і дані заносять в журнал.

Підготовлені ємкості з ембріонами поміщають у відповідне гніздо холодильної камери й охолоджують в режимі: від +20 до -6°C зі швидкістю 1°C/хв, штучна кристалізація; від -6°C до -35°C зі швидкістю 0,3°C/хв, перенесення ембріонів в рідкий азот.

При використанні кріопротектора гліцерину в концентрації 1,0 М штучну кристалізацію проводять в межах від -5°C до -6°C, і в концентрації 1,4 М – від -6°C до -7°C.

Для кристалізації доторкуються до верхнього краю стовпчика середовища подалі від ембріону пінцетом або іншим металевим предметом, переохолодженим в рідкому азоті.

Для зберігання і транспортування ембріонів використовують те ж обладнання, що й для сперми.

*Розморозжування ембріонів і підготовка їх до пересадки.* Розморозжування ембріонів проводять у водяній бані при температурі + 5°C або +37°C. Ємкість швидко витягують з каністри і опускають у водяну баню на 10-12 с до майже повного зникнення льоду. Під час розморозжування ємкість поступово переміщують у воді маятникоподібними рухами.



Розморожені ембріони в краплі розчину переносять на годинникове скло і проводять попередню морфологічну оцінку якості, а потім проводять відмивку ембріонів від кріопротектора в послідовності від більшої до меншої концентрації.

Після закінчення терміну перебування ембріонів в останньому розчині гліцерину з найбільш слабкою концентрацією їх тричі промивають в свіжих порціях середовища ФБС + 20 % сироватки крові, а потім поміщають в це ж середовище на 10-20 хв. Ембріони сумнівної якості витримують в термостаті при 37<sup>0</sup>С до 2 год, з подальшою їх морфологічною оцінкою.

Інструментарій для пересадки ембріонів готується в боксі в стерильних умовах. Катетери-шприци стерилізують кип'ятінням на протязі 30 хв. і до початку роботи з ембріонами витримують в настільному боксі під бактерицидною лампою. Перед початком роботи з ембріонами вмикають бактерицидні лампи.

Соломинки заповнюють в такій послідовності: 1 см середовища (ФБС), 1 см повітря, 1 см середовища з ембріоном, 1 см повітря, 1 см середовища (ФБС).

Соломинку вставляють в підігрітій до 37<sup>0</sup>С катетер для введення, поміщають в чохол, вставляють в контейнер і в горизонтальному положенні переносять до місця введення.

Синхронізація статевого циклу донорів і реципієнтів. При пересадці зародків стан всього організму і статеві системи реципієнта, в тому числі стан яєчників, фаза диференціювання ендометрію, повинні відповідати стадії розвитку зародків. Лише в цьому випадку останні потрапляють в умови, сприятливі для їх приживлення і розвитку. Якщо різниця в строках прояву статевого циклу між донором та реципієнтом складає більше 24 год., то частота вагітностей після пересадок різко знижується. Пересадку зародків краще проводити за умови точної синхронності статевого циклу у донорів і реципієнтів. У випадку неточного співпадіння перевагу надають реципієнтам, у яких охота проявилася дещо раніше, ніж у донорів.

При використанні заморожених зародків немає необхідності в синхронізації статевого циклу реципієнтів і донорів. В цьому випадку зародки можна пересаджувати в строки, коли у реципієнтів природно настають відповідні дні статевого циклу.

Однак частіше статеві цикли донора і реципієнта синхронізують штучно. Досягається це ін'єкцією лютеолітичних засобів – простагландину тваринам-реципієнтам в той же термін, що й коровам-донорам.

Якщо синхронізація охоти проводиться препаратами гестагенів в комбінації з простагландином, то обов'язковою умовою для включення самок в групу реципієнтів є наявність у них природної статевої циклічності, незалежно від стадії циклу в розвитку жовтого тіла. Строки початку застосування гестагенів вираховують виходячи з тривалості їх дії.

Пересадка і підсадка ембріонів реципієнтам. Пересадка від підсадки відрізняються тим, що в першому випадку ембріони вводять синхронізованому реципієнту, який не осіменявся паралельно з донором. Якщо ж реципієнта

осіменяли одночасно з донором, то йому ембріони підсаджують в ріг матки, з боку якого в яєчнику немає жовтих тіл.

Як за хірургічної, так і не хірургічної пересадки ембріонів їх намагаються помістити ближче до верхівок рогів матки.

Хірургічний метод потребує операційної практики, спеціальних приміщень, відповідного обладнання і інструментів. Цей метод дозволяє ввести ембріони глибоко в ріг матки, але він належить до порожнинних операцій, тому необхідно дотримуватись суворої стерильності, тварині наносяться травми при резекції, що не дозволяє використовувати реципієнта багаторазово. Ефективність хірургічної пересадки ембріонів становить 60-70%.

На результат трансплантації ембріонів впливає чимало факторів, які тісно взаємопов'язані між собою, що їх неможливо розділити по значенню:

1. Технічні прийоми проведення трансплантації (хірургічний, не хірургічний).
2. Вік ембріона та його розміри.
3. Рівень синхронності статевих циклів.
4. Пора року.
5. Кваліфікація репродуктолога.
6. Місце введення ембріону.
7. Умови та тривалість культивування ембріонів в проміжку між вимиванням і пересадкою.
8. Індивідуальність донора.
9. Науково-обґрунтована годівля та утримання донорів і реципієнтів.

### ***2.2.3. Ветеринарно-санітарні правила роботи при трансплантації ембріонів:***

✓ В лабораторії і боксі, де працюють з ембріонами, а також у приміщенні для кріоконсервації та зберігання ембріонів мають право знаходитись тільки працюючі там співробітники.

✓ Бокси для роботи з ембріонами повинні знезаражуватись на протязі 30 хв., з розрахунку 2-3 хв. на 1 м<sup>3</sup> об'єму. Приміщення боксу не рідше одного разу в тиждень ретельно вимивають і протирають розчином 3 %-ного перекису водню з миючими засобами.

✓ В день роботи з ембріонами столи протирають ватно-марлевими тампонами, які змочені в 96° етиловому спирті.

✓ Інструменти і посуд ретельно миють при допомозі щіток і йоржиків миючим порошком, промивають проточною водою і тричі дистильованою, висушують і стерилізують.

✓ Стерилізація кип'ятінням проводиться на протязі 30 хв. після закипання води при закритій кришці стерилізатора.

✓ Стерилізація сухим жаром проводиться в сушильних шафах, в яких розміщують сухі чисті скляні інструменти, посуд, що завернуті в пергаментний папір або фольгу для харчових цілей.

✓ Доводять до температури +140...+170°C і витримують 1-2 год., а потім дають охолонути.

✓ Стерилізація в автоклаві (скляний посуд, металічні інструменти, халати та ін.) проводиться при 1,5 атм. на протязі 30 хвилин. Скляні та металеві предмети закривають пергаментним папером.

✓ Хімічним методом стерилізують вироби з пластмаси, гуми тощо) проводиться використовують 70° спирт, 5 % розчин хлораміну на протязі 24 годин. Перед використанням інструменти 2-3 рази промивають дистильованою водою і фосфатно-буферним середовищем.

✓ Поверхню виробів із пластмаси і гуми можна також стерилізувати опроміненням лампи БУВ-30 протягом 20 хв. на віддалі 30 см від джерела ультра фіолетового пристрою. При цьому треба мати на увазі, що промені не забезпечують повної стерилізації внутрішньої поверхні порожнинних предметів.

✓ Однак переваги від трансплантації зародків досягаються лише за чіткого повсякденного здійсненні комплексу заходів, найважливішими елементами яких є наявність здорових, конституційно кріпких донорів та реципієнтів, забезпечених повноцінною годівлею, відповідним утриманням і правильною експлуатацією; висококваліфікованих фахівців; належного обладнання і оснащення.

### **Питання для самоперевірки**

1. В чому полягають значення та переваги методу трансплантації ембріонів?
2. Назвіть основні етапи розвитку трансплантації ембріонів.
3. Зазначте технологічні етапи трансплантації ембріонів та дайте їх характеристику.
4. Дайте порівняльну оцінку методів вимивання та пересадки ембріонів.
5. Вкажіть фактори впливу на результат трансплантації ембріонів.
6. Які ветеринарно-санітарні правила необхідно виконувати при трансплантації ембріонів?

### 3. ЛІТЕРАТУРА

Березовський А.В. та Харенко М.І. (Ред.). Фізіологія та патологія розмноження дрібних тварин: навчальний посібник. 2-е видання, перероблене і доповнене. Житомир: Полісся, 2017. 392 с.

Валюшкин К.Д., Медведєв Г.Ф. Акушерство, гинекологія і біотехніка розмноження животнох. 2-е изд., перераб. и доп. Минск: Ураджай, 2001. 869 с.

Гончаров В.П., Черепакін Д.А. Акушерство, гинекологія і біотехніка розмноження животнох. М.: Колос С, 2004. 328 с.

Деркач С.С. Динаміка електричного опору слизової оболонки піхви під час тічки у сук службових порід. Наук. вісник Львів. нац. ун-ту. вет. медицини та біотехнологій ім. С. З. Гжицького. 2010. Т. 12, № 2 (44), Ч. 2. С. 70-75.

Деркач С.С., Кравцова Д.І. Стан та перспективи штучного осіменіння сук кріоконсервованою спермою у репродуктології собак. Український часопис ветеринарних наук. 2017. № 273. С. 258-266.

Деркач С.С., Любецький Я.В. Минуле та сьогодення розвитку штучного осіменіння сук у світі. Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України. 2009. № 136. С. 188-195.

Деркач С.С. Особливості отримання та оцінка якості сперми пса-репродуктора. Ветеринарна медицина України. 2015. №4 (230). С. 17-21.

Деркач С.С., Любецький В.Й., Вальчук О.А., Мельник В.В. Цитологічні зміни епітелію слизової оболонки піхви під час тічки у сук. Ветеринарна практика. 2010. № 12. С. 16-19.

Дюльгер Г.П., Дюльгер П.Г., Седлецкая Е.С., Колядина Н.И. Современные методы искусственного осеменения собак. Российский ветеринарный журнал. 2017. №8. С. 34-38.

Дюльгер Г.П. Физиология размножения и репродуктивная патология собак. М.: Колос, 2002. 152 с.

Ерохин А.С., Квичко И.Л. Использование свежей, охлажденной и криоконсервированной спермы при искусственном осеменении собак: обзор иностранной литературы. Сельскохозяйственная биология. 1998. № 4. С. 114-120.

Закон України № 3447-IV від 21.02.06 р. «Про захист тварин від жорстокого поводження». Відомості Верховної Ради України. 2006. № 27. С. 990, ст. 230 [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/3447-15#Text>.

Искусственное осеменение у собак [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.proplan.ru/breeders/medicina/iskusstvennoe-osemenenie-u-sobak>.

Карпов В.А. Акушерство и гинекология мелких домашних животных. М.: Росагропромиздат, 1990. 288 с.

Коростелева Н.И., Громова Т.В., Жукова И.Г. Биотехнология: учебное пособие. Барнаул: Изд-во АГАУ, 2006. 127 с.

Красота В.Ф., Завертяев Б.П., Меркурьева Е.К., Никитин А.К. Биотехнология в животноводстве. М.: Колос, 1994. 127 с.

Любецький В.Й., Деркач С.С., Слепченко В.М., Михайлюк М.М., Вальчук О.А., Любецький Я.В. Штучне осіменіння собак: методичні рекомендації. К.: ТОВ «Анва-принт», 2010. 30 с.

Миролюбов М.Г., Иванов В.В., Равилов Р.Х. Искусственное осеменение собак. Казань, 2003. 20 с.

Никитин В.Я. и Миролюбов М.Г. (Ред.). Ветеринарное акушерство, гинекология и биотехника размножения. 7-е изд., перераб. и доп. М.: Колос, 1999. 495 с.

Никульников В.С. Биотехнология в животноводстве: учебное пособие. М.: КолосС, 2007. 534 с.

Осташко Ф.И. Биотехнология воспроизведения крупного рогатого скота. К.: Аграрна Наука, 1995. 183 с.

Племяшов К.В., Баженова Н.Б., Смышляев И.В., Ладанова М.А., Богданова С.С. Искусственное осеменение собак. Вопросы нормативно-правового урегулирования в ветеринарии. 2016. № 47. С. 134-136.

Полянцев Н.И., Подберезный В.В. Ветеринарное акушерство и биотехника репродукции животных: учеб. пос. Ростов н/Д: Феникс, 2001. 480 с.

Склярів П.М., Іванченко І.М., Іванченко М.М. Штучне осіменіння в собаківництві. Проблеми зооінженерії та ветеринарної медицини: зб. наук. праць ХДЗВА, присвячений 150-річчю Харк. зоовет. ін.-ту. Харків, 2001. Вип. 9 (33), Ч. 2. С. 89-92.

Симпсон Дж., Ингланд Г., Харви М. Руководство по репродукции и неонатологии собак и кошек. М.: Софион, 2005. 280 с.

Шалабот Н.Е. (Ред.). Собаководство (биология размножения и развития, генетические основы племенного дела, патология органов размножения и воспроизводства, технология выращивания собак): учебник. Пермь: ФГК ВОУ ВПО «Пермский военный институт ВВ МВД России», 2014. 522 с.

Яблонський В.А. (Ред.). Біотехнологічні і молекулярно-генетичні основи відтворення тварин. Львів: ТзОВ «ВФ «Афіша»», 2009. 218 с.

Яблонський В.А. та Хомин С.П. (Ред.). Ветеринарне акушерство, гінекологія та біотехнологія відтворення тварин з основами андрології: підручник. Вінниця: Нова Книга, 2006. 592 с.

Althouse G.C., Ko J.C., Hopkins S.M., Evans L.E. Effect of latex and vinyl examination gloves on canine spermatozoal motility. Journal of the American Veterinary Medical Association. 1991. Vol. 199, Is. 2. P. 227-229.

Axnér E., Linde Forsberg C. Semen Collection and Assessment, and Artificial Insemination in the Cat. Recent Advances in Small Animal [Electronic resource]. Access mode: Reproduction <https://www.ivis.org/library/recent-advances-small-animal-reproduction/semen-collection-and-assessment-and-artificial>.

Axner E., Strom B., Linde-Forsberg C., Gustavsson I., Lindblad K., Wallgren M. Reproductive disorders in 10 domestic male cats. Journal of Small Animal Practice. 1996. Vol. 37. P. 394-401.

Axner E., Strom B., Linde-Forsberg C. Sperm morphology is better in the second ejaculate than in the first in domestic cats electroejaculated twice during the same period of anesthesia. Theriogenology. 1997. Vol. 47. P. 929-934.

Chakraborty P.K., Wildt D.E., Seager S.W.J. Serum luteinizing hormone and ovulatory response to luteinizing hormone-releasing hormone in the estrous and anestrus domestic cat. *Laboratory Animal Science*. 1979. Vol. 29. P. 338-344.

Chastant-Maillard S., Chebrou M., Thoumire S., Saint-Dizier M., Chodkiewicz M., Reynaud K. Embryo biotechnology in the dog: a review. *Reproduction, Fertility and Development*. 2010. Vol. 22, Is. 7. P. 1049-1056.

Comizzoli P., Mermillod P., Mauget R. Reproductive biotechnologies for endangered mammalian species. *Reprod. Nutr. Dev.* 2000. Vol. 40. P. 493-504.

Dooley M.P., Pineda M.H. Effect of method of collection on seminal characteristics of the domestic cat. *American Journal of Veterinary Research*. 1986. Vol. 47. P. 286-292.

Dooley M.P., Pineda M.H., Hopper J.G., Hsu W.H. Retrograde flow of spermatozoa into the urinary bladder of cats during electroejaculation, collection of semen with an artificial vagina, and mating. *American Journal of Veterinary Research*. 1991. Vol. 52. P. 687-691.

Dubiel A. (Red.). *Rozród psów*. Wrocław, 2000. 491 s.

Dubiel A. Obserwacje nad unasiennianiem suk. *Medycyna Wet.* 1973. № 29. S. 551-553.

Edens M.S., Heath A.M. Breeding management in the bitch and queen. In: Root Kustritz M.V. (Ed.). *Small Animal Theriogenology*. St. Louis, Elsevier Science, 2003. P. 33-60.

Eilts B.E., Paccamonti D.L., Pinto C. Artificial insemination in the dog. *Small animal theriogenology*. 2003. P. 61-95.

England G. C., Russo M., Freeman S.L. Artificial insemination in dogs and cats 1. Collection and preservation of canine semen. *In Practice*. 2014. Vol. 36, Is. 2. P. 77-83.

England G. C., Russo M., Freeman S.L. Artificial insemination in dogs and cats 2. Artificial insemination in dogs. *In Practice*. 2014. Vol. 36, Is. 4. P. 183-190.

England G.C., Russo M. Artificial insemination in dogs and cats 3. Semen preservation and artificial insemination in cats. *In Practice*. 2014. Vol. 36, Is. 5. P. 249-254.

Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects: World Medical Association Declaration of Helsinki. *Bulletin of the World Health Organization*. 2001. Vol. 79, Is. 4. P. 373-374.

European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Council of Europe, Strasbourg, 1986. 53 p.

Fayrer-Hosken R. Embryo transfer in the dog and cat. *Theriogenology*. 2007. Vol. 68, Is. 3. P. 382-385.

Fontbonne A., Badinand F. Canine artificial insemination with frozen semen: Comparison of intravaginal and intrauterine deposition of semen. *J Reprod Fert.* 1993. Suppl. 47. P. 325-327.

Gill H.P., Kaufman C.F., Foote R.H., Kirk R.W. Artificial insemination of beagle bitches with freshly collected, liquid-stored, and frozen-stored semen. *American journal of veterinary research*. 1970. Vol. 31. P. 1807-1813.

Glover T.T., Watson P.F. The effects of egg yolk, the low density lipoprotein fraction of egg yolk, and three monosaccharides on the survival of cat (*Felis catus*) spermatozoa stored at 5 °C. *Animal Reproduction Science*. 1987. Vol. 13. P. 229-237.

Glover T.T., Watson P.F. The effect of buffer osmolality on the survival of cat (*Felis catus*) spermatozoa at 5 °C. *Theriogenology*. 1985. Vol. 24. P. 449-456.

Iguer-Ouada M., Verstegen J. Long-term preservation of chilled canine semen: effect of commercial and laboratory prepared extenders. *Theriogenology* 2001. Vol. 55, Is. 2. P. 671-684.

Johnston S.D., Root Kustritz M.V., Olson P.N. (Eds). Breeding management and artificial insemination in the bitch. In: *Canine and Feline Theriogenology*. Philadelphia, WB Saunders, 2001. P. 41-65, 287-306.

Kinney G.M., Pennycook J.W., Schriver M.D., Templeton J.W., Kraemer D.C. Surgical collection and transfer of canine embryos. *Biol. Reprod.* 1979. Vol. 20. P. 96.

Linde-Forsberg C, Forsberg M: Results of 527 controlled artificial inseminations in dogs. *J Reprod Fert.* 1993. Suppl 47. P. 313-323.

Linde-Forsberg C., Forsberg M. Fertility in dogs in relation to semen quality and the time and site of insemination with fresh and frozen semen. *J Reprod Fert.* 1989. Suppl. 39. P. 299-310.

Linde-Forsberg C. Achieving pregnancy by using frozen canine chilled extended semen. *Veterinary Clinics of North America-Small Animal Practice*. 1990. Vol. 21. P. 467-485.

Mason S.J., Rous N.R. Comparison of endoscopic-assisted transcervical and laparotomy insemination with frozen-thawed dog semen: A retrospective clinical study. *Theriogenology*. 2014. Vol. 82, Is. 6. P. 844-850.

Nizanski W. Ustalenie optymalnego terminu krycia I sztucznej inseminacji suk. *Weterynaria w praktyce*. 2004. № 1. C. 6-10.

Nizanski W., Deyneka G., Klimowicz M. Praktyczni uwagi na temat pobierania i oceny nasienia psa. Cz. 1. *Magazyn Wete rynarijny*. 2005. № 14 (100). S. 49-51.

Nizanski W., Deyneka G., Klimowicz M. Praktyczni uwagi na temat pobierania i oceny nasienia psa. Cz. 2. *Magazyn Wete rynarijny*. 2005. № 14 (102). S. 8-12.

Nizanski W., Dubiel A., Bielas W., Deyneka G.J. Effects of three cryopreservation methods and two semen extenders on the quality of dog semen after thawing. *J. Reprod. Fert.* 2001. № 57. P.365-369.

Payan-Carreira R., Miranda S., Nizański W. Artificial insemination in dogs. *Artificial insemination in farm animals*. 2011. Rieka: InTech. P. 51-78.

Platz C.C., Seager S.W.J. Semen collection by electroejaculation in the domestic cat. *Journal of the American Veterinary Association*. 1978. Vol. 173. P. 1353-1355.

Platz C.C., Wildt D.E., Seager S.W.J. Pregnancy in the domestic cat after artificial insemination with previously frozen spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1978. Vol. 52. P. 279-282.

Pope C.E., Turner J.L., Quatman S.P., Dresser B.L. Semen storage in the domestic felid: a comparison of cryopreservation methods and storage temperatures. *Biology of Reproduction*. 1991. Vol. 44, Suppl. 1. P. 117.

Rijsselaere T., Van Soom A. Semen collection, assessment and artificial insemination in the cat. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*. 2010. Vol. 79, Is. 6. P. 467-470.

Romagnoli S., Lopate C. Transcervical artificial insemination in dogs and cats: review of the technique and practical aspects. *Reproduction in Domestic Animals*. 2014. Vol. 49. P. 56-63.

Root M.V., Johnston S.D. Basics for a complete reproductive examination of the male dog. *Semin Vet Med Surg (Small Anim)*. 1994. Vol. 9, No. 1. P. 41-45.

Schriver M.D., Kraemer D.C. Embryo transfer in the domestic feline. *Am Assoc Lab Anim Sci Publ*. 1978. Vol. 78-4. P. 12.

Silva L.D.M., Onclin K., Lejeune B., Verstegen J. P. Comparison of intravaginal and intrauterine insemination of bitches with fresh and frozen semen. *Vet Rec*. 1996. Vol. 138. P. 154-157.

Sodenberg S.F. Canine breeding management. *Vet Clin North Am*. 1986. Vol. 16, Is. 3. P. 419-433.

Sojka N.J., Jennings L.L., Hamner C.E. Artificial insemination in the cat (*Felis catus* L.). *Laboratory Animal Care*. 1970. Vol. 20. P. 198-204.

Threlfall W. Semen collection and evaluation. In: Root Kustritz M.V. (Ed.): *Small Animal Theriogenology*. St. Louis, Elsevier Science, 2003. P. 97-123.

Tsutsui T. Artificial insemination in domestic cats (*Felis catus*). *Theriogenology*. 2006. Vol. 66, Is. 1. P. 122-125.

Universal declaration of animal rights [Electronic resource]. Access mode: <https://constitutii.files.wordpress.com/2016/06/file-id-607.pdf>.

Watson P.F., Glover T.E. Vaginal anatomy of the domestic cat (*Felis catus*) in relation to copulation and artificial insemination. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1993. Suppl. 47. P. 355-359.

Wilson M.S. Non-surgical intrauterine artificial insemination in bitches using frozen semen. *J Reprod Fert*. 1993. Suppl. 47. 307-311.

Wood T.C., Swanson W.F., Davis R.M., Anderson J.E., Wildt D.E. Functionality of sperm from normo-versus teratospermic domestic cats cryopreserved in pellets or straw containers. *Theriogenology*. 1993. Vol. 39: 342.

Zambelli D., Cunto M. Transcervical artificial insemination in the cat. *Theriogenology*. 2005. Vol. 64, Is. 3. Vol. 698-705.







*Навчальне видання*

СКЛЯРОВ Павло Миколайович

***БІОТЕХНОЛОГІЯ  
ВІДТВОРЕННЯ  
СОБАК І КОТІВ***

*НАВЧАЛЬНИЙ ПОСІБНИК*

---

Підписано до друку 28.04.2022 р. Формат 60×84/16. Папір А4. Гарнітура Times New Roman.

Друк лазерний. Умовн.–друк арк. 5,62. Тираж 100 прим. Ціна договірна.

Надруковано ФОП Шлюпенков О.А.

