

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
МИКОЛАЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ

В. О. Мельник, О. О. Кравченко

АКУШЕРСТВО, ГІНЕКОЛОГІЯ І
БІОТЕХНОЛОГІЯ ВІДТВОРЕННЯ ТВАРИН

Конспект лекцій

Миколаїв
2018

УДК 636.082. (038)

М13

Автори: В. О. Мельник, О. О. Кравченко

Друкується за рішенням науково-методичної комісії факультету ТВШТГСБ Миколаївського національного аграрного університету від 23 травня 2018 р., протокол № 9.

Рецензенти:

- І. М. Рожков – доктор біологічних наук, професор кафедри теорії та методики фізичної культури МНУ ім. В.О. Сухомлинського;
О. І. Юлевич – кандидат технічних наук, доцент кафедри генетики, годівлі тварин та біотехнології МНАУ

Мельник В. О.

М13 Акушерство, гінекологія і біотехнологія відтворення тварин : конспект лекцій / В. О. Мельник, О. О. Кравченко. – Миколаїв : МНАУ, 2018. – 140 с.

У конспекті лекцій викладено сучасні матеріали, теоретичні передумови і виробничо-господарські основи акушерства, гінекології, андрології та трансплантації ембріонів тварин. Розкрито суть головних біотехнологічних процесів відтворення, таких як клонування ембріонів, одержання монозиготних близнюків, створення химерних тварин.

Висвітлено новітні дослідження в біотехнології розмноження: культивування та запліднення ооцитів *in vitro*, одержання двоєн, регулювання статі плода, одержання трансгенних тварин, створення химер, клонування тварин.

Конспект лекцій призначений для здобувачів вищої освіти ступеня «магістр» освітньої спеціальності 204 «Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва».

УДК 636.082. (038)

© Миколаївський національний аграрний університет, 2018

© Мельник В.О., Кравченко О.О., 2018

ЗМІСТ

Лекція 1. Вступ в дисципліну. Фізіологія вагітності тварин.....	4
Лекція 2. Діагностика вагітності. Патологія вагітності. Аборти...	14
Лекція 3. Фізіологія, патологія та ускладнення в період родів.....	29
Лекція 4. Фізіологія, патологія та ускладнення у післяродовий період.....	46
Лекція 5. Неонатологія.....	61
Лекція 6. Фізіологічні основи трансплантації ембріонів.....	75
Лекція 7. Технологія видобування ембріонів у тварин-донорів...	83
Лекція 8. Оцінка, культивування та зберігання ембріонів.....	94
Лекція 9. Клонування ембріонів тварин.....	105

ЛЕКЦІЯ 1

Вступ в дисципліну. Фізіологія вагітності тварин

План:

1. Короткий зміст курсу. Завдання акушерської науки.
2. Історія виникнення і розвитку акушерської науки.
3. Визначення, термінологія і види вагітності.
4. Плацентажія і значення плодових оболонок.
5. Плацента, її структура і функції.

1. Короткий зміст курсу. Завдання акушерської науки.

«Акушерство, гінекологія і біотехнологія розмноження сільськогосподарських тварин» є клінічною дисципліною, яку вивчають протягом семестру і яка розвиває у студента клінічне мислення, формує технолога. Запитання з курсу введені до державного екзамену. Студенти, що схильні до наукової роботи, у періоди навчання або виробничої практики мають можливість проводити дослідження, результати яких можуть бути оформлені у вигляді дипломної та випускної магістерської роботи.

Робоча програма з дисципліни розрахована на 108 год, з яких лекційних – 18, практичних – 18, лабораторних – 18, самостійна робота – 54 год. За семестр здається три модулі.

Акушерство (від *фр.* accouchement – роди, пологи, або accoucher – народжувати) – галузь тваринництва, яка вивчає фізіологічні і патологічні процеси в організмі самки і плода, пов'язані з вагітністю, пологами і післяпологовим періодом. Воно складається з таких розділів: анатомія і фізіологія статевих органів вагітних самок (вивчаються морфо- функціональні особливості статевих органів самок різних видів тварин у порівняльному аспекті, вагітність (фізіологія, діагностика і патологія); роди (фізіологія і патологія, рододопомога, стимуляція родів); післяродовий період, його фізіологія і патологія; неонатологія (фізіологія і патологія новонароджених); мастологія (фізіологія і патологія молочної залози).

Гінекологія (від *грец.* gyne – жінка, самка) – галузь тваринництва, яка вивчає патологічні процеси статевих та інших органів самки, що виникають по завершенню післяродового періоду і

призводять до неплідності.

Таким чином, якщо говорити про акушерські захворювання, то вони діагностуються у період вагітності, родів і в післяродовому періоді. До акушерських слід віднести також захворювання молочної залози і новонароджених.

Гінекологічні захворювання реєструють у неплідних тварин після завершення післяродового періоду, у корови, наприклад, у випадку, якщо вона не завагітніла протягом 30 днів після родів.

Отже, гінекологія має тісний зв'язок з акушерством, що визначається не тільки спільністю органів, в яких відбувається перебіг нормальних і патологічних процесів, але й взаємною обумовленістю цих процесів. Враження статевих органів порушує запліднюваність і перебіг вагітності, родів і післяродового періоду, але й патологія перебігу вагітності й родів, як і післяродового періоду часто стають прямими причинами наступних гінекологічних захворювань. Тому сучасні акушерство і гінекологія складають єдину цілісну науку і дисципліну.

Андрологія (від грец. andros – чоловік, самець) – галузь тваринництва, яка вивчає патологічні процеси статевих та інших органів самців, котрі призводять до неплідності або імпотенції.

Біотехнологія розмноження сільськогосподарських тварин – це галузь тваринництва, яка вивчає питання штучного осіменіння і трансплантації ембріонів.

Завдання акушерської науки:

1. Розробка ефективних методів регуляції і управління функцією розмноження тварин.
2. Покращення методів штучного осіменіння і трансплантації зародків.
3. Підвищення запліднюваності і плодючості самок.
4. Розробка методів ранньої діагностики вагітності.
5. Розробка системи профілактичних і лікувальних заходів при різних акушерських захворюваннях і неплідності тварин для отримання найбільшої кількості приплоду і підвищення продуктивності.

2. Історія виникнення і розвитку акушерської науки.

Акушерство відноситься до найдавніших клінічних галузей тваринництва. Воно зародилося у часи неоліту, коли з'явилися природні поля ячменю та пшениці, що обумовило осілий спосіб

життя людей, перетворивши їх із мисливців у землеробів. За таких умов люди почали приручати тварин, набували досвіду догляду за ними, мали можливість довго споглядати їх. Можливо, це і дозволило зробити співставлення між коїтусом і вагітністю, між ізоляцією статей і неплідністю.

Поява на світ новонародженого і патологія родів у тварини завжди привертають до себе увагу людини. Первісні люди жили поряд з тваринами і звичайно спостерігали елементи «акушерської самопомоги», коли кобила розриває плодові оболонки лошати, щойно народженого у плодовому міхурі, відкусує пуповину, облизує новонародженого або коли собака витягує зубами послід або й цуценят. Виникла необхідність у найпростіших прийомах допомоги роділлі.

Із надписів, знайдених на стінах єгипетських храмів, а також у папірусах, ми знаємо, що вже на початку першого тисячоліття єгиптяни вважали, що саме сім'я чоловіка запліднює жінку. У папірусі Есенджерера сказано: «Дійсно, що всі матки народжують, починаючи із сім'я, яке вони отримують, а сім'я народжують сухожилля і кістки». Дискусії про походження сперми точилися протягом багатьох віків до самого 18 століття.

Поворотними відкриттями у репродуктології можна вважати:

- Опис Реньє де Граафом в 1671 р. дозрілого фолікула яєчника став головним аргументом овістів;
- Відкриття Антоні ван Левенгуком в 1677 р. сперміїв. Спермій був урочисто показаний королю Англії Шарлю II, французькому королю, а потім пішов по всьому світу. Вища знать із задоволенням спостерігала за своїм веселим потомством. Це відкриття було основою анімалькулізму;
- Доведення Лазаро Спаланцані в 1870 р. необхідності спермія і яйцеклітини для запліднення і розвитку нового організму, спочатку на жабах, а потім і на людях. Він першим науково здійснив штучне осіменіння, консервування сперми у льоді.

Акушерство формувалось паралельно з ветеринарією взагалі і медицинським акушерством зокрема, яке розвивалося завдяки накопиченню знань і практичного досвіду *повивальними бабками* (від *фр.* sage-femme – акушерка, буквально – мудра жінка). Знання та досвід у ветеринарному акушерстві набирали і передавали із покоління в покоління *знахарі і коновали*, каста яких виникла в перехідний період від первіснообщинного до рабовласницького ладу.

За рабовласницького ладу і в період феодалізму виникла потреба в обслуговуванні кінського складу армій і сільськогосподарських тварин, тому з цих часів почали готувати ветеринарних спеціалістів. Однак ще тривалий час акушерська допомога тваринам була прерогативою конюхів, скотарів, пастухів, знахарів.

Акушерство як наука стало переходити у самостійну галузь знань з проникненням капіталізму у сільське господарство. Найраніше воно оформилося у самостійну дисципліну у Франції, де Клодом Буржелою були створені перші ветеринарні школи (Ліон, 1761 і Альфор, 1765). Таким чином, К. Буржела вважається засновником ветеринарної освіти. Ніколи не виїзджаючи за межі Франції, він привернув іноземних учнів, які потім створили в Європі перші ветеринарні школи: в 1769 р. у Турині (Італія), в 1771 р. у Геттінгені (Німеччина), в 1773 р. в Копенгагені (Данія), в 1777 р. у Відні, в 1778 р. – у Ганновері. Отримавши прохання від іноземних правителів про створення в їх країнах ветеринарних закладів, усвідомлюючи міжнародне значення своєї справи, Буржела написав в 1763 р. міністру Людовіка XV, Генеральному інтенданту Бертину: «Монсеньйор, що стане моєю батьківщиною, Франція чи Європа?». У Росії ще в 1715 р. Петро I видав указ про створення ветеринарної школи, але Хорошевська школа під Москвою почала діяти вже після його смерті, у 1731 р. З 1805 р. ветеринарних спеціалістів готували на кафедрі «скотолікування» медичного факультету Московського університету і на ветеринарній кафедрі Харківського університету. В 1840 р. у Варшаві, в 1848 р. у Дерпті (нині Тарту), в 1851 р. у Харкові, в 1873 р. у Казані були відкриті ветеринарні учбові заклади, програмою яких передбачалося вивчення акушерства під назвою «рододопоміжної науки» як розділу ветеринарної хірургії.

Першим підручником з акушерства у Росії вважають книгу «Ветеринарна рододопоміжна наука з відділенням по хворобах дітлахів», яка була видана професором медико-хірургічної академії Г. М. Прозоровим у 1849 р. на основі видання професора Штутгартської ветеринарної школи В. Баумейстера (1844).

Перша кафедра ветеринарного акушерства створена в Московському ветеринарному інституті в 1919 р. на чолі з одним із основоположників цієї науки Миколою Пилиповичем Мишкіним.

В 1922 р. організовані кафедри акушерства в Казанському і Санкт-Петербурзькому ветеринарних інститутах (С. П. Мамадишський і В. В. Конге, а потім Аркадій Юліанович Тарасевич).

Нові специфічні форми тваринницьких господарств високо піднесли практичне значення ветеринарного акушерства і штучного осіменіння, в зв'язку з чим при всіх ветеринарних вузах і факультетах у 1934 р. були організовані самостійні кафедри з цих дисциплін.

Перший радянський підручник з акушерства був написаний М. П. Мишкіним у 1931 році. Він також розробив клінічний метод діагностики тільності, заходи з профілактики і лікування затримки посліду і родильного парезу у корів. А. Ю. Тарасевич розробив техніку ректальної діагностики вагітності у кобил, створив Ленінградську школу ветеринарних акушерів (І. О. Бочаров, Н. О. Флегматов, Я. Г. Губаревич).

Першим у СРСР доктором ветеринарних наук з акушерства став Андрій Петрович Студенцов, який завідував кафедрою акушерства у Казанському ветеринарному інституті з 1930 по 1967 р. Він став професором у 29 років і створив ряд напрямків розвитку акушерської науки (по статевому циклу, неплідності, аборті, маститі). В 1949 р. він написав підручник «Ветеринарне акушерство і гінекологія», який витримав три видання за його життя і був перекладений на кілька мов. Автору була присуджена Державна премія. На сьогоднішній день вийшли ще чотири видання цього підручника: три – за редакцією В. С. Шипілова, і останнє сьоме видання – за редакцією професорів В. Я. Нікітіна і М. Г. Миролубова.

А. П. Студенцов створив міцну школу ветеринарних акушерів (В. С. Шипілов, Г. В. Зверева, В. А. Акатов, Д. Д. Логвінов, М. І. Полянцев, І. М. Афанасьєв, І. Г. Мороз, Є. В. Ільїнський, В. Я. Нікітін, О. А. Осетров), які започаткували свої школи. Найміцнішими і найвідомішими школами ветеринарних акушерів є зараз у Росії – Воронежська (В. А. Акатов, Г. А. Черемісінов, А. Г. Нежданов, К. Г. Дашукаєва, В. Г. Турков, В. О. Петров), у Білорусі – Вітебська (Я. Г. Губаревич, В. М. Воскобойніков, К. Д. Валюшкін, Г. Ф. Медведєв).

В Україні відомими школами є Львівська (Г. В. Зверева, І. Г. Мороз, С. П. Хомин, В. І. Завірюха) і Харківська (Д. Д. Логвінов, Г. М. Калиновський, Г. Г. Харута, О. Я. Батраков). Надзвичайно активно зараз працює і розвивається Білоцерківська школа ветеринарних акушерів, створена професором Г. Г. Харутою. У НУБіП у галузі ветеринарного акушерства працюють відомі доктори наук В. А. Яблонський, В. Й. Любецький, В. І. Шеремета. Київська школа ветеринарних акушерів відома роботами К. І. Туркевича, І. С. Нагорного, Г. К. Корчака і В. П. Поліщука.

3. Визначення, термінологія і види вагітності.

Вагітність (graviditas) – складний фізіологічний процес в організмі самки, пов'язаний з плононосінням, що проходить з моменту запліднення до пологів. Термінологія: англ. pregnancy; фр. la grossesse, gravidite, gestation; рос. беременность.

Крім цього, є терміни, специфічні для кожного виду тварин: тільність – для корови; жеребність (жеребість) – для кобили; суягність – для вівці; кітність – для вівці, кози, кішки; поросність – для свині; сукрільність – для кролиці; щенність (щінність) – для суки.

Види вагітності:

- за кількістю плодів: одноплідна і багатоплідна;
- за часом настання: первинна і повторна;
- за перебігом: фізіологічна, патологічна і додаткова.

Періоди утробного розвитку. Утробний розвиток тварин умовно розрізняється на два періоди: ембріональний; плодовий (фетальний).

Ембріональний період триває 1/4-1/5 вагітності, від зиготи до виявлення зовнішніх ознак, які характерні для цього виду (у великих тварин – до 60 днів). У цей період утворюються зачатки всіх найважливіших органів і систем організму, формується тулуб, зачатки кінцівок, закінчується плацентація.

Фетальний період триває до народження плода. У цей час плід швидко росте, розвиваються органи і системи, закладені в ембріональний період.

За А. П. Студенцовим, розрізняють третій період – постфетальний – від народження до статевого дозрівання, а в ньому виділяють стадію новонародженості, яка триває до 10 днів, від народження плода до відпадання пуповини.

4. Плацентація і значення плодових оболонок

Плацентація – це утворення плодових оболонок. Трофобласт росте дуже швидко, а ембріобласт під своїм тягарем опускається всередину, і над ним з'являється склепіння складок трофобласта. Поступово це склепіння стуляється, і між складками, що зімкнулися, залишається лише невеличкий отвір – пупок амніона. З часом і він заростає, внаслідок чого ембріон, опинившись у центрі новоутвореної порожнини, стає ізольованим від зовнішнього середовища. Ділянки поверхні трофобласта, які зімкнулися, атрофуються, і таким чином з трофобласта утворюється зовнішня оболонка – трофобласт і внутрішня, яка повністю оточує ембріон і в ділянці пупка переходить

у шкіру – водна оболонка, або амніон (від грец. *amnion* – чаша для жертвовної крові).

Весь зародковий пухирець (трофобласт) швидко витягується в довжину. У 16 днів він займає 2/3 довжини рога матки (від 70 до 240 мм), на 17-й день – повністю вагітний ріг, 18-денний зародок великої рогатої худоби оточений амніоном, на 19-20-й день – досягає верхівки протилежного рога матки. Його товщина становить близько 2 мм.

На поверхні трофобласта на 20-й день утворюються ворсинки і з цього часу він стає прохоріоном. Коли до прохоріона підходять судини, що виходять з черевної порожнини плода разом з сечовою оболонкою, і в ворсинки прохоріона приблизно на 30-й день врастають капіляри, прохоріон називається хоріоном (грец. *chorion* – послід), або судинною оболонкою. Дрібні кровоносні судини збираються від всіх ворсинок разом і через пуповину ведуть до плода.

Простір між амніоном і хоріоном заповнюється магмою. З первинної кишки утворюється алантоїс (грец. *allantois* – ковбасовидний), або сечова оболонка. Алантоїс бере початок від верхівки сечового міхура і проходить через пупковий отвір у вигляді сечової протоки, або урахуса. Він збільшується у міру наповнення первинною сечею, розповсюджується між водною і судинною оболонками і до 26-го дня огортає ембріон майже з усіх боків.

Фізіологічне значення плодових оболонок.

Амніон – тонка напівпрозора мембрана, яка оточує плід з усіх боків і створює навколишнє середовище плода протягом його внутрішньоматкового життя. Внутрішня стінка – епітелій, який утворився з ектодерми, а зовнішня – сполучнотканинна основа, сформована з мезодерми. Амніон заповнений прозорою водянистою рідиною, яка містить солі NaCl, KCl, білки, незамінні амінокислоти (аланін, лейцин, гістидін, аргінін, лізин), вуглеводи, жири, ферменти, гормони, простагландини, гістамін, серотонін, катехоламін, деякі фактори росту (пантотенова і фолієва кислоти).

Спочатку вагітності амніотична рідина є трансудатом трофобласта, потім її секретує амніотичний епітелій, легені, шлунково-кишковий тракт плода, а у телят – епітеліальні бляшки, розміщені навколо пупка. Вона постійно відновлюється, 3-4 рази на добу виробляється і поглинається. У першу половину вагітності кількість амніотичної рідини збільшується, досягаючи на 5-6 міс. у великих тварин 6-7 кг, а в другу – зменшується, тому, що плід п'є її

для підтримки свого водного балансу. На початку вагітності амніотична рідина має світлий колір, пізніше вона біліє, оскільки у ній з'являються жирові частинки. Може бути коричневою при передчасному виході меконію або червонуватою після смерті чи розпаду плода. Кількість рідини у овець і кіз – 0,5-1,2 л, у корів – 3-5 л, у кобил – 3-7 л.

Алантоїс бере початок від верхівки сечового міхура, проходить у вигляді сечової протоки (урахуса) через пупкове кільце за межі черевної порожнини, а потім, лійкоподібно розширюючись, розміщується між амніоном і хоріоном. У стінки алантоїса врастають кровоносні судини і проходять від плода до хоріона. Таким чином, алантоїс має велике значення у розвитку системи кровообігу плода і в його трофіці.

Вміст сечової оболонки – першорідна сеча. На ранніх стадіях вагітності алантоїсна рідина утворюється внаслідок випотівання рідини з судин і тканин плода. У другій половині плодоношення, коли починають функціонувати нирки плода, в його сечовому міхурі накопичується першорідна сеча, надлишок якої виводиться через урахус в алантоїс.

Наприкінці утробного розвитку плода у кобил буває 7-15 л сечової рідини, тоді як у корів – 4-8 л, у овець і кіз – 50-500 мл, а у свиней її дуже мало або й зовсім немає.

Хоріон – зовнішня плодова оболонка, утворена як повністю закритий мішок, загальна форма якого нагадує внутрішню форму матки. Зовнішня поверхня хоріона, гладенька на початку вагітності, згодом покривається ворсинками, судинними мезенхиматозними колбочками, які займають у деяких видів всю поверхню, або збираються на більш обмежених просторах в інших. Ці ворсинки зчіплюються з криптами або зі схожими ворсинками слизової оболонки матки.

5. Плацента, її структура і функція.

Через хоріон здійснюється зв'язок організмів матері і плода, дифузія і осмос поживних речовин і кисню. Розмір, форма і розташування на хоріоні ворсинок у різних видів тварин неоднакові. Залежно від цього на слизовій оболонці матки формуються відповідні за величиною і формою утворення для стикування з ворсинками хоріона. Таким чином формується *плацента* – комплекс тканинних утворень на хоріоні плода і слизовій оболонці матки, які здійснюють зв'язок плода з організмом матері і забезпечують обмін речовин у

період утробного розвитку.

Разом з амніоном і алантоїсом хоріон є дитячою частиною плаценти – pl. fetalis, а материнську, або маткову частину плаценти – pl. uterina представляють своєрідно змінені (у вигляді крипт) ділянки слизової оболонки матки. Заглиблення слизової оболонки матки, в яких розміщуються ворсинки, вистелені епітелієм і нагадують трубчасті залози – *крипти*.

У жуйних форма хоріона дворога. Ворсинки дуже розгалужені (деревоподібні), об'єднуються у вигляді окремих скупчень – котиледонів плода, які зчіплюються зі спеціалізованими утвореннями слизової матки – карункулами, і таким чином формують плацентами.

Класифікація плацент:

1. За розміщенням ворсинок (за типом плаценти):

- розсіяна, або дифузна (кобила, свиня);
- множинна (жуйні);
- зональна, або пояскоподібна має вигляд пояска шириною 2-3 см (м'ясоїдні);
- дископодібна (примати, кролиці, гризуни).

2. За характером зв'язку плодової і материнської частин плаценти:

- ахоріальна (кенгуру, кити);
- епітеліохоріальна (кобила, свиня);
- десмохоріальна, тобто сполучнотканинна (жуйні);
- ендотеліохоріальна (м'ясоїдні);
- гемохоріальна (примати).

3. За типом відокремлення плацент у період пологів:

- невідпадаюча – при її відділенні слизова оболонка матки не пошкоджується і пологи проходять майже без кровотечі. Вона характерна для тварин з епітеліохоріальною і десмохоріальною плацентою;
- відпадаюча – характерна для приматів, кролиць, гризунів. У них пологи проходять з розривами слизової оболонки матки і з досить виразною кровотечею.

4. За характером живлення плода:

- гістіотрофна, властива для приматів і м'ясоїдних, які живляться тканинними соками (гістіотрофом);
- ембріотрофна, у жуйних, свиней, кобил (живлення матковим молочком).

Функції плаценти:

1. Живильна. Плацента не просто використовує вихідний

материнський матеріал, а переробляє його. Вона розщеплює гемоглобін, білки, вуглеводи і жири і заново їх синтезує.

2. Газообмінна. Для проходження кисню його тиск у материнській частині плаценти має бути значно вищим, ніж у крові плода. Але достатньо вільній дифузії кисню сприяє вища здатність гемоглобіну плода до зв'язування порівняно з гемоглобіном матері.

3. Видільна.

4. Бар'єрна функція. Найкраще через плаценту проходить вода. Цукри, незамінні амінокислоти і водорозчинні вітаміни достатньо легко проникають через плаценту, але не шляхом дифузії, а за рахунок участі у цьому процесі ферментів-переносників. Вітамін А всмоктується через плаценту у вигляді його попередника – каротину. Під впливом ферментів розщеплюються і високомолекулярні речовини: білки – до амінокислот, жири – до жирних кислот і гліцерину, глікоген – до моносахаридів. Можуть проходити і деякі антитіла, але це залежить від типу плацентарного зв'язку.

Клітинні шари плаценти (епітелій ворсин і крипт, строма ендометрію, ендотелій кровоносних судин) захищають плід від бактерій, соматичних клітин материнського організму, деяких лікарських препаратів. Плацента здатна затримувати і знешкоджувати токсичні метаболіти, синтезувати ряд речовин, які виконують захисні функції. З другого боку, плацента перешкоджає надходженню шкідливих речовин у зворотному напрямку – від плода до матері.

5. Імунна. Плацента виробляє біологічно активні речовини – цитокіни, які забезпечують імунну толерантність материнського організму. *Механізм імунної толерантності* полягає у збільшенні у кров'яному руслі вагітної особливих лімфоцитів – Т-супресорів. Вони отримують інформацію про антигенні подразники від В-лімфоцитів і пригнічують імунну відповідь лімфоїдної системи

6. Участь у регуляції маткових скорочень. Під час родів гістамін і серотонін є поряд із катехоламінами (норадреналін, адреналін) стимуляторами скоротливої діяльності гладеньких м'язових клітин матки, і до кінця вагітності їх концентрація значно зростає у зв'язку із швидким зменшенням активності амінооксидаз (гістаміназа і т. п.). При слабкій родовій діяльності відзначається підсилення активності амінооксидаз (гістамінази).

7. Ендокринна функція реалізується плацентою з участю організмів матері і плода, так званою фетоплацентарною системою.

ЛЕКЦІЯ 2

Діагностика вагітності. Патологія вагітності. Аборти.

План:

1. Класифікація методів діагностики вагітності.
2. Клінічні методи діагностики вагітності.
3. Лабораторні методи діагностики вагітності.
4. Патологія вагітності.
5. Аборти.

1. Класифікація методів діагностики вагітності.

Методи діагностики вагітності підрозділяють на клінічні та лабораторні.

У залежності від терміну діагностики вагітності розрізняють:

- ранні методи діагностики, які забезпечують встановлення вагітності у першу половину ембріонального періоду розвитку (у корів і кобил – до 30 дня, у свиней – до 24 дня);
- середньотермінові (до закінчення ембріонального періоду розвитку, тобто у корів і кобил до 60 дня вагітності);
- пізньотермінові дозволяють визначати вагітність з моменту формування плода і несуть у собі багато екстенсивного.

Незважаючи на наявність чисельних методів діагностики вагітності, роботи над удосконаленням і розробкою нових методів активно ведуться і в наш час.

2. Клінічні методи визначення вагітності

Клінічні методи діагностики вагітності включають:

1. Збір анамнезу.
2. Рефлексологічний метод (застосування самця-пробника).
3. Зовнішнє дослідження: огляд; пальпація; аускультация.
4. Внутрішнє (акушерське) дослідження: вагінальне; ректальне.
5. Фізичні методи: ультразвукове дослідження (УЗД); лапароскопія (з використанням ендоскопа); амніоскопія; рентгеноскопія і рентгенографія; електропунктурна рефлексотерапія.

3. Лабораторні методи діагностики вагітності.

Різними авторами запропоновано багато лабораторних методів діагностики вагітності, серед яких є загальновідомі, в буквальному смислі народні, такі як крапельна і спиртова проби з молоком, кип'ятіння цервікального слизу і т.п., але вони не об'єктивні. Заслуговують на увагу такі лабораторні методи.

1. Гормональні:

- визначення прогестерону (кобили, корови, свині, вівці, кози) проводять радіоімунологічним або імуноферментним методом.
- визначення естрогенів у плазмі крові кобил і корів радіоімунологічним методом або за тестами еластичності і кристалізації тічкового слизу є пізнішими методами діагностики;
- визначення релаксину (суки та інші самки).

2. Біологічні:

- тести для визначення КХГ у кобил (найбільш поширені – це реакція Ашгейма-Цондека, тест Фрідмана, тест Гайї-Меніні або сперматозоїдна реакція).

3. Імунологічні:

- тест на визначення КХГ;
- тест на визначення концентрації фібриногену і протеїнів гострої фази (реакція на нідацію), які виявляються в крові сук, починаючи з 20-го дня вагітності.

4. Імунохімічні:

- тест на визначення КХГ. Він проводиться шляхом імуноелектрофорезу у желатиновому гелі.

5. Хімічні:

- реакція Кюбоні на визначення естрогенів у сечі кобил була запропонована у 1937 р. В її основу покладено принцип реакції флуоресценції, яка викликається естрогенами у присутності сірчаної кислоти.

6. Гістологічні:

- вагінальна біопсія у свиней та овець базується на зменшенні кількості шарів епітелію слизової оболонки піхви до 2-3 у період вагітності і збільшенні його до 15-20 у тварин, які не запліднилися. Метод дає 95 % об'єктивних результатів (у свиней з 20-го дня супоросності, а в овець з 40-го дня суягності).

Загальними недоліками лабораторних методів діагностики вагітності є їх кропіткість, мала продуктивність і неможливість визначення строку вагітності.

4. Патологія вагітності.

Критичні періоди вагітності. Вагітність – одна з форм співіснування двох організмів, успішний перебіг якої забезпечується адаптацією цих організмів. Процеси цієї адаптації дуже складні і у певні моменти функціонують надзвичайно напружено.

Критичні періоди вагітності, або критичні періоди у розвитку ембріона і плода – це ті періоди, коли чутливість їх підвищується, а адаптаційні можливості знижуються, і тому вони стають особливо легко вразливими. Ці періоди характеризуються переважанням процесів активної клітинної та тканинної диференціровки і значним підвищенням обміну речовин.

Дія несприятливих чинників навколишнього середовища (гіпоксія, переохолодження, перегрівання, лікарські препарати, токсини, продукти хімічного виробництва, збудники вірусних і бактеріальних інфекцій), залежно від стадії розвитку зародка і плода може закінчуватися загибеллю, виникненням вродливості, гіпотрофією плода і низькою життєздатністю новонароджених.

Розрізняють 4 критичних періоди у корів:

1. Період бластогенезу, коли ембріон виходить з прозорої оболонки (перетворення морули у бластулу), настає на другому тижні вагітності.
2. Період імплантації і плацентоутворення (кінець 3-го і 4-5 тижні розвитку).
3. Період формування і становлення фетоплацентарної системи (3-4 місяці вагітності).
4. Формування найважливіших функціональних систем плода і завершення органогенезу приходить на 5-6 міс. вагітності у корів.

Знання критичних періодів вагітності необхідно враховувати при організації заходів з підвищення заплідненості тварин і профілактики загибелі зародків на ранніх стадіях розвитку, отримання життєздатного приплоду і зниження його відходу у період новонародженості. Для отримання від обраних плідників повноцінних нащадків треба, щоб перед заплідненням майбутні мати і батько були здорові і не перевтомлені, щоб їм у цей період було забезпечена повноцінна годівля.

Плацентарна недостатність, або фетоплацентарна недостатність – синдром, обумовлений морфофункціональними змінами у плаценті, котрий являє собою результат складної реакції плода і плаценти на різні патологічні стани материнського організму.

При цьому спостерігається комплекс порушень різних функцій плаценти, які лежать в основі патології плода і новонародженого. Реакція системи мати – плацента – плід залежить як від кожного з ініціаторів патологічного стану, так і від їх поєднання: патологія вагітності матері \Leftrightarrow патологія плаценти \Leftrightarrow патологія плода.

Причини. Порушення формування і дозрівання плаценти у тварин із патологією ендометрію, попередніми абортами, запальними захворюваннями матки, з яєчником-гіпофізарними розладами (гіпофункція яєчників, гіпофункція жовтого тіла), різними ускладненнями вагітності (гестоз, захворювання нирок, серцево-судинної системи).

Види плацентарної недостатності:

- первинна плацентарна недостатність виникає при формуванні плаценти, у період імплантації, раннього ембріогенезу і плацентациї; закінчується абортom;
- вторинна плацентарна недостатність розвивається при вже сформованій плаценті під впливом екзогенних відносно до плода чинників, які походять від організму матері. Частіше виявляється у другій половині вагітності і при включенні відповідних компенсаторних механізмів вагітність зберігається. За клінічним перебігом:
- гостра плацентарна недостатність виявляється інфарктами і відшаруванням плаценти, які викликають загибель плода і переривання вагітності. Вважається, що виключення з кровообігу більше 10 % площі плаценти є для плода станом ризику, а більше 30% є несумісним із життям плода;
- хронічна плацентарна недостатність зустрічається часто і буває відносною (при збереженні компенсаторних реакцій у плаценті) і абсолютною (при ушкодженнях плаценти дистрофічного, циркуляторного і запального характеру, у випадку відсутності компенсаторно-приспосувальних реакцій хоріона на тканинному рівні). Хронічна плацентарна недостатність має найбільше значення у розвитку гіпотрофії плода.

Токсикози вагітних. Токсикоз вагітних (від грец. *toxikos* – отруйний) – синдром поліорганної функціональної недостатності у результаті перебудови білків крові, що розвивається як патологічна відповідна реакція організму на вагітність і, як правило, проходить після її закінчення або у ранньому післяродовому періоді.

Слово «токсикоз» не зовсім влучне, тому що до цього часу

токсичні речовини, які викликають захворювання не встановлені. Ось чому запропоновані терміни «алергоз» і «гестоз». У зарубіжній літературі частіше зустрічається термін ОРН-гестоз у відповідності до основних симптомів захворювання (oedema, proteimma, hypertensia). Слово «гестоз» походить від лат. gesto – носити, бути вагітною.

Розрізняють ранній токсикоз, властивий для першої половини вагітності і пізній токсикоз (друга половина вагітності).

Принциповою різницею між ними є те, що для раннього токсикозу вагітності властивими є розлади функції системи травлення, а для пізнього – судинні розлади.

До ранніх токсикозів вагітності у тварин відносять: блювота у щенних сук; переривання вагітності.

У період пізніх токсикозів інколи перебігають: набряк вагітних; нефропатія вагітних; залежування вагітних; передчасні перейми і потуги (загроза переривання вагітності); остеодистрофія (остеомалаяція); токсична кома у такс.

Пізні токсикози вагітності можуть супроводжуватися такими акушерськими ускладненнями родів і післяродового періоду, як: слабкість родової діяльності; затримка посліду; післяродова еклампсія; післяродова субінволюція матки.

Головним етіологічним фактором є неспроможність механізмів адаптації до виниклої вагітності. Передумовою до виникнення токсикозу вагітності є вроджена або набута недостатність системи нейроендокринної регуляції пристосувальних реакцій, розлади функції серцево-судинної системи, залоз внутрішньої секреції, нирок, печінки, порушення годівлі, стреси, інтоксикації, алергічні реакції і імунологічні конфлікти, спричинені незбіжністю груп крові у системі мати-плід.

Велике значення у виникненні токсикозів вагітності мають фактори навколишнього середовища, особливо несприятлива екологічна обстановка, пов'язана з попаданням в організм пестицидів і мінеральних добрив. Наприклад, тривале вживання кормів з підвищеною концентрацією нітратів сприяє збільшенню числа абортів, мертворождалих телят, затримки посліду, різних захворювань яєчників.

Пізній токсикоз розвивається внаслідок порушення бар'єрної функції плаценти. При цьому слабне імунне розпізнавання матір'ю антигенів плода і продукується недостатньо супресорних факторів. У

результаті цього включаються імуноклітинні реакції і у кров вагітної та у судини плаценти надходять імунні комплекси, які викликають зміни у плаценті за типом відторгнення трансплантату.

Розлади фетоплацентарної системи призводять до змін у внутрішніх органах. Вони супроводжуються гіпертензією (внаслідок підвищення чутливості до ангіотензину і спазму судин), набряком (внаслідок порушення нирок, судинної проникності, мікроциркуляції і периферичного кровообігу) і протеїнурією. Порушення кровообігу призводить до порушення процесів тканинного дихання, антиоксидатної системи, обміну глюкози, ліпідів, білків.

Одночасно з розладами материнського організму розвивається гіпоксія і гіпотрофія плода.

Нефропатія вагітних – розлад нирок, який супроводжується дистрофією прямих каналців, внаслідок якої вони стають проникними для білка.

Нефропатія є наступною стадією набряку вагітних тварин. Захворювання розвивається у зв'язку з перевантаженням нирок вагітної тварини продуктами обміну плода і враженням гломерулярного фільтра циркулюючими імунними комплексами.

Дистрофічні зміни ендотелію клубочків призводять до зменшення клубочкової фільтрації.

Клінічні ознаки. Легка форма нефропатії виявляється за підвищеним вмістом білка у сечі. При кип'ятінні сечі на полум'ї спиртівки у пробірці утворюється білий згусток.

Остеодистрофія вагітних – хронічне захворювання, що розвивається внаслідок порушень обміну кальцію, фосфору та кальціферолу і проявляється розм'якшенням кісткової тканини, дистрофією м'язів і нервів, паралічем.

Виворот піхви – ненормальне положення піхви, при якому вона виходить з природної порожнини і вивертається своєю внутрішньою поверхнею назовні за межі статевої щілини. Може бути частковим і повним.

Причини. Зниження загального тону організму, набрякове просочування тканин таза, яке призводить до розслаблення фіксуєчого апарату статевих органів (стискувач переддвер'я піхви, маткова грижа, пухка сполучна тканина таза і промежини).

Збільшення внутрішньочеревного тиску, яке призводить до зяання статевої щілини при лежанні тварини і подразнення слизової оболонки переддвер'я піхви.

Частіше реєструється у корів і кіз, рідше у кобил та овець у другій половині вагітності, головним чином незадовго до пологів. Схильність до вивороту піхви відзначається у корів м'ясних порід: герефордів, шарпеїв. Рідко зустрічається у першовагітних, частіше – у самок з 3-4-ю вагітністю. У овець виворот піхви буває в період пологів при неповному розкриванні цервікального каналу і сильних переймах.

Сприяють старість, виснаження, остеодистрофія, ожиріння і накопичення жиру в паравагінальній сполучній тканині, постійне стійлове утримання у коротких, або нахилених спереду назад стійлах. Деяку роль відіграє і гормональний статус організму самки, особливо якщо враховувати час і умови, за яких настає виворот піхви: у корів – між 3-4-м міс. вагітності, у сук – в період тічки. Властивою для цих періодів є гіперестрогенемія. Така ситуація складається і при згодовуванні кормів, багатих фітоестрогенами або вражених естрогенопродукуючими грибками. За таких умов виворот піхви виявляється одночасно у багатьох тварин. На користь ролі естрогенів у виникненні вивороту піхви вказують також більша частість цієї патології у корів-німфоманок та у самок, котрим призначали великі дози естрогенів.

У сук виворот піхви досить часто спостерігається у період тічки у вигляді пролапсу або розростання слизової оболонки піхви, особливо у порід з дуже відлогим розміщенням піхви (боксер, дог, сенбернар), а також при грубому відлученні самця від самки у момент коїтусу.

Маткова грижа – це виходження вагітної матки за межі черевної порожнини без розриву очеревини.

У кобил, корів і кіз маткова грижа виявляється внаслідок мимовільного розриву черевних м'язів і як виняток за рахунок забоїв. Бокові маткові грижі трапляються рідко і бувають у кобил лівосторонніми, а у корів правосторонніми. Нижня маткова грижа є результатом розриву апоневрозу прямого черевного м'яза поблизу його прикріплення до кісток таза. У сук і кішок частіше зустрічається пахово-маткова грижа – вихід матки через розширене пахове кільце. При цьому плоди можуть розвиватися, і матка як грижове містиво збільшується.

Діагноз утруднений, тому що грижове кільце не знаходиться і важко відрізнити маткову грижу від випадання вагітної матки через пошкоджену черевну стінку, яке настає після травми і розриву

м'язової стінки з очервиною.

Під шкірою пальпується об'ємне утворення, в якому при ретельному дослідженні виявляється плід. При випаданні матки у місцях розриву очервини розвивається злипливе запалення серозної оболонки матки і очервини. Внаслідок передавлювання кишечника порушується травлення, настає рвота.

Лікування. Великих тварин забивають. У дрібних тварин виконують операцію, під час якої звертають увагу на стан матки. Ущемлення матки є показанням для гістеректомії. У сук своєчасний грижорозтин може забезпечити доношування плодів і нормальні роди.

Позаматкова вагітність – це розвиток зиготи і ембріона поза порожниною матки внаслідок порушення просування яйцеклітини або зиготи у статевих органах тварини.

Розрізняють позаматкову вагітність яєчникову, трубну і черевну.

Яєчникова вагітність – запліднення яйцеклітини в яєчнику, без овуляції. Реєструються поодинокі випадки у корів на 2-2,5 міс. і у кобил на 3-му тижні вагітності. При цьому ембріони знаходяться у порожнині кістозно зміненого яєчника.

Трубна вагітність зустрічається внаслідок порушення перистальтики або прохідності яйцепроводів найчастіше у жінок і дуже рідко у тварин.

Черевна вагітність – приживлення ембріона до будь-якого серозного покриву внаслідок порушень міграції яйцеклітини. Трапляється у кролиць, кішок, свиней, овець і корів.

Позаматкова вагітність буває первинною (перечислені варіанти) і вторинною, яка буває тільки черевною і настає після розриву матки при фізіологічному перебігу вагітності або при трубній вагітності. Описані також випадки піхвової вагітності. Вона буває тільки вторинною

Позаматкова вагітність має значення для тварин з відпадаючою плацентою (гризуни, м'ясоїдні, примати) у яких плід розвивається на будь-якому органі черевної порожнини завдяки глибокому вrostанню ворсинок плаценти і забезпеченню достатньої трофіки.

Клінічні ознаки: сильна болісність, розрив труби, кровотеча і шоківий стан. Лише за допомогою УЗД у наш час можливо діагностувати цю патологію. Частіше ж визначають при розтині або лапаротомії.

Додаткова вагітність – це запліднення і розвиток нової вагітності на фоні вагітності, що настала раніше.

Причини: годівля тварин зеленими кормами із значним вмістом фітоестрогенів (бобові, кукурудза). Вони розріджують слизову пробку вагітності, викликають нову статеву охоту і за умов сприятливого співвідношення в організмі ФСГ і ЛГ настає овуляція і запліднення. Звичайно вагітність має фізіологічний перебіг. Спочатку народжуються плоди від першого запліднення, а через один статевий цикл – від другого. Найчастіше таке зустрічається у свиней. Але, навіть якщо статеві охота може виявитися у вагітної самки, необхідно ще, щоб спермії пройшли через густу слизову пробку цервікального каналу, дійшли до рога матки і досягли яйцепровода, а запліднена яйцеклітина змогла прижитися до стінки матки, точно підготовленої для розвитку бластули. Швидше за все, це пов'язано все ж із різним часом імплантації або уповільненим розвитком зигот, запліднених одночасно (випадкова діпауза).

Несправжня вагітність (псевдовагітність або хибна) – прояв зовнішніх ознак вагітності наприкінці її фізіологічного терміну, після статевої охоти, яка пройшла без осіменіння або з непродуктивним осіменінням.

Частіше буває у дієстральних або моноєстральних тварин (собаки, в основному маленькі пуделі і такси; кішки, кози, вівці). Описані випадки псевдовагітності у свиней, кролиць, крис, морських свинок, а також у жінок, які жадають або бояться народження дитини.

Псевдолактація у сук є первісним способом вигодовування інших цуценят даної собачої зграї, якщо проєструс/єструс виникає у них тільки один раз на рік, тобто узгоджений за часом.

Причини і симптоми. У м'ясоїдних наприкінці лютеального періоду, між 6 і 12-м тижнем після єструсу, прогестагенна активність жовтого тіла починає знижуватися. Внаслідок цього у тварини розблоковується виділення із гіпофізу ПРЛ і відзначаються фізичні і поведінкові зміни, які нагадують підготовку до пологів: збільшується живіт, матка і молочні залози, починається секреція молока, розвивається набряк вульви, проявляються материнські інстинкти (підготовка гнізда-лігва, небажання залишати житло, гра з м'якими іграшками, апатичність, а інколи агресивність до власника або до інших собак). Через 1-2 тижні ці ознаки затухають. Звичайно секреція молока при несправжній щенності триває недовго, а молоко за своїм

складом нічим не відрізняється від звичайного і такі суки погоджуються годувати не своїх цуценят. У кішок молоко появляється рідко.

У кіз псевдовагітність, можливо, настає після резорбції ембріонів. Козу можна роздоювати, після чого вона лактує, як і після нормальних вагітності та родів. Парують козу у наступний статевий цикл.

З кожною наступною тічкою симптоми несправжньої вагітності можуть підсилюватися і ускладнюватися піометрою.

5. Аборти.

Слово «аборт» (abortus) походить від лат. aboiloі народжувати передчасно; англ. – abortion, фр. – avortement.

Аборт – переривання вагітності з наступним розсмоктуванням або вигнанням зародка, муміфікацією, мацерацією, путрифікацією або вигнанням з матки викидня чи недоноска.

Класифікація абортів

1. За часом настання: ранній аборт – переривання вагітності у першій її третині; пізній. Аборт в останні 2 міс. вагітності у корів і кобил, або за кілька днів до закінчення строку вагітності в інших тварин, коли народжуються фізіологічно недорозвинені плоди, називають передчасними пологами. Крім того, аборт слід відрізнити від мертвонародження, коли роди відбуваються у строк, але плід виводиться мертвий, без будь-яких ознак розкладу (це означає, що смерть плода настала під час родів внаслідок тих чи інших ускладнень).

2. За характером прояву: самовільний (спонтанний); індукований (штучний); повний; неповний (коли абортуються або гинуть і залишаються у матці не всі плоди, а решта доношуються і народжуються); клінічний; прихований (ембріональна загибель).

3. За етіологією згідно класифікації А. П. Студенцова: незаразні або спорадичні; інфекційні; інвазійні. Кожен з цих видів має 2 форми: ідіопатичні (термін походить від лат. idios – особливий, самостійний); симптоматичні.

4. За наслідком: розсмоктування ембріона; вигнання ембріона; вигнання викидня; муміфікація; мацерація; путрифікація.

Наслідки абортів і необхідна допомога.

Ембріональна смертність – це переривання вагітності в ембріональний період.

Вона має такі форми:

- розсмоктування зародка (resorbtio), або прихований аборт (abortus latentus) настає на ранній (доімплантаційній) стадії вагітності і не має явних клінічних ознак. Може бути повним і неповним (загибель частини зародків). Загиблі ембріони розріджуються і розсмоктуються;
- клінічний аборт з вигнанням ембріона виявляється дещо пізніше, звичайно при тічці, дефекації або сечовиділенні, коли тварина легенько натужується. Вигнаний з матки ембріон має вигляд слизового тяжа з кулеподібним потовщенням посередині.

Умовно виділяють три групи причин:

1. Біологічна неповноцінність зигот, які утворюються із біологічно неповноцінних гамет («старіння» яйцеклітини, втрата активності сперміїв у процесі тривалого зберігання, їх механічні, фізичні і хімічні пошкодження, спричинені дефіцитною і неповноцінною годівлею тварин та стресом у період розвитку сперміїв і яйцеклітини). Сюди ж можна віднести хромосомні аномалії зародка, слабкість імунодепресивного фактора (фактора ранньої вагітності зародка), слабкість антилютеолітичного і лютеотропного сигналу трофобласту.

Розсмоктування зародків часто буває у свиней при настанні вагітності після застосування естрогенних, гонадотропних і лютеолітичних препаратів для стимуляції статевої охоти.

2. Ендогенні причини, що пов'язані з організмом матері. Велику роль в етіології ембріональної смертності мають судинні, гормональні та імунологічні порушення в організмі матері.

3. Екзогенні чинники, що діють на організм вагітної самки. При стресах (температурних, хімічних, больових, емоційних, фізичних навантаженнях, голодуванні) пригнічується материнська домінанта вагітності і порушується гонадотропна функція гіпофіза, а з нею і прогестероносинтезуюча функція жовтого тіла.

Викидень – вигнання з матки мертвого плода. Є найчастішим і найменш небезпечним наслідком аборту.

Мертвий плід стає для матки стороннім тілом, подразнює її рецептори, викликає скорочення матки і виганяється протягом перших 3-х діб після загибелі. Якщо відповідна реакція матки на подразнення від мертвого плода ослаблена, то експульсія плода відбувається пізніше – через 2-3 тижні.

Недоносок – вигнання недорозвиненого живого плода. Як і при

фізіологічних пологах, спостерігається весь комплекс передвісників, тому вигнання недоноска називають ще передчасними пологами. Недоносок може бути життєздатним, якщо має волосяний покрив і смоктальний рефлекс. Для нього необхідно створити належні умови: тепло, молозиво, підсадку до іншої матері, а з терапевтичних призначень – введення крові матері, гідролізину, амінопептиду.

Муміфікація (mumificatio fetus) – висихання плода, настає у випадку, коли після смерті плода шийка матки не відкривається і плід піддається асептичній трансформації, яка полягає у розсмоктуванні плодових вод і тканинних соків плода. У результаті цього зменшується об'єм плода, збільшується щільність його тканин, зменшується внутрішньоматковий тиск і підсилюється скоротливість матки, внаслідок чого плід набуває самих різних чудернацьких форм. Тканини плода просочуються солями кальцію і кам'яніють.

Найчастіше зустрічається у свиней, овець, кіз, корів, рідше – у коней, сук і кішок. У свиней муміфікація часто поєднується з розвитком нормальних плодів і виведенням їх разом у період пологів.

Мацерація (maceratio fetus) – ферментативний процес розм'якшення і розрідження тканин плода, зумовлений наявністю запального процесу катарального або гнійнокатарального характеру у матці при відсутності мікрофлори. При цьому можливий аутоліз з прориванням стінки матки і виходженням містива у черевну порожнину. Частіше буває у свиней. У корів – майже виключно при трихомозі. Рідко реєструється у кобил і інших тварин.

Путрифікація (putrescentia fetus) – гнильний розклад плода. Після порушення слизової пробки шийки матки, через цервікальний канал проникають гнильні мікроорганізми (анаероби). Вони викликають гнильний розклад тканин плода з газоутворенням і збільшенням об'єму плода. Через 24 години після загибелі плода, частіше з причини пізніх родів, повільного і неповного відкриття шийки матки, слабкості пологової діяльності, розвивається емфізема плода. Газоутворення при цьому настільки сильне, що спроби ослабити його шляхом випускання газів через голку Боброва, виявляються безуспішними. Аміак, сірководень, водень, азот, вуглекислота, накопичуються у підшкірній і міжм'язовій клітковині, а також у грудній і черевній порожнинах викидня. Стінки матки дуже розтягуються; можливий розрив матки. Збільшується живіт, відзначаються слабкі потуги, пригнічення, атонія передшлунків, тимпанія. Продукти розпаду всмоктуються слизовою оболонкою

матки і розвивається інтоксикація: підвищується температура тіла до 40-41°C, частішає пульс і дихання. Слизова оболонка піхви суха, шийка матки відкрита; з статевих органів виділяється смердюча гнильна рідина бурого кольору. Через 48 год волосся плода легко відокремлюється, через 72 год легко відділяються рогові башмачки копитець і зуби; ще пізніше – члени плода можуть відриватися без попереднього зняття шкіри. При ректальному дослідженні відчувається крепітація.

Незаразні аборти. Ідіопатичний незаразний аборт – це переривання вагітності, в основі якого лежать 2 групи причин:

1. Вроджені аномалії розвитку плода: аномалії яйцеклітин і сперміїв, хромосомні і генні аномалії ведуть до вродливості або вигнання викидня частіше на ранніх строках вагітності.

2. Патологія плодових оболонок, плаценти та пуповини.

Патологія плодових оболонок:

Водянка плодових оболонок – накопичення великої кількості амніотичної або сечової, або обох рідин. Частіше зустрічається у корів – до 100-120 л. Причини: хвороби серця, нирок, печінки плода, скручування пуповини або ділянок плодових оболонок, порушення секреторної та всмоктувальної функції амніона.

Набряк плодових оболонок – результат порушення плацентарного кровообігу, при якому виникають застійні явища, набряк, що здавлює судини і порушує живлення плода. Товщина плодових оболонок – 10 см і більше, а їх маса – до 70 кг.

Маловоддя – зменшення кількості навколоплідної рідини, частіше при порушенні кровообігу, недорозвиненні або переродженні епітелію, що вистилає амніон. Скорочення матки призводить до спотворення плода і його загибелі з наступною експульсією. Інколи плід доношується і тоді реєструють важкі сухі пологи.

Патологія плаценти

Запалення плаценти (placentitis) розвивається у корів, кіз, овець і рідше в інших тварин частіше при утробній інфекції або запаленні слизової оболонки матки, що мало місце ще до вагітності. Плацентит виникає також внаслідок зараження тварини бруцельозом, сальмонельозом, кампілобактеріозом. Проходить у катаральній, фібринозній, гнійній, геморагічній або гангренозній формах. При цьому ексудат накопичується між материнською і дитячою плацентами, що може викликати відшарування плаценти, загибель плода і аборт.

У кобил плацентит протікає при виражених ознаках сепсису.

У корів плід доношується, тому, що ексудат накопичується між плацентами, а відшарування плаценти не відбувається. За таких умов плацентит призводить до розвитку продуктивного запалення і гіпертрофії ворсинок хоріона, у результаті якого утворюються заноси і спайки між слизовою оболонкою матки і хоріоном, і часто є причиною затримки посліду.

Заноси плаценти (mola).

Міхурцевий занос – кістозне переродження ворсинок. Спостерігається у корів, кобил і сук. Гадають, що він розвивається після смерті і розсмоктування близнюка новонародженого, з його хоріона, котрий виділяється одночасно з народженням нормального плода. Може супроводжуватися утворенням лютеїнової кісти, яка піддається зворотньому розвитку після видалення міхурцевого заносу.

Ворсинковий занос – гіпертрофія ворсинок. Буває у корів.

М'ясний занос – організація кров'яних і фібринозних згустків після маткової кровотечі.

Відсутність або недорозвинення ворсинок зустрічається у корів і кобил і може бути проявом атавізму. Аборт настає у першій третині вагітності.

Дифузна плацента – плацента, подібна до плаценти кобили, зустрічається у корів і звичайно не призводить до аборту.

Додаткова плацента – зустрічається у корів у вигляді дрібних грибоподібних розростань між нормальними плацентами. Вони не позначаються на перебігу вагітності. Але у випадку їх близького розміщення до шийки матки спостерігається защемлення плацентом, що клінічно проявляється кровотечею. Описана патологія називається передлежанням плаценти.

Патологія пуповини. Короткий пупковий канатик приводить до затяжних пологів внаслідок неправильних позицій плода і порушення динаміки маткових скорочень. На початкових стадіях розвитку коротка пуповина спричинює викривлення хребта, а у період пологів розривається до народження плода і може викликати асфіксію новонародженого, а у роділлі – виворот матки.

Довгий пупковий канатик може обвивати якийсь орган плода і приводить до асфіксії.

Симптоматичний незаразний аборт. Для цієї групи абортів характерна відсутність патологічних змін аборт-плода і посліду.

Причини:

1. Хвороби і аномалії статевих органів матері: інфантилізм; запалення слизової оболонки матки; переродження ендометрію після запальних процесів; рубці на ендометрії; переродження міометрію (рубці, індурація, новоутворення); цервіцит; вагініт; порушення функції яєчників, наднирників та інших залоз внутрішньої секреції; неповноцінний розвиток жовтого тіла (гіпофункція жовтого тіла).
2. Хвороби організму матері: недостатність серця, легень, печінки, нирок, шлунково-кишкового тракту (тимпанія, метеоризм, кольки); сильні крововтрати; гарячковий стан; інтоксикація організму чадним газом, продуктами хімічного виробництва; вплив радіації.

Аліментарний аборт розвивається з причини голодання, якісної неповноцінності раціону, згодовування недоброякісних кормів: (запліснявілих, промерзлих), зіпсованих, при випасах трави, покритої інеєм або при напуванні холодною водою. Яка ж неповноцінна годівля може стати причиною аборту – дефіцит білка; надлишок білка; дефіцит кальцію і фосфору; дефіцит заліза, калію, марганцю, йоду; недостатність вітаміну Е (резорбція зародка або муміфікація у першій третині вагітності, малопліддя); недостатність вітаміну А (дегенеративні зміни епітелію ендометрію, хоріона, залоз внутрішньої секреції, що призводить до плацентарної недостатності і аборту у другій половині вагітності). У сироватці крові корів повинно міститися не менше 0,4 мг % каротину; дефіцит вітаміну С та вітамінів групи В.

Важливо також дотримуватися режиму годівлі. Напувати вагітних тварин краще теплою водою або водою з автонапувалок.

Травматичний аборт частіше буває у другій половині вагітності. Вигнання плода починається через 4-12 год, рідше – на 2-3-й день після травми.

Звичний аборт – переривання кожної чергової вагітності в один і той самий строк. При цьому в анамнезі не відзначають ніяких огріхів. Частіше настає у другій половині вагітності. Може бути у всіх тварин, але частіше у кобил і корів.

Штучний аборт – навмисне переривання вагітності, яке проводиться лікарем ветеринарної медицини. Показання: економічні: відсутність умов для вирощування новонароджених, терапевтичні: хвороби серця, вік матері, дефекти тазових кісток, токсикоз вагітності, залежування вагітних, водянка плодових оболонок, маткова грижа, маткова кровотеча, передлежання плаценти і т. п.

ЛЕКЦІЯ 3

Фізіологія, патологія та ускладнення в період родів.

План:

1. Визначення і термінологія родів.
2. Нейрогуморальні механізми ініціації і регуляції родів.
3. Передвісники родів.
4. Об'єкт родів, родові шляхи та родові виганяльні сили.
5. Періоди і біомеханізм родів.
6. Патологія та ускладнення в період родів.

1. Визначення і термінологія родів.

Роди (пологи, родиво) – фізіологічний процес виведення з матки черезпологові шляхи зрілого живого плода, плаценти, плодових оболонок і вод.

Латинською мовою – *partus*, грецькою – *tokos*, французькою – *les couches, un accouchement*, англійською – *childbed* (слова *couche* та *bed* означають постіль, а сам термін можна перекласти як «класти у постіль»). Як бачимо, значення цих слів близьке до українського слова «пологи».

Крім цього, українська мова має найменування пологів для кожного виду тварин: отелення (для корів), вижереблення (для кобил), опорос (для свиней), ягніння (для овець), окіт (для овець, кіз, кролиць, кішок), щеніння (для сук).

З моменту виникнення родової діяльності і до закінчення родів (відокремлення посліду) самку називають роділлею, після чого, у післяродовому періоді вона стає породіллею.

2. Нейрогуморальні механізми ініціації і регуляції родів.

Початок родів точно у строк після завершення константної тривалості вагітності є одним з найдивовижніших явищ у фізіології. Воно ще не повністю з'ясоване і представляє велике практичне значення, бо дозволяє розробити оптимальні схеми стимуляції пологів, попередити передчасні пологи і зменшити смертність новонароджених, особливо недоношених.

Вважають, що причини настання родів численні. Пологи є результатом фізіологічних змін, що виникають у нервовій, ендокринній, статевій та інших системах вагітної і призводять до

скорочень міометрію. На підміну від інших порожнистих м'язів, фізіологічне подразнення яких відбувається при розширенні їх містивом, матка під впливом прогестерону зберігає чудову толерантність у період вагітності і забезпечує ріст плода. Активізація скорочень міометрію зв'язана з циклічною еволюцією плаценти, внаслідок якої відповідно змінюється співвідношення прогестерону і естрогенів у матері.

Основну роль в ініціації родів у тварин відіграє плід. Мати може впливати на час його народження зовсім незначно. Відомо, що вагітність продовжується і настання родів затримується при розвитку у плодів таких аномалій, як аненцефалія, гідроцефалія, циклопія, аплазія або відсутність гіпофіза, аплазія наднирників і навпаки, трапляються випадки абортів при гіпертрофії наднирників. Таким чином, зміни кортикотропної функції у плода обумовлюють гормональні зміни, що ініціюють роди в організмі матері.

У останні 2 тижні вагітності дозрілий плід з розвиненими нервовою і ендокринною системами відповідає на відповідний рівень фізіологічного стресу виділенням гіпоталамічного Гн-РГ, який, діючи на передню долю гіпофізу, стимулює викидання у кров АКТГ. Стресовий стан їм пояснюють розвитком фізіологічної гіпоксії внаслідок старечих і дегенеративних змін у плаценті. Сприяють настанню пологів і фізичні ФШ тори, такі, як зростання внутрішньоматкового тиску, збільш розмірів плода при порівняльному зменшенні величини плодових оболонок і навколоплодових вод.

Кора наднирників плода реагує на дію АКТГ збільшенням секреції глюкокортикоїдів, у тому числі попередників естрогенів (кортизолу). Концентрація кортизолу у кровоносному руслі плода різко збільшується в останні 3-4 дні вагітності. Паралельно збільшується маса наднирників плода. Підвищення концентрації глюкокортикоїдів активує 17 α -гідроксилазу плаценти, що призводить до збільшення продукції 17 α -гідроксипрогестерону, який перетворюється в андрогени, котрі є джерелом естрогенів. Субстратом для утворення 17 α -гідроксипрогестерону є прогестерон. Таким чином, у плаценті різко підсилюється синтез естрогенів шляхом переходу прогестерону в естрогени.

Естрогени збільшують кількість рецепторів до окситоцину на міометрії, активізують «дозрівання», секрецію слизу і розкривання шийки матки, а також підвищення властивості крові до згортання

(зменшення концентрації гепарину і зростання концентрації аскорбінової кислоти). Переважання естрогенів у крові матері викликає активацію простагландинсинтети і утворення великої кількості простагландинів.

Під дією простагландину $F_{2\alpha}$ настає лютеоліз і припиняється функція жовтого тіла вагітності. Незадовго до пологів жовте тіло яєчника і плацента виробляють все менше прогестерону і все більше релаксину, який готує організм вагітної тварини до родів шляхом розслаблення зв'язок таза роділлі, розм'якшення хряща її тазового зрощення і сприяє відкриттю шийки матки.

Зростання естрогеновопрогестеронового співвідношення підвищує чутливість міометрію до речовин, що викликають його скорочення (простагландин, окситоцин, ацетилхолін і т. п.) та фізичних подразників. Цьому сприяє зменшення збудливості кори головного мозку, а отже і її гальмівної дії на підкорку і гіпоталамус та покращення провідності спинного мозку. Скоротливий потенціал міометрію зростає завдяки збільшенню синтезу актоміозину (скоротливого білка м'язів матки) і накопиченню в м'язах матки глікогену, фосфокреатиніну, глутатіону.

Скорочення матки, котрі спочатку виникають під впливом простагландину, штовхають плід назад. Подразнення механо-хемобарорецепторів шийки матки і піхви у вигляді нервових імпульсів передаються до головного мозку і гіпоталамусу і при перевищенні порогу збудливості викликають відповідну нервову реакцію стимуляції скорочень матки у результаті підвищення синтезу окситоцину і ацетилхоліну (медіатора парасимпатичної нервової системи) та їх впливу на сенсibiliзований міометрій. Вони вивільнюються у все нових і нових порціях, завдяки чому тиск на механорецептори ще більше підсилюється і розвиваються нові скорочення міометрію. Таким чином родова діяльність підтримується аж до повного вигнання плода і плаценти із материнського організму.

3. Передвісники родів.

Передвісники родів – це комплекс клінічних ознак, які спостерігаються у тварин наприкінці вагітності і вказують на підготовку до пологів.

1. Набряк статевих органів і органів таза, цілковите перетворення таза у родовий (розм'якшення, розслаблення і подовження на 1/3-1/4 крижово-сідничних зв'язок). Спостерігається

за 12-36 год, а починається за 2—3 тижні до пологів. Розслаблюються також бокові зв'язки таза, що фіксують крижову і клубову кістки. У результаті цього крижова кістка стає рухливішою, змінюється крижово-хребетний кут.

2. Розрідження слизової пробки каналу шийки матки, за 1-2 дні до пологів – виділення із статевих органів корів «поводків» (тільки у кобил вони малопомітні).

3. Укорочення і розм'якшення шийки матки (у кобил – за 12-24 год, у корів – за 2-3 год). Це ознака того, що канал шийки матки відкривається

4. Початок діяльності молочної залози (у корови за тиждень у дійках з'являється клейковина, схожа на цукровий сироп, а за 2-3 дні до пологів у ній з'являються молозивні тільця і вона біліє; у кобили за 1-2 дні до пологів секрет молочної залози засихає у вигляді янтарних крапельок, т.з. «смолки» навколо отворів соскових каналів). У тварин, що готуються до перших пологів, значно збільшується молочна залоза, набухають і стають чутливими соски.

5. Зменшення температури тіла на 0,4-1,2°C за 12-50 год.

6. Підготовка гнізда у дрібних тварин, прояв інстинкту усамітнення. Для правильного прогнозу часу настання пологів треба користуватися усім комплексом цих ознак.

4. Об'єкт родів, родові шляхи та родові виганяльні сили.

Роди є результатом взаємодії трьох компонентів: плода, родових шляхів і родових виганяльних сил.

1. **Плід як об'єкт родів** має три ділянки тіла, які затруднюють роди: голова, плечовий і тазовий пояси. У період родів плід має такі просторові характеристики по відношенню до материнського організму:

- положення (*situs*) – відношення поздовжньої осі тіла плода до поздовжньої осі тіла матері. Нормальне – поздовжнє; анормальні – поперечне і вертикальне;

- передлога (передлежання) (*praesentatio*) – відношення крупної анатомічної ділянки тіла плода до входу в тазову порожнину. Нормальна – передня, або головна (зустрічається за Г. М. Калиновським у корів у 86% пологів) і задня або тазова (складає 9 %, а за даними А. Г. Нежданова – не більше 5 %). Пологи у передній передлозі бувають при народженні 99% лошат і близько 50 % поросят, цуценят і кошенят. Анормальні: спинна, бокова, черевна.

- позиція (positio) – відношення спини, поперека та крижа плода до черевних стінок матері. Нормальна – верхня (дорсальна), анормальні нижня (вентральна), бокова (права або ліва).

- членорозміщення (членорозташування) (habitus) – відношення кінцівок, голови і хвоста плода до його тулуба. Нормальне членорозміщення при передній передлозі: передні кінцівки розпрямлені, знаходяться паралельно одна одній у родових шляхах, голова лежить на кінцівках; при задній передлозі: розпрямлені тазові кінцівки знаходяться в родових шляхах, а хвіст – поміж ними.

Кожне акушерське втручання починається з встановлення положення передлоги, позиції і членорозміщення плода. Передні кінцівки легко розпізнати шляхом ідентифікації колінця (зап'ястного суглоба), яке виявляється спочатку промацуванням кісток п'ястка, а потім встановленням того, що воно розташоване між плутовим і ліктьовим суглобами. Останній визначається за ліктьовим відростком. Треба також упевнитися в тому, що виступаючі кінцівки є передніми і належать одному плоду. При передній передлозі у верхній позиції підошовна поверхня копитень завжди направлена вниз. Задню передлогу розпізнають після промацування крупу і хвоста, а тазові кінцівки відрізняють шляхом пальпації верхівки п'яркової кістки і за відсутністю суглоба між скакальним і плутовим суглобами. При задній передлозі у верхній позиції підошовна поверхня копитець направлена вгору.

Плід швидше займає необхідне для його виведення розміщення у тварин, які народжують повторно, ніж у тих, які мають перші пологи.

Важливе також визначення життєздатності плода, її розпізнають за наявністю спонтанних або ініційованих рухів тіла і кінцівок плода; крім цього, при головній передлозі — за відповідними реакціями на подразнення ротової порожнини, язика і глотки (стискування при введенні пальця у ротову порожнину), очних яблук (обертальний рух); при задній передлозі — за стискуванням ануса при введенні пальця і за пульсацією пупкової артерії при пальпації пуповини.

2. **Родові шляхи** складаються з м'яких пологових шляхів, до яких відносяться канал шийки матки, піхва, переддвер'я піхви, статева щілина і кістково-зв'язкової основи таза.

Таз самки утворює родовий канал, по якому проходить плід під час народження. Кістки таза самки відрізняються від кісток таза самця тим, що вони тонші, гладенькі, не такі масивні, не утворюють

лобкового бугра (потовщення на краніальній ділянці тазового зрощення, властиве для самців) але формують об'ємнішу тазову порожнину і загалом ширший таз. Кістковий таз має дно, склепіння і бокові стінки. Дно таза утворене парними лобковими і сідничними кістками; склепіння – крижовою кісткою і першими хвостовими хребцями; бокові стінки – клубовими кістками і широкими зв'язками таза *lig. sacrotuberale latum*, які йдуть від краю крижової кістки до гребеня вертлюгової впадини (панівки) і до сідничних горбів.

Кістки таза з'єднані між собою *симфізом* – хрящовою тканиною, в якій є незначна порожнина, що забезпечує еластичне розходження тазових кісток і збільшення об'єму таза у період родів, а крижова кістка міцно з'єднується з горбами сідничних кісток могутніми і широкими крижово-сідничними зв'язками *lig. sacroiliaca*. Вони прикріплюються на верхньому крижовому гребеневі, починаючись зразу за крижово-клубовим суглобом і простираючись до верхнього краю клубової кістки і до сідничного горба. Ці зв'язки формують найбільшу частину стінки таза, дають відгалудження на вульву та на чисельні дуже сильні м'язи. Таким чином, вона прикриває задню частину тазової порожнини і грає роль справжнього м'яза, здатного розслаблятися у період родів щоб забезпечити максимальне розширення таза. Фізіологічне розслаблення крижово-сідничних зв'язок сповіщає про наближення родів, а патологічне розслаблення буває при крижово-клубовій десморексії.

По здухвинній вирізці крижово-сідничної зв'язки проходить здухвинний нерв, котрий може затискуватися у цій ділянці об край клубової кістки, що призводить до залежування тварини після родів.

Вхід до тазової порожнини – обмежований термінальною лінією, яка проводиться від мису крижа через крила клубової кістки, клубоволобкові підвищення до лобкового зрощення. У різних тварин має різний нахил відносно горизонтальної площини і дна таза. Вхід до таза має верхній, середній і нижній поперечні діаметри, вертикальний діаметр, а також лівий і правий косі діаметри.

Верхній поперечний діаметр – відстань між крилами крижової кістки (у кобили 20-24 см, у корови 20-22 см).

Середній поперечний діаметр – відстань між горбками малих поперекових м'язів на клубових кістках (у кобили – 20-22 см, у корови -18-20 см).

Нижній поперечний діаметр – відстань між клубово-лобковими підвищеннями. У кобил – 16-18 см, у корів – 12-15 см.

Вертикальний діаметр – відстань між переднім краєм тазового зрощення і кістковим мисом крижової кістки. У кобили – 18-20 см, у корови – 23-25 см.

Два крижово-клубові косі діаметри (лівий і правий) – від зовнішнього краю крижово-клубового суглоба до протилежного клубово-лобкового гребеня. Ці два діаметри мають другорядне значення.

При нормальних родах верхній поперечний діаметр відповідає в залежності від передлоги плечовому або кульшовому суглобам плода, тоді як нижній поперечний діаметр відповідає ліктьовому або колінному суглобам.

Вихід з тазової порожнини – обмежований сідничною дугою, задніми краями широких зв'язок таза і м'язами. Він закритий задньою стінкою таза (*diaphragma pelvis*), через яку проходять пряма кишка і піхва. Ця діафрагма розміщена над задніми краями сідничних кісток на рівні з'єднання піхви з переддвер'ям піхви. Вона створена в основному м'язами промежини і ануса. Вихід з тазової порожнини характеризується такими розмірами:

- середній поперечний діаметр (відстань між виступами сідничних остей); у кобил становить 18 см, у корів – 16-18;

- нижній поперечний діаметр (відстань між внутрішніми краями (сідничних горбів) у кобил – 12 см, у корів – 18 см;

- висота виходу з таза (відстань між заднім краєм тазового зрощення і каудальним кінцем крижової кістки) у кобил – 18 см, у корів – 20-22см.

При родах дуже важливим є *передній вертикальний діаметр таза* – перпендикуляр від переднього краю тазового зрощення до верхньої стінки таза (у кобил – 17 см, у корів – 18-20 см) і *косий вертикальний діаметр* – лінія від заднього кінця тазового зрощення до мису крижа – у кобил 28-30 см, у корів – 28-32 см.

Найвужчим місцем тазової порожнини є поперечний діаметр. Збільшення цього діаметра можливе за рахунок рухливості крижа у крижово-клубовому суглобі, яка появляється перед пологами. Розширенню тазової порожнини у цьому напрямку сприяє косе розміщення входу до тазової порожнини.

Перечислені виміри використовуються у *пельвіметрії* (наука про розміри таза). Вони частіше проводяться вручну при ректальному дослідженні. Для цього заздалегідь визначають відстань між великим та іншими пальцями руки, а також довжину вказівного пальця і його

перших двох фаланг. Після вимірювання описаних вище діаметрів створюється уявлення про просвіт таза і його передбачувану прохідність для плода.

Велике значення для проходження плода по родових шляхах має *вісь таза* – лінія, що проходить на однаковій відстані від усіх стінок тазової порожнини. Вісь таза проходить через середні точки усіх вертикальних діаметрів. Вона має велике значення, оскільки вказує напрямок застосування сили при витягуванні плода.

Треба пам'ятати, що протягом виведення плода активізується рух крижа догори з різною амплітудою у залежності від віку і породи, що призводить до зміни осі таза. Рухи крижів більш виражені у корови, ніж у кобили, у молодій самки – ніж у старшої.

Таз кобили має форму утятого конуса, вершину якого представляє статева щілина на виході з тазової порожнини, а основа (вхід у тазову порожнину) знаходиться з боку черевної порожнини. Вхід у таз розміщений косо і дуже широкий, округлий, що сприяє легкому вклинюванню плода. Поверхні крижової кістки і дна таза майже рівні. Сідничні кістки вставлені так, що не заважають просуванню плода. Вісь таза являє собою майже рівну лінію, яка напрямлена знизу вгору і спереду назад та проходить від переднього краю тазового зрощення до крижово-хребетного кута.

Найменш сприятливою для народження плода є вісь таза корови. Саме тому у корів найчастіше зустрічаються важкі роди. Вхід у тазову порожнину у корови витягнутий по вертикалі, сплюснений з боків і поставлений майже перпендикулярно до дна таза. Жолобкувате здовжене тіло таза кінцями сідничних кісток зігнуте вгору, тому поздовжня вісь таза має форму ламаної кривої. Тазове зрощення у нетелів інколи загострене і дуже випукле; воно може травмувати слизову оболонку піхви при проходженні плода і створювати перепону для пологів. Сіднично-лобковий симфіз має мінімальну рухливість у молодих тварин і швидко (у віці 4-5 років) піддається повному скостенінню, стає довгим і увігнутим. У первістки сіднично-лобкове зрощення слабке і при грубому витягуванні може спричинювати серйозне ускладнення у вигляді вивиху. З віком воно поступово згладжується.

Таз вівці і кози нагадує коров'ячий, але вхід у таз похилий, а нижній поперечний діаметр близький до верхнього. Тазове склепіння утворене 4-5-ма першими крижовими хребцями і тому вихід з таза може розширюватися. Дно таза поставлене майже перпендикулярно,

дещо увігнуте; лобкове зрощення має пізнє скостеніння і може дещо розсуватися, розширяючи, таким чином, поперечні діаметри. Комплекс вказаних елементів створює можливість досить легких пологів у цих тварин.

Таз свині широкий, характеризується випуклим крижово-хребтовим кутом, дуже похилим входом у тазову порожнину, прямокутним клубово-лобковим зрощенням. Найвужчий поперечний діаметр проходить по лінії, проведеній по верхніх краях надвертлюгових гребенів.

У суки і кішки таз видовжений, головним чином циліндричної форми. У суки частина тазового склепіння, сформована всього трьома крижовими хребцями, дуже коротка; таз розширюється каудально, (тоді як у кішки цього немає) і найвужчий поперечний діаметр знаходиться на рівні надвертлюгових гребенів. У кішки дно таза увігнуте.

Родові виганяльні сили – перейми і потуги.

Перейми – це рефлекторні скорочення м'язів матки. Вони збільшують внутрішньоматковий тиск і зменшують об'єм матки, розкривають шийку матки і звільнюють її від плода і плаценти. Це можливе за рахунок *ретракції*, тобто властивості м'язів матки після скорочень неповністю розслаблюватися. Перейми виникають незалежно від волі роділлі, починаються у великих тварин від верхівки рогів матки і перистальтично розповсюджуються до шийки матки. У дрібних тварин скорочення матки сегментарні, тобто активною стає тільки частина матки з плодом, яка прилягає до шийки матки. Після виведення плода активність переміщується на наступну передню частину матки з плодом або на задній сегмент другого рога. Частина матки, що звільнилась, укорочується завдяки скороченню поздовжніх м'язів і сприяє проходженню наступного плода шляхом розслаблення колових м'язів.

Потуги – скорочення м'язів черевної стінки і таза. Вони збільшують внутрішньочеревний тиск. Потуги виникають рефлекторно, але роділля у деякій мірі може впливати на них.

Одночасне зростання внутрішньоматкового і внутрішньочеревного тиску спрямовує містиво матки в сторону найменшого опору.

Паузи між переймами і потугами служать для відновлення кровотоку у матці і плаценті, попереджують асфіксію плода.

Розрізняють перейми, які розкривають шийку матки (тривають

від долі секунд до 2-5 с з паузами між ними від 20-30 с до 1-5 хв), перейми які виводять плід (тривають до 5 хв., паузи – 1-3 с) і послідові перейми (продовжуються 2-3 с з паузами до 3-5 хв).

5. Періоди і біомеханізм родів.

Розрізняють 3 періоди родів: період розкриття шийки матки; період виведення плода; період відокремлення посліду (послідовий).

Період розкриття шийки матки починається з перших регулярних перейм і закінчується повним розкриттям цервікального каналу, розривом аланто-хоріона і відходженням сечової рідини.

Роги матки і шийка, дві частини одного органа, зазнають різних змін протягом вагітності і пологів, координація і синхронізація яких забезпечує сприятливий наслідок для матері і плода. Міометрій рогів матки протягом вагітності розтягається, але залишається у спокої; в той час як шийка матки зберігається закритою, твердою і ригідною. В пологах, навпаки, шийка пом'якшується, згладжується, розкривається; роги матки активно скорочуються і сприяють просуванню плода родовим каналом. У результаті перейм м'язові волокна матки, що лежали до перейм одні за одним, укорочуються, заходячи одне за одне (*ретракція*). Подібні зміщення м'язів зберігається під час паузи. При наступному скороченні ретракція м'язів підсилюється, стінка матки потовщується, особливо в її передній частині. Поздовжні м'язові волокна, фіксовані дотично щодо шийки матки, у момент скорочень відтягують циркулярні м'язи шийки матки вбік. Такий процес розслаблення м'язів шийки матки і її укорочення називається *дистракцією*.

Розкриттю шийки матки сприяє її «дозрівання», тобто перетворення від щільної консистенції до м'якої під впливом простагландинів, релаксину, естрогенів і кортикостероїдів, які діють на колагенові волокна шийки і надають їм еластичності.

Дистракції сприяють прогресивне просування плода і входження у шийку матки клиноподібного хоріального мішка, який всією своєю поверхнею тисне на стінки цервікального каналу. Внутрішній тиск швидко стає настільки сильним, що алантоїсний міхур розривається; виходять перші води, після чого пологова діяльність на деякий час часто затихає. Поступово, при вклинюванні амніона, кінцівок і головки плода, канал шийки матки повністю згладжується і разом з піхвою являє собою єдину трубку однакового діаметру.

У тварин, котрі народжують вперше, спочатку розширюється

внутрішнє в'їстя шийки матки. Поступово при розкритті цервікального каналу укорочується шийка матки. У корови розкриття шийки матки відбувається ззаду наперед.

Період виведення плода починається з моменту повного розкриття шийки матки і закінчується народженням плода.

Під час пологів плід не є пасивним їх об'єктом, а здійснює різні рухи і змінює таким чином свої позицію і членорозміщення. Сукупність рухів плода при проходженні через таз і м'які відділи родових шляхів називається *біомеханізмом родів*. Якщо у період вагітності плід знаходиться у нижній позиції і із зігнутими кінцівками, то з початком скоротливої діяльності матки він займає спочатку бокову, а потім верхню позицію, як правило головну і рідко тазову передлогу, розпрямляє і простягає вперед кінцівки; стає клиноподібним. Цьому сприяють поштовхоподібні скорочення матки з одночасним її скручувальним рухом внаслідок косо розміщення м'язів і активні рухи плода. Входячи до тазу і дотикаючись до косо поставлених бокових стінок, плід повертається навколо своєї осі. Потрібно зазначити, що мертвий плід не змінює позицію.

Плід входить упологові шляхи і з кожною переймою все далі просувається по них. Момент, коли частина плода показується з статевої щілини, називається *врізуванням плода*. Деякий час після врізування можуть спостерігатися поплавокподібні рухи: чергування появи з родових шляхів передлеглих органів плода і їх зворотного заглиблення. При цьому відбувається розрив амніона, ослизненняпологових шляхів витікаючими плодовими водами і активний масаж м'язів, які беруть участь у виведенні плода, що сприяє крово- і лімфообігу у них і в усьому організмі роділлі і плода. При народженні лошати амніон часто не розривається, що може стати причиною асфіксії плода. Ось чому при вижеребленні потрібно постійно спостерігати за кобилою.

Момент пологів, коли головка плода проходить повністю через статеву щілину і не ховається назад при розслабленні матки, називається *прорізуванням плода*. Тулуб плода, ввійшовши у тазову порожнину, пристосовується до діаметрапологових шляхів. У цей час виливаються залишки алантоїсної і амніотичної рідини. Після врізування плода перейми і потуги досягають максимальної сили, проходять одна за одною, поки плід не буде виведеним з родових шляхів.

Послідовий період характеризується тим, що припиняється

тонічне скорочення матки і починається ритмічне. Відокремлення хоріона зумовлене такими причинами:

- зміни гормонального статусу, які відбуваються у період народження плода (гіпопрогестеронемія, гіперестрогенемія, гіперпростагландинемія) викликають певні морфологічні і функціональні зміни у плаценті котрі останнім часом називають «дозріванням плаценти» і полягають підвищенні активності ферментів, збільшенні синтезу естрогенів і простагландинів, у результаті яких плацентами втрачають запас протестерону і набувають здатності до роз'єднання, а матка може активно скорочуватися;

- зменшення площі матки і утворення складчастості хоріона, що сприяє його відшаруванню від материнської плаценти;

- скорочення матки у період родів, що призводить до звуження кровоносних судин, зменшення кровопостачання ендометрію і ослаблення напруги у криптах;

- виведення плода і розрив пуповини викликає зменшення тургору ворсинок і в кінці кінців — витягування їх із крипт.

Послід виводиться у вивернутому вигляді, тобто хоріоном всередину.

6. Патологія та ускладнення в період родів.

Принципи допомоги тваринам при патологічних родах

1. Акушерську допомогу надають тільки після збору анамнезу, постановки акушерського діагнозу і за планом.

2. Метою акушерської допомоги при пологах є збереження життя матері і плода. При наданні родопомочі потрібно слідкувати за станом роділлі.

3. При проведенні родопомочі треба дотримуватися правил асептики і антисептики.

4. Усі маніпуляції руками і інструментами треба проводити між шкірою плода і плодовими оболонками, щоб попередити травматизм матки і пологових шляхів.

5. Для полегшування виправлення неправильних членорозміщень, передлог, положень і позицій бажано попередньо зробити низьку сакральну анестезію, легеньку транквілізацію, або призначити препарати, які розслабляють міометрій.

6. Усі передлеглі частини плода треба фіксувати акушерськими петлями.

7. Виправлення неправильних членорозміщень, передлог, положень і позицій треба проводити під час пауз між переймами, а витягування – у момент потуг при правильному розміщенні плода силою не більше 2-3 чоловік.

8. Виправлення неправильних членорозміщень проводити тільки після відштовхування плода у порожнину матки, а не в пологових шляхах.

9. Члени плода, які потрібно виправити, повинні знаходитися угорі.

10. При черевній і спинній передлозі плода прагнуть перевести його у задню передлогу.

11. При сухості і набряканні пологових шляхів ослизлюють їх милом, відваром льону, завареним крохмалем або олією.

12. Не використовувати речовин з неприємним стійким запахом.

Патологічні роди або дистоції – це аномалії пологової діяльності, які характеризуються порушенням, подовженням або відсутністю однієї з стадій пологів.

За Д. Д. Логвіновим розрізняють 4 види патологічних родів:

1. Порушення динаміки пологової діяльності, тобто розлади функціонального порядку.

2. Невідповідність об'єму плода до об'єму пологових шляхів.

3. Порушення взаємовідношення між плодом і пологовими шляхами – це перш за все порушення анатомо-топографічного характеру. До них відносять неправильні позиції, положення і членорозміщення плода.

4. Виродки, що зумовлюють збільшення діаметра плода.

Зустрічаються також поєднання аномалій пологової діяльності.

Найчастіше патологічні пологи бувають у корів. Порушення стадії виведення плода складають 2-7 % від загального числа отелень і завдають значних збитків (втрата приплоду, молочної продуктивності, а іноді й самої роділлі). М'ясо, отримане від вимушено забитої тварини при патологічних пологах звичайно має низьку якість. Рідше патологічні пологи реєструються у кіз та овець, ще менше – у кобил і свиней. У собак частість дистоцій варіює у залежності від породи: досить рідко зустрічається у великих порід та дворняг і частіше в маленьких порід собак, особливо у тих, які мають коротку морду і широку голову (пекінес, бульдог, боксер). Дистоції

більш розповсюджені у тварин, які народжують вперше, ніж у тих, які мають повторні роди.

У корів частіше бувають патологічні роди при першому отеленні і при народженні бичка. Чим більша маса плода, тим важче отелення (маса плода залежить від маси бугая-плідника). Телята після тяжких родів частіше гинуть і в подальшому більше хворіють, потребують більше уваги і догляду; краще виживають телята у корів з 3-м і наступними отеленнями.

Після важких родів знижується репродуктивна здатність корови: на 8,3 % частіше спостерігається відсутність повторної статевої охоти після першого непродуктивного осіменіння, на 9,7 і 11,6 % вищим є число непродуктивних першого і другого осіменінь, на 6,8 днів зростає інтервал між першим і другим осіменінням. Молочна продуктивність за 305 днів лактації після народження мертвого плода знижується на 192 кг.

Причини дистоцій можна класифікувати таким чином:

- стрес;
- механічні перешкоди для просування плода (вузький таз, деформація таза внаслідок травми, гіперфункції параситовидної залози, крижово-здухвинного анкілозу, кісткових розростань при гіпервітамінозі А; крупноплідність, новоутворення, неправильні положення плода);
- патологія вагітності, при якій порушується функція фетоплацентарної системи і розвиваються гормональний дисбаланс до родів або розлади нейрогуморальних механізмів, які регулюють процес родів;
- патологічні зміни матки вродженого і набутого характеру;
- ендокринні захворювання, порушення обміну речовин, хвороби нервової системи (мієліт).

Порушення динаміки родів

Слабкі перейми і потуги або слабкість родових сил – це короткочасні малоінтенсивні скорочення матки і черевного преса з тривалими паузами між ними. Інколи така пологова діяльність проходить ледве видимо.

Серед аномалій пологової діяльності вищеназвані зустрічаються найчастіше. У кішок, що народжують вперше, відсутність родової діяльності можна очікувати у віці старше 5 років, а у кішок, які уже мали роди, у віці старше 8 років.

Причини: за походженням розрізняють первинну і вторинну слабкість перейм і потуг.

Первинна – реєструється часто у сук, свиней і корів; розвивається з початку пологів з причин виснаження, мінерального голодування (гіпокальціємія), остеомалаяції, залежування вагітних, авітамінозів, ожиріння, гіподинамії, токсикозу вагітності, фетоплацентарної недостатності. При цьому міометрій або перероджується або перерозтягується (формування великих плодів, значна кількість плодів у багатоплідних тварин, водянка плода) і втрачає тонус. Слабкість пологової діяльності є результатом перенесеної щінності і розвитку всього одного плода, особливо у собак таких порід як чау-чау, бультер'єр, ретривер (пологи розпочинаються через 70-80 днів, вже після смерті плода). Такі випадки пояснюють порушеннями розвитку гіпофіза плода.

Вторинна – після тривалих нормальних або бурхливих перейм і потуг з причин непрохідності пологових шляхів, а також фізичного перенапруження і загальної втоми роділлі.

Класифікація ускладнень у період родів:

1. Скручування матки.
2. Кровотечі: вагінальна, внутрішня, утворення гематом.
3. Травматичні пошкодження: здавлювання, розрив і розсічення кишки; пролапс прямої кишки; виворот сечового міхура; виворот матки; розрив вульви і промежини; утворення ректовагінальної фістули; розрив матки і шийки матки.
4. Затримка посліду.

Скручування матки – обертання органа, який знаходиться у вагітному стані навколо своєї поздовжньої осі таким чином, що порожнина піхви частково або повністю закривається.

Частіше всього буває причиною патологічних пологів у корів, але спостерігається у кобил і дрібної рогатої худоби. Виявляється переважно у момент пологів, але буває протягом вагітності, головним чином в останні 2 міс. У свиней і м'ясоїдних реєструється рідко; при цьому у патологічний процес часто включається ділянка вагітного рога і його перебіг нагадує заворот кишечника.

У залежності від напрямку скручування може бути правим і лівим (у корови – частіше правим, у кобили – лівим); за розміщенням – передшийковим, коли задіяна тільки матка і позашийковим, коли шийка матки знаходиться всередині аномалії; за

ступенем переміщення дорсальної частини вагітного рога матки вздовж своєї поздовжньої осі – повним (якщо воно досягає 360°) і частковим (якщо ступінь скручування менша). Розрізняють скручування на 1/4, 1/2, 3/4 оберту, що відповідає 90°, 180° і 270°.

Затримка посліду – це ускладнення пологів, яке характеризується уповільненням або відсутністю послідової стадії пологів.

Про затримку посліду говорять у випадку, коли вигнання посліду не закінчилося у корів протягом 6 год., у кобил – 35 хв, в овець, кіз, свиней, сук, кішок і кролиць – 3 год.

Розповсюдженість: від 10 до 40 % у корів. При передчасних або запізнених родах частота затримки посліду помітно збільшується. Так, якщо отелення відбулося між 241-250 днями, то послід затримується у 60 %, при тривалій вагітності – у 48 % випадків. Після абортів з вигнанням посліду частість затримки посліду складає 25 %, після патологічних родів – 29 %.

У інших тварин частість затримки посліду нижча і зменшується починаючи від кози і вівці, до свині і м'ясоїдних.

Затримка посліду викликає різні ускладнення післяпологового періоду: гостру післяпологову субінволюцію матки, вагініт, ендометрит, мастит, артрит, ацетонемію, сальпінгіт, перитоніт, функціональні розлади яєчників, які призводять до тривалої неплідності і зниження молочної продуктивності. Економічні збитки від затримки посліду обумовлені ще й схудненням тварини.

Причини:

1. Недостатнє дозрівання плаценти як наслідок передчасних родів і розладів фетоплацентарної системи.

2. Недостатня сила послідових перейм, атонія і гіпотонія матки, порушення процесів ретракції матки внаслідок дистрофічних змін її м'язових елементів, а також внаслідок збереження «прогестеронового блоку» міометрію; при цьому зберігається кровообіг в материнській частині плаценти і підтримується високий тургор тканин карункулів, що забезпечує защемлення ворсинок хоріона у криптах.

3. Плацентит, як результат розвитку неспецифічної утробної інфекції при порушенні правил асептики і антисептики під час введення сперми при штучному осіменінні або порушенні слизової оболонки шийки матки при глибокому чи грубому введенні інструментів. Останнє є причиною розвитку хронічного прихованого ендометриту. Утробна інфекція може мати місце у корів з

недостатньо сапованою маткою, а також внаслідок дії специфічних інфекцій: бруцельоз, лептоспіроз, кампілобактеріоз, трихомоноз, токсоплазмоз.

4. Заворот матки, важкі болісні пологи з травматизацією пологових шляхів.

До затримки посліду більш схильні тварини, які не користувалися моціоном і мали неповноцінну годівлю (надлишок протеїну, дефіцит вітамінів А, D, Е та інших; мінеральних речовин, йоду, селену). Затримку посліду частіше реєструють у зимово-весняний період на фоні зниження загальної резистентності організму. Деяку роль відіграє спадковість, оскільки затримка посліду часто повторюється у тих самих корів і в їх нащадків. Затримка посліду частіше буває у старших корів, при двійнях, патології плодових оболонок, які призводять до розладів скорочень матки.

Ознаками несприятливого прогнозу для затримки посліду у корів за Г. Г. Харутою є розсмоктування на початку сухостою останніх ребер і лінійна деформація останніх хвостових хребців більше 1 см, народження мертвих плодів, гіпо- і гіпертрофіків, різні ускладнення при народженні плода.

За нашими даними, патологія послідового і раннього післяпологового періоду тісно пов'язана етіологічно і клінічно з патологією вагітності. При цьому велику роль відіграє швидкість і механізм відокремлення посліду у корів. Вони свідчать про стан скоротливої діяльності міометрію. Затримку посліду можна прогнозувати при слабкій пологовій діяльності, затримці до 1,5-2 год. після народження плода і слабкості послідових перейм і потуг. При цьому зменшується концентрація естрадіолу кількість еритроцитів і гемоглобіну, і водночас збільшується концентрація прогестерону і кількість лейкоцитів.

Відносно більша частість випадків затримки посліду у корів пов'язана також і з недосконалістю механізму його відокремлення у цих тварин. У корів плацента множинна, котиледонна, має 80-120 місць з'єднань; деревоподібні ворсинки хоріона глибоко проникають у слизову оболонку карункулів і міцно з'єднуються з нею. Котиледон повністю оточує карункул, а в ділянці ніжки утворює щільне кільце.

ЛЕКЦІЯ 4

Фізіологія, патологія та ускладнення у післяродовий період.

План:

1. Зміни у статевих органах та організмі породіллі.
2. Нейрогуморальна регуляція репродуктивної функції самки у післяродовому періоді.
3. Видові особливості перебігу післяродового періоду.
4. Ведення післяродового періоду. Акушерська диспансеризація.
5. Патологія та ускладнення у післяродовий період.

1. Зміни у статевих органах та організмі породіллі.

Післяродовий період або післяпологовий період (puerperium, від слова puerpera – породілля) – період, що починається після вигнання посліду і продовжується у різних видів тварин від 2 до 4 тижнів, протягом відбувається зворотний розвиток статевих та інших органів і систем, які забезпечували перебіг вагітності і родів до стану властивого невагітному організму (до прегравідного стану). (Терміни англ. post-natal; фр. periode puerperal)

Цей період грає дуже важливу роль для відновлення репродуктивної функції, а відтак і молочної продуктивності корів. Самку в цей час називають *породіллею*.

У процесі післяродової інволюції організм самки майже повністю повертається до стану, який передував вагітності. Однак, деякі ознаки за якими можна відрізнити самку-породіллю від самки, яка не народжувала, залишаються на все життя (дещо збільшується величина матки змінюється форма цервікального каналу, зменшується складчастість слизової оболонки піхви і збільшується її об'єм, змінюється складчастість величина і форма молочних залоз, розширяється таз, іноді залишаються рубці на шкірі черевної стінки).

Паралельно з процесами інволюції, які найбільше виражені у статевих органах, розвивається інкреторна і екскреторна функції молочної залози (лактація). Певні зміни настають в ендокринній, нервовій, серцево-судинній та інших системах організму. З'являється почуття материнства і відповідна перебудова поведінки самки.

Таким чином, післяродовий період – новий фізіологічний стан організму самки, який характеризується не тільки глибокими

морфологічними змінами у статевих органах, а й інтенсивною нейрогуморальною перебудовою всього організму.

Найпомітніші інволюційні зміни проходять у матці. Зразу після родів діаметр цервікального каналу рівняється розміру головки плода, а у перші дні після родів прогресивно зменшується внаслідок скорочення циркулярних м'язових волокон шийки матки. Наприклад, у корів через добу після отелення через канал шийки матки вільно проходить рука (10-14 см), що дозволяє відокремлювати послід оперативним шляхом. Наприкінці другої доби рука проходить уже важко (7-9 см), через 3 доби пропускає 2-3 пальці, а через 7-8 днів – тільки 1 палець. У кіз вже в кінці першої доби через шийку матки не проходить рука. У жінок зразу після пологів – 10-12 см, через 1 добу проходить 2 пальці, а через 3 доби – 1 палець. Повністю цервікальний канал закривається при повній післяродовій інволюції матки.

Інволюція матки проходить досить швидко. Якщо після отелення маса матки корови становить до 10 кг, то через 2 тижні – близько 500 г. У перші 48 год. після пологів продовжуються активні скорочення і ретракція мускулатури. Стінка матки потовщується (у великих тварин до 4-5 см), а об'єм її зменшується у 2-3 рази. Маткові скорочення слабшають і до 72 год. припиняються.

У результаті ретракції гладеньком'язових волокон стінки кровоносних і лімфатичних судин звужуються і значною мірою облітерують. Погіршення трофіки призводить до дегенеративних процесів у формі жирового переродження утворених у період вагітності м'язових волокон.

Жировому переродженню піддаються і м'язові елементи, які виконували функцію материнської плаценти, з одночасним руйнуванням, злущуванням і відновленням покривного епітелію. Під епітеліальним шаром, що руйнується, накопичуються клітинні елементи (головним чином лімфоцити), утворюється грануляційний вал. Він перешкоджає проникненню у тканини матки мікроорганізмів. За умов фізіологічного перебігу післяпологового періоду порожнина матки протягом 3-4 днів зостається стерильною. В очищенні внутрішньої поверхні матки більша роль належить фагоцитозу і внутрішньоклітинному протеолізу. Внаслідок руйнування лейкоцитів, а також мікробів, звільняються ферменти з високою протеолітичною активністю (пептид-гідролази та антитоксини), які знищують бактерії, нейтралізують токсини і сприяють розплавленню і відторгненню фрагментів децидуальної

оболонки і згустків крові.

Продукти тканинного розпаду слизової оболонки і плацент, слиз, залишки плодових вод, домішок крові виводяться з матки у вигляді лохій, або післяпологових очищень (від грец. *lochía* пологи).

Колір лохій поступово змінюється від червонувато-коричневого до світло-коричневого і на момент завершення регенераційних процесів в ендометрії, вони набувають вигляду прозорого безбарвного слизу. Лохіальний період, як правило, триває 1-2 тижні, у залежності від виду тварини і типу плаценти. У жінок лохії виділяються 5 тижнів і являють собою по суті раневий секрет, у якому переважають лейкоцити. По завершенню евакуації лохій повністю закривається канал шийки матки.

Із зменшенням рогів, тіла і шийки матки, укорочуються маткові зв'язки, і матка зміщується у тазову порожнину, займаючи вихідне положення.

В яєчниках до 10-15-го дня закінчується інволюція жовтого тіла вагітності, яка починається у тварин в останню третину вагітності. До 18-30-го дня після родів дозріває новий фолікул і проявляється стадія збудження статевого циклу.

Перетворення «родового таза», розсмоктування набряків вагітності, завершуються протягом 4-5 днів. У ці самі строки крижово-сідничні і широкі маткові зв'язки стають твердими, напруженими.

Статеві губи з оточуючими їх тканинами зморщуються і наближаються до промежини і ануса. Інволюція вульви закінчується до 5-6-го дня. Відновлюється тонус стінок піхви, заживають тріщини і розриви.

Функція молочних залоз після родів досягає найбільшого розвитку. Уже в період вагітності, під впливом естрогенів, формуються молочні протоки, під дією прогестерону відбувається проліферація залозистої тканини. Продукція молозива починається з 2-ї половини вагітності, але висока концентрація естрогенів пригнічує підвищення вмісту ПРЛ у тканині молочної залози і попереджує виробку молока. Коли припиняється гормональна функція плаценти, починається дія ПРЛ, який стимулює альвеоли до секреції молока, і з цим зв'язано підсилене надходження крові до молочної залози (нагрубання) на 3-4-й день післяродового періоду, що є підготовчим актом у лактації. Функція молочних залоз у значній мірі залежить від рефлекторних впливів, які мають зв'язок з актом смоктання.

Смоктання сприяє інволюції матки, бо підсилює її скоротливу здатність рефлексорним (через симпатичну нервову систему) і гормональним (під дією окситоцину) шляхами.

Загальний стан породіллі при фізіологічному перебігу післяродового періоду не має виражених клінічних змін. Температура тіла, частість пульсу і дихання у тварин після родів прогресивно знижуються, набуваючи фізіологічних параметрів.

2. Нейрогуморальна регуляція репродуктивної функції самки у післяродовому періоді.

Концентрація стероїдних гормонів після родів знижується і знаходиться на базальному рівні майже протягом усього післяродового періоду. При відсутності прогестерону естрогени, певно, не можуть порушити стійкого виділення гонадотропіну і в ранньому післяродовому періоді концентрація ФСГ в організмі підвищується, а чутливість гіпофізу до Гн-РГ, який стимулює виділення ЛГ, швидко відновлюється (до 8-10-го дня).

Підсилення секреції ФСГ на фоні низької концентрації ЛГ сприяє росту і дозріванню фолікулів. Фолікули, які ростуть, виділяють все більшу кількість естрогенів, котрі викликають зворотний позитивний зв'язок на секрецію ЛГ, і його концентрація підвищується до 12-го дня після родів. До 13-15-го дня відзначається морфологічна регресія жовтого тіла вагітності, а число і величина пікових викидань ЛГ збільшується. Підвищена секреція ЛГ на фоні безперервної дії ФСГ забезпечує преовуляторний розвиток фолікулів і різке підсилення екскреції естрогенів. Таким чином забезпечується дозрівання і овуляція дозрілих фолікулів. Поновлюється статева циклічність.

Концентрація ПРЛ не змінюється в останні дні вагітності, але зростає на 4-ту добу після родів, особливо у тварин при підсисному вирощуванні молодняка. Це пов'язано з початком лактації. У наступні дні вміст ПРЛ дещо знижується, але залишається достатнім для підтримки молочної продуктивності і не перешкоджає виділенню ФСГ і ЛГ, концентрація яких збільшується на 18-21-й дні і свідчить про відновлення циклічної діяльності яєчників.

При високій молочній продуктивності підвищена концентрація ПРЛ зберігається довше, пригнічує виробку ФСГ і викликає відносну гіпоестрогенію. За таких умов поновлення гіпофізарно-яєчникового циклу і овуляції настає пізніше. Перший домінуючий фолікул може

овулювати у 70-80% випадків.

Оскільки смоктання стимулює періодичну секрецію ПРЛ, то створюються умови для підтримки лактації; цим можна також пояснити затримку першої стадії збудження статевого циклу у корів при підсисному вирощуванні телят. У підсисних корів тільки 10 % перших статевих циклів закінчуються овуляцією. На високий рівень ПРЛ реагують чутливі до нього гіпоталамічні нейрони, які прискорюють вивільнення *дофаміну*. Останній не тільки пригнічує секрецію ПРЛ гіпофізом (саморегуляція), але і викликає пряму або опосереднену дію на клітини гіпоталамуса, котрі продукують гонадоліберин. Високий рівень ПРЛ знижує активність цих нейронів, гонадоліберин починає надходити у гіпофіз у менших кількостях, і, що ще важливіше, не в імпульсному режимі. У результаті не дозрівають фолікули і не відновлюється статевий цикл (післяродовий лактаційний анеструс). Проте, на думку М.Еппуер (2000), тривалість післяродового анеструсу не пов'язана із затримкою дозрівання фолікулів, а ймовірно, із розладами овуляції домінантного фолікула внаслідок недостатньої частоти викидань ЛГ.

У перші дні після родів підвищується інтенсивність обміну речовин і активність щитовидної залози. Підсилюються механізми клітинного і гуморального захисту.

3. Видові особливості перебігу післяродового періоду.

У корів зразу після відокремлення посліду продовжуються дуже активні скорочення матки, (через кожні 3-5 хв), а в наступні 3-4 дні через 8-10 хв. Внаслідок скорочень м'язові волокна матки укорочують. І порожнина матки зменшується і вже через 2-3 год просвіт матки спадається, стикаючись карункулами. Скорочення матки зменшуються вже через 12-24 год і згасають до 48 год після пологів. Мінімальна скоротлива діяльність міометрію реєструється із 48 до 72 год після пологів. Цей період співпадає із формуванням у каналі шийки матки слизової пробки. На початку розрідження слизової пробки інтенсивність маткових скорочень збільшується і на 7-му добу спостерігаються ритмічні скорочення матки невеликої тривалості.

Із статевих органів виділяється кров'янистий слиз, який наприкінці доби набуває форми тяжа густої консистенції і рожевуватого кольору. Таким чином, до кінця доби у каналі шийки матки закінчується формування слизової пробки. Вона щільно

закриває цервікальний канал на протязі 2-3 діб, після чого розплавляється і витікає. Спочатку вона червонувата (домішки еритроцитів), потім жовтувата (домішки лімфи). Утворення післяродової слизової пробки є сприятливою прогностичною ознакою нормального перебігу пуерперію, тому що вона огорожує порожнину матки від проникнення мікроорганізмів. Вона не формується у корів після затримки посліду, важких родів, при перехворюванні субінволюцією матки і порушенні обміну речовин. Штучне видалення у корів післяродової слизової пробки, незважаючи на дотримання правил асептики, приводить до подовження лохіального періоду і розвитку ендометриту.

З 3-4-го дня відзначається помірне виділення густих лохій без запаху, кількість яких збільшується до 7-8-го дня, складаючи 1,5-2 л на добу, а консистенція, спочатку кашоподібна, стає рідшою. У наступні дні лохії виділяються в об'ємі близько 0,5 л. Забарвлення лохій змінюється від червоного до темно-червоного і коричневого на 7-8 дні, а потім до світло-шоколадного. Це має зв'язок з кровотечею із карункулів, які ті даються розпаду. З 12-14-го дня лохії стають світлими і прозорими. До 14-16-го дня (12-17) виділення лохій припиняється, а канал шийки матки закривається.

При ректальному дослідженні на 2-3 дні після отелення матка знаходиться у черевній порожнині, щільна, має потовщені стінки і горбкувату поверхню. На 4-5-й день матка за розміром нагадує 3-4-х місячну вагітність, її уже можна обвести рукою при ректальному дослідженні добре скорочується. На 7-8-й день матка добре підтягується до тазової порожнини. Шийка матки набуває властиву їй форму; діаметр її складає 4-6 см, канал шийки матки відкритий на один палець. На 10-12 дні матка зменшується до розміру 2-місячної вагітності, легко підтягується у тазову порожнину і таким чином стає легкодоступною для дослідження. Стають доступними для дослідження і яєчники.

Паралельно з інволюцією матки змінюються карункули. Матка, маса якої складала у період отелення близько 9 кг, після 4-го дня післяродового періоду зменшується до 3,5 кг, а після 7-го – до 2 кг; маса карункулів одночасно знижується від 200 до 30 г. До 10-12-го дня карункули майже повністю руйнуються. У результаті звуження і укорочення судин під час маткових скорочень зникають ніжки карункулів, порушується живлення маси карункулів, вони розплавляються і відпадають. До 10-13-го дня висота карункула з

ніжкою не перевищує 1,5 см, а до 20-го дня карункули, які ще залишилися, являють собою підвищення на поверхні матки це більше 0,5 см.

На 17-20-й день настає повна ретракція матки, котра встановлюється за її локалізацією у тазовій порожнині і набуванням прегравідної величини. До цього часу поновлюється покривний і залозистий епітелій шийки, тіла, рогів матки і яйцепроводів. Повна регенерація ендометрію закінчується після 30 днів.

Ендокринна функція жовтого тіла вагітності припиняється у перші 2-3 дні після народження плода. Воно пальпується трансректально до 10-15-го дня і має вигляд невеликого щільного утворення. Лютеїнові клітини піддаються лізису, а до 17-20-го дня паренхіма жовтого тіла заміщується сполучною тканиною. На 18-20-й дні в яєчнику можна знайти фолікул.

Таким чином, тривалість післяродового періоду у корів становить 18-25 днів. У ці самі строки інколи виявляється перша стадія збудження статевого циклу і можливе запліднення. Проте перший статевий цикл може бути ановуляторним або проходить з овуляцією без виразних проявів тички і статевої охоти. Найчастіше відновлення статевої циклічності у корів молочних порід настає через 5-7 тижнів і ще пізніше у корів м'ясних порід. Саме такий період необхідний для створення умов для запліднення у статевих органах корів. Від повноцінності перебігу інволюційних процесів статевих органів залежить настання запліднення і перебіг вагітності.

У *кобили* контури живота відновлюються в основному протягом першої доби. Набряк вульви зникає через 2 тижні. Вже на 2-у добу об'єм матки зменшується вдвоє. Лохії темно-червоного кольору з коричневим відтінком виділяються у незначній кількості 5-9 днів після вижереблення. Матка досягає величини невагітної до 20-го дня, проте інволюція статевих органів закінчується, головним чином, до 12-го дня, а стадія збудження статевого циклу виявляється вже на 7-12-й день. В цей час I верхній шар ендометрію відновлюється, хоча залозисті субепітеліальні зони ще дуже інфільтровані лейкоцитами. Таким чином, вагітність у кобил не перешкоджає росту фолікула, котрий дозріває в іншому, вільному від і жовтого тіла вагітності яєчнику. Але запліднення не завжди настає у перший статевий цикл з причини недостатньої підготовки ендометрію.

У *кіз і овець* лохіальний період триває 7-10 днів. Інволюція статевих органів – 20-21 днів. Регресія жовтих тіл проходить повільно

і закінчується до 41-го дня після окоту. Статеві цикли відновлюються частіше у період наступного статевого сезону (серпень-січень).

У свиней лохіальний період продовжується до 5 днів, рідше – до 8. Лохії спочатку червоні, потім стають буруватими, жовтуватими і прозорими. Інволюція статевих органів закінчується наприкінці 2-го, максимум 3-го тижня. Жовті тіла в яєчниках швидко зменшуються і з 9-го дня вони виявляються лише на розрізі, а не на поверхні яєчника. Вже на 2-й день після опоросу в яєчниках є фолікули діаметром 5 мм і більше, але вони зменшуються, тому, що у свині ПРЛ гальмує розвиток фолікулів. На 16-20-й день після родів концентрація ПРЛ досягає найбільшої величини, після чого різко зменшується. Це призводить до швидкого підвищення концентрації естрогенів, через що на 18-24-й день виникає діарея, яка триває 1-2 дні. У перші дві доби температура тіла становить $39,0-39,3^{\circ}\text{C}$, а в наступні – у межах $38,0-39,0^{\circ}\text{C}$.

У сук протягом 14-27-ми днів, а у кішок протягом 10-21 днів у залежності від конституції тварини, числа і величини плодів, виділяються бурувато-зеленуваті лохії, які не мають запаху, містять маленькі фрагменти тканин і крові. Кількість лохіальних витікань прогресивно знижується починаючи з 2-го тижня післяродового періоду. Змінюється і їх якість: вони стають слизеподібними і все світлішими. Інволюція матки закінчується протягом 10-15 днів. У перші 3-6 днів після родів можливе не значне підвищення температури тіла (дол. $39,4^{\circ}\text{C}$ у кішок і до $39,6^{\circ}\text{C}$ у сук).

4. Ведення післяродового періоду. Акушерська диспансеризація

Важливість післяродового періоду для репродуктивного життя тварин полягає у тому, що він знаменує перехід від вагітності і народження плода до лактації і підготовки до нового плодоношення. У цей час організм породіллі має знижену резистентність і потребує особливого режиму утримання і годівлі, котрий сприяє повноцінній інволюції статевих органів, високому рівню лактації і нормальній функції всіх органів і систем.

Велику увагу звертають на дотримання чистоти у приміщенні і стойлі, забезпечення сухою рясною солом'яною підстилкою. Необхідно потурбуватися, щоб у родильному відділенні було тепло і без протягів, своєчасно прибиралася підлога від маткових виділень, регулярно видалявся навоз і проводилася дезинфекція стійла перед

постановкою іншої тварини. Протягом лохіального періоду рекомендується щоденне обмивання і зрошення вульви, промежини і кореня хвоста розчинами фурациліну або хлораміну Б.

Через 12-24 год після важких або затяжних родів сук і кішок досліджують, застосовуючи методи пальпації, рентгенографії або УЗД для виключення затримки плода чи посліду. Також потрібно перевірити молоко за кольором, консистенцією і якістю. Купати їх можна з 3-го дня після родів у слабкому розчині марганцевокислого калію. Необхідно пам'ятати, що занесення інфекції у статеві шляхи породіллі може привести до розвитку післяродових запальних і навіть септичних процесів.

У перші дні після родів тварини потребують ощадливого режиму годівлі (сіно, висівки, дерть). Соковиті корми вводять поступово. Необхідно запобігати перекорму, щоб не викликати захворювань шлунково-кишкового тракту через непристосованість кишечника до нових умов. З 3-4-го дня після родів тваринам надають активний моціон. Підсисну робочу кобилу можна використовувати на легких роботах разом з лошам або окремо через 15 днів після вижереблення.

Акушерська диспансеризація – це комплексна система діагностичних, лікувальних і профілактичних заходів, яка забезпечує нормальний перебіг вагітності, родів і післяродового періоду. Вона охоплює фізіологічні періоди від часу запліднення самок до закінчення інволюції статевих органів після отелення.

Принципи акушерської диспансеризації – систематичне проведення діагностичних заходів, складання планів профілактичних заходів виконання, своєчасне лікування хворих корів, а також ретельний облік і аналіз результатів диспансеризації для вчасної їх корекції.

Діагностичні заходи проводять у періоди сухостою, родів та після родів.

При клінічному огляді вагітних корів звертають увагу на вгодованість, реакцію на зовнішні подразники, поведінку корів при вставанні та під час руху, конфігурацію тіла, стан шкіри, волосяного покриву, органів руху, молочної залози, оглядають ділянку тазу, вульви, виявляють наявність набряку вим'я, нижньої черевної стінки, міжщелепового простору. У корів, що лежать, можна помітити перші ознаки вивороту піхви, наявність і характер виділень із статевих шляхів.

Проводять біохімічне дослідження крові 10-15% тільних корів-аналогів за віком і строку вагітності; звичайно, за 50-60 днів до родів, а потім повторно, через 2-4-6 тижнів.

Для своєчасної діагностики маститу особливу увагу звертають на величину часток вим'я, їх консистенцію, вираженість набряку, колір температуру шкіри, болючість вим'я при пальпації, характер секрету молочної залози.

Обов'язково аналізують раціон з визначенням структури і оцінкою якості кормів.

Акушерське обстеження породіллі проводять лише під час патологічних родів з метою визначення характеру патології і складання плану рододопомоги у кожному конкретному випадку. При обстеженні визначають стан родових шляхів (цілісність слизової оболонки піхви і ними її матки, ступінь розкриття цервікального каналу, наявність анатомічних дефектів у м'яких тканинах і кістковій основі родових шляхів), визначають співвідношення розмірів плода і родових шляхів, стан плода, його передлогу, положення, позицію і членорозміщення.

Зразу після розтєлення корів перевіряють на субклінічний мастит пробою з 2%-ним розчином мастидину, зокрема тих, які в період запуску реагували позитивно.

Для забезпечення нормального перебігу і тривалості післяродово періоду, своєчасного запліднення і попередження ускладнень, головним чином субінволюції матки і ендометриту, необхідно проводити постійний ефективний контроль за ходом післяродового періоду.

Ветеринарний контроль за перебігом післяродового періоду здійснюється шляхом щоденного клінічного огляду (бажано з термометрією), спостереженням за загальним станом тварин, формуванням слизової пробки каналу шийки матки, якістю лохій, тривалістю лохіального періоду, інтенсивністю інволюції зовнішніх статевих органів і зв'язок. При виявленні відхилень від норми (чергування періодів виділення великої кількості лохій і повної відсутності їх, виділення рідких лохій з домішками пластівців, неприємного запаху) проводять акушерське дослідження. Особливу увагу звертають на величину вим'я, його температуру, кількість і зовнішній вигляд молозива, реакцію корів на доїння або смоктання.

Особливо ретельно слідкують за коровами, в яких були важкі або патологічні роди. Ректальне дослідження статевих органів у корів

проводять на 4-5-й і 14-15-й дні після родів. Саме у ці періоди найчастіше настають ускладнення перебігу післяродового періоду. Звертають увагу на Величину матки, її консистенцію, локалізацію, температуру, болісність, ригідність і т.п. Пальпують також яєчники для визначення ступеня інволюції жовтого тіла вагітності і наявності фолікула, що росте. Звичайно на 4-й день після отелення матка зменшується наполовину, на 8-й — на $\frac{3}{4}$ від її величини наприкінці вагітності, а з 12 до 15-го дня величина матки наближається до нормальної.

До закінчення післяродового періоду (30-й день) контролюють настання стадії збудження статевого циклу.

Лікувальні і профілактичні заходи проводять з врахуванням результатів діагностики.

5. Патологія та ускладнення у післяродовий період.

Післяродова субінволюція матки – уповільнення зворотного розвитку (інволюції) матки після родів, яке виявляється порушенням моторної функції матки і накопиченням в її порожнині лохій, що піддаються розкладанню і всмоктуванню токсичних продуктів у кров'яне русло.

Хворіють тварини усіх видів, але особливо часто хворіють корови (від 20 до 80 %). У деяких господарствах реєструють захворюваність субінволюцією матки близько 95 %. Перехворювання субінволюцією матки подовжує сервіс-період і знижує молочну продуктивність. На тлі субінволюції матки у 3 рази частіше розвивається ендометрит, а також різні функціональні розлади яєчників і матки, які призводять до тривалих і серйозних порушень відтворної функції тварин.

Етіологія: передумови до виникнення субінволюції матки складаються за умов патологічного перебігу вагітності і пологів.

Основні чинники, які обумовлюють розвиток субінволюції матки такі:

- несприятливі фактори навколишнього середовища, які призводять до порушень метаболізму в організмі корів і у фетоплацентарній системі;
- неповноцінна годівля тварин у період вагітності, особливо в останній третині і після пологів: одностороння і надмірна годівля концентратами, силосом, жомом, бардою при недостатку вітамінів (каротину) і мінеральних речовин (кальцій, фосфор, кобальт,

- цинк), ожиріння, жирове переродження печінки, кетоз;
- згодовування недоброякісного корму, що містить афлатоксини, нітрати, солі важких металів;
 - відсутність моціону і спілкування з самцем;
 - тривала попередня лактація і короткий період сухостою;
 - порушення зоогігієнічних параметрів мікроклімату і санітарних норм у приміщеннях;
 - перерозтягування матки при багатоплідній вагітності, крупноплідності, багатоводді;
 - неправильне ведення пологів, передчасне витягування плода, яке призводить до порушення і ослаблення ритму маткових скорочень;
 - інфікування тварин під час штучного осіменіння і розвиток утробної інфекції, плацентиту;
 - попередні аборти, перехворювання прихованим ендометритом, осіменіння корів з невилікуваним метритом або незакінченою інволюцією статевих органів;
 - затримка посліду, патологічні пологи, травми пологових шляхів;
 - плацентарна недостатність;
 - токсикози вагітності та імунні конфлікти;
 - мастит у сухостійний період (при цьому порушується рефлекторний зв'язок між маткою і молочною залозою);
 - яєчниково-гіпофізарні і наднирникові порушення.

Затримка посліду, післяпологові субінволюція матки і ендометрит у корів мають подібні причини і послідовно розвиваються як родові і післяродові ускладнення. Маючи нозологічний зв'язок, ці захворювання у прогностичному аспекті розглядаються як такі, що можуть виникати при аналогічних діагностико-прогностичних показниках, а виникання одного із захворювань підвищує ймовірність розвитку наступного.

Післяпологова субінволюція матки розвивається на тлі порушення формування і дозрівання плаценти у тварин з патологією ендометрію. При цьому порушується синтез і метаболізм стероїдних гормонів. Функціональна недостатність фетоплацентарної системи виявляється зниженням продукції естрогенів і збільшенням секреції прогестерону в останні дні вагітності. Важливу роль відіграє також недостатня секреція кортизолу наднирниками плода, що є головною причиною слабкості пологової діяльності.

В умовах порушень фетоплацентарної системи і секреторної

активності ендометрію лютеолізини у вигляді простагландину $F_2\alpha$ не виробляються і тому жовте тіло вагітності зберігається, підтримуючи гіперпрогестеронемію і знижуючи скоротливу і бар'єрну функції матки. Естрогени виробляються у менших кількостях і не забезпечують достатню підготовку нервово-м'язового апарату матки, шийки матки і м'яких пологових шляхів до пологів. Деяке значення в цьому має і недостатнє виділення релаксину. Це призводить у свою чергу до «сухих пологів», неповного розкриття шийки матки, слабкості пологової діяльності і розривів слизових оболонок та інших м'яких тканин пологових шляхів.

Післяродові септичні захворювання можуть протікати у вигляді *місцевих септичних вогнищ* або *загального сепсису*. Для їх розвитку у післяпологовому періоді складаються всі необхідні умови: травми статевих органів, їх інфікування у поєднанні із значним ослабленням резистентності організму породіллі. Найчастіше інфікування відбувається неспецифічними мікроорганізмами, вірулентність і розмноження яких на цьому тлі підсилюється. Це головним чином стрептококи, стафілококи, кишкова паличка, синьогнійна паличка, *pseudomonas aeruginosa*, протей, рідше – клостридії-сапрофіти.

Ускладнення післяродового періоду проявляється: залежування після родів; поїдання посліду і приплоду; післяродова еклампсія; післяродове божевілля (невроз); післяродова печінкова кома; післяродова маткова кровотеча; післяродова гемоглобінурія.

Залежування після родів трапляється при остеодистрофії, післяродовому парезі, травматизмі кісток і м'язів (переломи, вивихи, забої м'язів, враження периферійних нервів: поперекового і крижового нервових сплетінь, затульного, стегнових, краніального і каудального сідничних та сідничного нервів; розшарування крижово-клубового суглоба), судинних порушеннях (тромбоз матково-яєчникових судин, внутрішні кровотечі).

Післяродовий парез (родильний парез, гіпокальціємія) – гостре захворювання тварин, зв'язане з порушенням гомеостазу кальцію, яке супроводжується симптомами глибокого розладу нервової системи із занімінням і паралічеподібним станом багатьох органів і систем організму.

Хворіють переважно корови, рідше кози і винятково рідко свині та кобили.

Помічено, що це захворювання спостерігається у високопродуктивних корів середнього віку (5-8 років), коли відзначається найвища молочна продуктивність, і рідко у первісток. Хворіють добре вгодовані тварини, котрі мають концентратний тип годівлі і не користуються моціоном. Частіше захворювання реєструється у перші 2-3 дні після неускладнених пологів; рідше – через 5-6 днів, дуже рідко через кілька тижнів або навіть місяців і як виняток – перед родами. Деякі тварини хворіють при кожному отеленні.

Головною причиною захворювання є зниження у крові рівня кальцію, внаслідок дуже складного порушення регуляторного механізму, в якому беруть участь різні ступені дефіциту кальцію і фосфору, фактори, що сприяють їх всмоктуванню та виділенню, особливо молочна залоза в період пологів і на початку лактації, а також дисбаланс гормонів щитоподібних і паращитоподібних залоз, які регулюють мінеральний гомеостаз.

Близько 99% кальцію в організмі містить скелет, решта знаходиться у клітинній і тканинній рідині. Трикальційфосфат, що депонується у скелеті, може надходити до кров'яного русла і, таким чином, знаходиться у певній динамічній рівновазі між різними органами (шлунково-кишковим трактом, нирками, шкірою та кістками), яка необхідна для підтримання постійної позаклітинної концентрації кальцію і для забезпечення скелета необхідною кількістю цього іону.

Концентрація кальцію у сироватці крові (0,1 г/л) регулюється з дуже високою точністю і змінюється в дуже вузьких межах. Регуляторами цих змін є вітамін D, який каталізує утворення розчинних фосфорних солей кальцію і полегшує їх всмоктування з тонкого кишечника і 2 гормони паращитовидних і щитовидної залоз: паратгормон і кальцитонін, що діють узгоджено, підтримуючи рівень кальцію позаклітинної рідини у фізіологічних межах.

Паратгормон підвищує концентрацію кальцію в крові, діючи на кістки, кишечник і нирки. Під впливом паратгормону остеобласти виробляють невідомий активатор остеокластів, який змінює їх морфологічні і біохімічні особливості так, що вони набувають здатності руйнувати кістку зі звільненням кальцію і фосфору. Він пригнічує реабсорбцію фосфатів нирками і стимулює утворення у нирках найактивнішого з метаболітів вітаміну D, покращуючи, таким чином, всмоктування кальцію у кишечнику. Основна дія

паратгормону виявляється гіперкальціємією, гіпофосфатемією, гіпокальційурією і гіпофосфатурією.

Кальцитонін, навпаки, попереджує гіперкальціємію шляхом пригнічення резорбції кісток і гальмування швидкого або об'ємного всмоктування кальцію із кишечника.

Регуляція системи паратгормон-кальцитонін залежить від рівня кальцію у крові і здійснюється за механізмом зворотного зв'язку: гіпокальціємія викликає позитивну реакцію паращитоподібних залоз у вигляді збільшення секреції паратгормону і негативну реакцію щитоподібної залози у вигляді зменшення секреції кальцитоніну; гіперкальціємія призводить до зворотних змін. Паратгормон і кальцитонін діють в плані кісткової резорбції як антагоністи, і тому можливо, що збільшення секреції кальцитоніну, сповільнює дію паратгормону щодо мобілізації кальцію з кісток і щодо підтримання нормальної концентрації кальцію в період пологів. Концентрація кальцитоніну підвищується у корів з гіперкальціємією.

Встановлено, що згодовування кормів, багатих кальцієм (капуста, рапс, люцерна, буряк) в останній період вагітності призводить до відносної гіперкальціємії, яка за механізмом зворотного зв'язку гальмує активність паращитоподібних залоз і підвищує секрецію кальцитоніну. Механізм ендокринної регуляції кальцієвого гомеостазу з цього моменту виявляється неспроможним швидко відреагувати на дисбаланс, що створився перед пологами у зв'язку з виходом кальцію в молозиво і молоко.

Навпаки, раціон, багатий фосфором, стимулює активність паращитоподібних залоз протягом сухостою і попереджує їх активність зразу після пологів.

Окрім гіпокальціємії у хворих тварин виявляються й інші розлади обміну речовин: гіпофосфатемія, гіпомагнійемія та гіперглікемія. Збільшення глюкози в крові корів, хворих на післяродовий парез, відбувається у результаті зниження рівня кальцію і пригнічення секреції інсуліну (β-клітинами підшлункової залози).

Швидке зниження у крові і особливо у м'язах кальцію і магнію викликає нервово-м'язові розлади, судоми і парези у зв'язку з тим, що ці іони відіграють важливу роль у з'єднанні і дисоціації м'язових білків актину і міозину, здійснюють скорочення. У нервово-м'язових синапсах за участю іонів кальцію виділяється ацетилхолін — медіатор нервового збудження і зв'язується з холінорецептором.

ЛЕКЦІЯ 5

Неонатологія

План:

1. Морфофізіологічні особливості новонароджених тварин.
2. Класифікація хвороб новонароджених тварин.
3. Асфіксія новонароджених.
4. Гіпотрофія і гіпертрофія новонароджених.
5. Гіпотермія новонароджених.
6. Запалення пупка і пупковий сепсис.
7. Контрактура суглобів.

1. Морфофізіологічні особливості новонароджених тварин.

Фізіологію і патологію новонароджених, а також догляд за ними вивчає наука **неонатологія**.

Новонародженою (neoratus) вважається тварина з моменту народження до відпадання пуповини (10-14 днів). Період новонародженості називають *постнатальним* (неонатальним), або *постфетальним*.

У період новонародженості відбувається первинна адаптація організму до нових для нього умов навколишнього середовища. Встановлюється легеневе дихання, змінюється кровообіг, починають виділятися сеча і кал, спочатку у вигляді первородного калу (меконію). З перших днів життя новонародженого починається секреція травних залоз. Змінюється обмін речовин, перебудовуються ферментативні процеси, удосконалюється терморегуляція. Культя пуповини муміфікується і відпадає, а пупкова ранка заживає. Усі ці процеси регулюються центральною нервовою системою і тому важливе значення має ступінь розвитку, ступінь доношеності новонародженого. У доношених плодів механізм адаптації є більш досконалим, ніж у недоношених або переношених. Тільки зрілі і доношені плоди є життєздатними.

Про зрілість і ступінь розвитку новонародженої тварини звичайно судять за її довжиною і масою тіла. Треба пам'ятати, що ці показники можуть дуже коливатися у залежності від виду, породи, віку, величини, умов утримання, годівлі і стану здоров'я вагітної тварини.

Зріле новонароджене теля має довжину 80-100 см, живу масу 20-40 кг, що становить близько 7-9 % від маси тіла матері; усе його тіло вкрите густим волоссям, череп окостенілий, усі 4-6 молочних різців добре виражені.

Зріле новонароджене лоша має довжину 1-1,5 м, живу масу 26-50 кг (8-12 %), усе тіло вкрите густим волоссям, кістки черепа окостеніли, на верхній і нижній щелепах виступають різці, прорізались з кожної сторони по 3 премоляри.

Зріле новонароджене ягня і козеня – 50-60 см, масою 2–3 кг (6-8%), все тіло вкрите кучерявою шерстю, прорізуються 6 різців, є премоляри.

Зріле новонароджене порося – 20-25 см, живою масою більше 1 кг (0,5-1 %), усе тіло вкрите щетиною, кістки черепа окостеніли, є гострі різці, ікла та крайки.

Зріле новонароджене цуценя має довжину 12-20 см і масу – 0,1-0,5 кг. Цуценята народжуються недоношеними у середньому на 2 тижні: вони сліпі, їх повіки розклеюються тільки на 12-15-й день, вони прозрівають і починають повзати. Пуповина відпадає на 2-3-й день після народження. Вушні раковини новонароджених цуценят прикриті і розправляються на 4-5-й день. У перший місяць життя маса тіла збільшується на 2-4 г на 1 кг дорослої собаки даної породи. Кістки черепа мають неокостенілі ділянки – тім'ячка. До 20-го дня у них з'являються молочні зуби: спочатку ікла, через 3-4 дні – різці, а потім і корінні. У 2-2,5 міс нормально розвинені цуценята мають усі молочні зуби. Сім'яники опускаються в мошонку на 4-5 тижні.

Кошенята масою 80-140 г народжуються також із закритими повіками. Пуповина відпадає на 2-3-й день після народження. Сім'яники входять у мошонку до народження. Щотижня їх маса збільшується на 50-100 г. Через 3 тижні у них відкриваються очі і починають прорізуватися зуби. Останнє закінчується на п'ятому тижні.

У собак, кішок і інших тварин, малята яких народжуються слабкими і сліпими, розвинені особливі інстинкти для вигодовування потомства. Зразу після народження вони здатні лише на хаотичні, незначні рухи. Цуценя або кошеня займає положення відповідно за напрямком руху язика матері: від голови по спині. Цей природний безумовний рефлекс примушує малят розвертатися і повзти до будь-якого теплого об'єкта поблизу їх голови: до матері або співбратів. Цей рефлекс забезпечує тісний контакт між малятами та їх матір'ю,

він зникає на 4-й день життя. Цуценя або кошеня смочче матір кожні 1-2 год протягом першого тижня. Вони виділяють меконій, а потім і звичайні калові маси, тільки тоді, коли мати облизує їх після годівлі і лиже у них анус. При цьому вони рефлекторно опорожнюють пряму кишку, а мати злизує і ковтає їх виділення. Це триває до прозрівання малят.

Чим менше новонароджений, тим менша його теплоємність і тим непоправніші втрати тепла. Ось чому цуценята карликових порід, як і кошенята, кроленята і поросята, потребують теплого гнізда-лігва; кімнатна температура для них низька.

Для визначення життєздатності телят, ягнят, поросят і лошат використовують такі показники: маса тварини, температура тіла, частість пульсу і дихання, реакція новонародженого на зовнішні подразники, ступінь прояву вроджених реакцій, реакція на поклик матері, ступінь прояву смоктального рефлексу. При огляді звертають увагу на тілобудову новонародженого, швидкість вставання на кінцівки, час прояву почуття голоду і підходу до молочної залози матері.

2. Класифікація хвороб новонароджених тварин

У період новонародженості зустрічається багато захворювань, які мають різні причини і перебіг.

Патологія вагітності і пологів: асфіксія новонароджених; авітамінози новонароджених.

Погрішності годівлі і утримання новонароджених: гіпотермія новонароджених; запор новонароджених (затримка меконію); запалення пупка і пупковий сепсис; виразка пупка.

Родова травма: повний відрив пуповини; пошкодження внутрішніх органів (розрив сечового міхура у лошат); пошкодження суглобів і кісток.

Пороки розвитку плода і новонародженого: відсутність ануса і прямої кишки; відсутність отвору препуція у самців; контрактура суглобів; фістула урахуса; кровотеча з судин пуповини; аномалії органів кровообігу (незакриття овального отвору); виродки; гіпотрофія і гіпертрофія новонароджених.

Діареї новонароджених.

Асфіксія новонароджених – патологічний стан, який виникає при припиненні або зменшенні надходження кисню і надмірному накопиченні у крові вуглекислоти, розвитку ацидозу.

Такий стан у новонародженого характеризується відсутністю дихання або нерегулярним, судорожним поверхневим диханням при наявності серцевої діяльності. Асфіксія є основною причиною загибелі плода і мертвонародженості при важких пологах (4 % у молочних корів і від 4 до 8 % у м'ясних), а також при тривалих слабких пологах (4 % у молочному і м'ясному скотарстві). Наслідком важкої форми асфіксії можуть бути нервові ускладнення.

Треба пам'ятати, що кровопостачання плода організовано за принципом надходження найбільш насиченої киснем крові до двох пріоритетних органів: мозку і серця.

При асфіксії кровообіг плода адаптується для захисту життєво важливих органів. Реакція плода на часткове зменшення кисню зовсім інша, ніж реакція дорослого організму. У дорослого синдром асфіксії викликає гіпервентиляцію і загальне збільшення надходження крові до всіх ділянок тіла завдяки тахікардії. У плода кров швидко перерозподіляється на користь пріоритетних органів: серця і мозку, у результаті чого настає загальне зниження серцевого об'єму, брадикардія, що дозволяє економити кисень. Таким чином, плід і новонароджений краще адаптовані до втрати кисню, чому сприяє анаеробний метаболізм, який здійснюється шляхом гліколізу. Основним енергетичним матеріалом для гліколізу є глікоген, велика кількість якого міститься у шлуночках серця. Ацидоз стає все тяжчим у міру того, наскільки пригнічується гліколіз. За цих умов серце дуже швидко витрачає глікоген і відчуває «нестачу пального»; якщо його роботу стимулюють шляхом призначення кардіотоніків, то ситуація тільки швидше ускладнюється.

Навпаки, компенсуючи ацидоз шляхом призначення ін'єкцій лужних речовин, можна полегшити серцеву діяльність.

Енергетичним субстратом головного мозку є глюкоза, яка надходить з крові. Таким чином, перерозподіл циркулюючої крові на пріоритетні органи служить не тільки для їх постачання киснем і глюкозою, але й для евакуації продуктів анаеробного метаболізму.

Причини:

у *період вагітності*: порушення матково-плацентарного кровообігу при скороченнях вагітної матки, котрі є максимальними наприкінці першої і у середині останньої третини вагітності. Починаючи з 90-го дня вагітності матка у корови скорочується через кожні 60-90 хв протягом 8-10 хв. У такі періоди об'єм крові у матці зменшується на 16 % і відповідно знижується надходження кисню до

плода; часткове відшарування плаценти; захворювання і патологічний стан організму матері (пороки серця, анемія, гарячка, токсикоз вагітності, плацентарна недостатність, загроза переривання вагітності, утробна інфекція, велике фізичне навантаження); зменшення плацентарного об'єму крові може бути результатом призначення окситоцину, ксилазину та інших медикаментів.

у період пологів: ранній початок скорочень матки (за 36-48 год) перед настанням пологів. Клінічно вони не проявляються, але викликають гіпоксію, вичерпують запаси глікогену у серці плода і він народжується умираючим або спостерігаються випадки мертвонародження; тривалі і слабкі пологи виявляються анемічністю плода; перекручування пуповини; защемлення, розрив пуповини буває частіше при тазовій передлозі; випадкові натягування пуповини при наданні родопомочі можуть викликати закриття пупкових артерій, тому що фізіологічним стимулом для стуляння і облітерації цих судин є розтягування пуповини, після яких поздовжні м'язові волокна скорочуються, потовщуються і закривають просвіт судини; здавлювання голови і грудної клітки плода при його виведенні; виникнення у плода дихальних рухів і аспірація плодових вод.

Симптоми асфіксії:

1. Ранні симптоми-передвісники, що вказують на гіпоксію або на можливість її розвитку можна спостерігати ще перед вклинюванням теляти у просвіт таза як у матері, так і у плода.

у корови: передчасні пологи; слабкапологова діяльність; недостатня підготовка «родового таза»; звуження вульви; скручування матки; забруднення плодових вод меконієм; плацентит; народження близнюків; призначення транквілізаторів.

у теляти: енофтальм (глибоке западання очей в орбіти), який виявляють шляхом пальпації; пожвавлення або апатія; задня передлога із затисненням пупкового канатика.

2. Коли теля уже добре врізалось у тазову порожнину і його мордочка показала з вульви, звертають увагу на колір слизових оболонок і м'язовий тонус язика плода.

Рожевий колір слизових притаманний здоровому теляті. Синій – свідчить про гіпоксію, а білий – про асфіксію, анемію і шок. Язик здорового теляти скорочується помірно, але має добрий тонус. Підвищений тонус, сильні скорочення-контракції є ознаками гіпоксії, а м'якість язика і відсутність його тонусу – ознаками асфіксії.

3. Після народження симптоми асфіксії у телят виявляються

порушенням м'язового тону, дихання, серцевої діяльності, нервової системи.

М'язовий тонус. М'язи новонародженого тверді, знаходяться у тонусі. Зразу після народження теля підіймає, а за хвилину вже нормально тримає голову. Теля, що народилося у стані гіпоксії, залишається розпростертим. Момент, коли теля піднімає голову, свідчить про покращення його стану. Піднімати голову теляті до цього не тільки даремно, але й шкідливо. У випадку, коли тонус відсутній і м'язи подібні на дотик до ганчір'яної ляльки, мова йде про серйозний ступінь асфіксії.

Дихання. Перший вдих після народження глибокий, важкий, часто шумний. Він настає вслід за апное (відсутністю дихання), котре може тривати до 1 хв: за цей час організм переходить від стану морського до стану наземного ссавця. Після цього дихання стає регулярним у кількості 30 дихальних рухів на хвилину і має нормальну амплітуду.

Якщо ж перший вдих після апное не настає, а серце продовжує битися, то асфіксія розвивається дуже інтенсивно.

Про гіпоксію свідчать нижчий норми ритм, нерегулярність і слабка амплітуда дихання.

У випадку, коли опір легеневої судин не був повністю знятим, спостерігають синдром легеневої гіпертензії: важке дихання зі слабкою амплітудою і стогоном при видиханні. При цьому яремні вени роздуті, напружені.

Серцева діяльність. Серцеві скорочення у здорового теляти після народження швидко набувають регулярного ритму: 120 на хвилину. У теляти, яке народилося у стані асфіксії, частота серцевих скорочень дуже сповільнена – 20-30 на хвилину, що є нормальною ознакою пристосування організму до стану гіпоксії.

Нервові розлади. Нормальне теля народжується у бадьорому стані і відкриває очі зразу після того, як голова проходить через вульву. Стан нервових центрів від народження визначають за наявністю двох рефлексів: рефлексу слизових і рефлексу положення тіла. Перший полягає у тому, що при подразненні слизу слизової оболонки соломинкою, добре розвинене теля реагує струшуванням головою і кашлем. Другий проявляється підтягуванням кінцівки у відповідь на її натискування.

Гіпоксія мозку може проявлятися різними ознаками: закриті повіки, ністагм (тремтіння очей), опістотонус (судорожні пози), відтягування очних яблук, спазми.

4. Пізні симптоми гіпоксії.

У випадку, коли організм теляти не може самостійно компенсувати гіпоксію, то незважаючи на те, що тварина видавалася здоровою при народженні, незабаром виявляються різні одиночні або асоційовані симптоми, які свідчать про метаболічний ацидоз або про порушення нервової системи: відсутність смоктального рефлексу; адинамія; гіпотермія: нормальна температура у теляти через 4-5 год після народження – 38,8 °С, тоді як при серйозній гіпоксії вона може знижуватися до 34 °С; анемія; зниження рН до 6,9 (у нормі при народженні рН – 7,3, а через 12 год – 7,2).

Гіпоксія з анемією виявляється через 3-6 год після народження адинамією, легкою гіпотермією, блідістю слизових (краще оцінювати за станом слизової очей), утрудненим диханням, а інколи ознаками гіпоксії мозку з похитуванням головою.

Гіпоксія з гіпометаболізмом виявляється через 12 год після народження адинамією, анорексією, цианозом слизових і гіпотермією (мордочка холодна, але теля не тремтить). Температура 34°С і нижче свідчить про настання смерті; 35°С у віці 2 год може бути відновлюваною, але у віці 12 год є смертельною. Хорошою у прогностичному плані є температура 36 °С. Одночасно спостерігають атонію травної трубки: сичуг блокований і здувається, коли теля напувають силоміць.

Синдром тахікардії і утрудненого дихання (диспное) проявляється приблизно через 24 год після народження і призводить до одужання або ж до загибелі через наступні 24 год. Теля має утруднене дихання (120 на хв), тахікардію (180 уд/хв), збуджене, відчуває себе дискомфортно, зморщуючи мордочку. Такий стан розвивається при некомпенсованій гіпоксії, поєднаній з дефіцитом вітамінів і мікроелементів.

Ускладнення гіпоксії. Спостерігаються у перші дні життя у вигляді відсутності смоктального рефлексу, затримки розвитку.

Діагностика гіпоксії. Точна діагностика гіпоксії і оцінка її ступеня можливі тільки після народження. Однак уже в період пологів можна оцінювати стан плода і обирати оптимальну стратегію для забезпечення його виживання.

Перед народженням сукупність таких симптомів, як забруднення плодових вод і енофтальм, дозволяють передбачати те, що теля не зможе перенести акушерські маніпуляції і потребує якомога швидшого витягування. Наявність крові у плодових водах дає підставу гадати про анемію плода і потребує негайної родопомочі.

У період пологів можна спостерігати такі ознаки розвитку гіпоксії: спочатку наростає цианоз слизових, потім все сильніше скорочується язик і, нарешті, зупиняється. Це вказує на те, що ситуація дуже складна: цианоз слизових з нормальним м'язовим тонусом – легка гіпоксія; цианоз з відсутністю м'язового тону – тяжка гіпоксія; бліді слизові з повною втратою м'язового тону – гіпоксія і шок (теляті загрожує швидка загибель).

Після народження зустрічаються різні ситуації: серце не б'ється, м'язовий тонус відсутній – теля мертве; серце б'ється, дихальні рухи відсутні (при наявності симптомів гіпоксії думають про враження центру продовгуватого мозку; при відсутності симптомів гіпоксії, і наявності сильної захисної реакції у теляти у вигляді характерних рухів із різким розслабленням тазових кінцівок, можна гадати, що гальмування мозковим центром дихання у фетальний період не було зняте після пологів); серце б'ється, теля дихає, але реєструють різні ступені гіпоксії. Для їх оцінки краще користуватися шкалою Апгара.

Надання допомоги новонародженим у стані асфіксії. Асфіксію плода при народженні можна попередити, добре знаючи перебіг родів і майстерно володіючи прийомами родопомочі. Перш за все, треба уміти визначити ступінь підготовки до родів, звертаючи увагу на наявність порушень тривалості стадій родів, які передують виведенню плода, і розходжень часу і ступеня розкриття каналу шийки матки. Наприклад, у корови народженню плода передують спочатку у середньому протягом 1,5 год перейми тривалістю до 1 хв з інтервалом 6-7 хв, потім протягом 1,5 год майже безперервні перейми і потуги, коли топтання тварини чергується з ляганням і вставанням, після чого настає півторагодинний період, коли виходить алантоїс, підсилюються пологові сили, показуються передлеглі члени плода, розривається амніон і виводиться теля. При цьому за 5-9 год до народження плода шийка матки відкривається на 2-3 пальці (2-8 см), за 2-8 год – на ширину долоні (8-12 см), а за 1-5 год – на ширину передпліччя (12-26 см). Якщо тривалість різних стадій подовжується, необхідно провести акушерське дослідження і встановити його

причину.

Треба контролювати відношення об'єму плода до об'єму пологових шляхів: якщо потягування за одну кінцівку призводить до відставання другої, то це значить, що лопатки не входять у таз корови.

При затримці народження плода з різних причин треба надати рододопомогу якомога швидше.

Послідовність лікарських призначень повинна бути такою:

1. Евакуація фетальної рідини з верхніх дихальних шляхів рукою, тканиною, шляхом відсмоктування або підвішування плода за задні кінцівки чи перегинання головою вниз через коліно на 30-60 с і звільнення у цей час рота і носа від слизу (при виконанні цієї маніпуляції телят можна струшувати, а козлят і ягнят - розкручувати розпрямленою рукою). Розтирають полотенцем тіло, оприскують холодною водою або прикладають лід до голови і грудей.

2. Стимуляція дихального центру продовгуватого мозку шляхом негайного призначення дихальних аналептиків (відновлювачів). Якщо появляються дихальні рухи, можна стимулювати їх нашатирним спиртом, для чого просочений ним тампон підносять до носа. У випадку різкого пригнічення дихального центру показано введення у пупкову артерію маленьким тваринам 2-5 мл 10 %-ного розчину кальцію глюконату або 1-2 мл кальцію хлориду.

3. Опускають новонародженого на землю і кладуть на правий бік.

4. Проводять штучне дихання: регулярно натискають рукою у ділянці грудної стінки приблизно протягом 3с з таким же інтервалом, під час якого можна вводити повітря через ніздрю шляхом вдування, або зі спеціального апарата. Другу ніздрю і рот при цьому треба закрити. Штучне дихання продовжують, поки б'ється серце. Маленьким тваринам частіше виконують розгинання і згинання грудних кінцівок з натискуванням на грудну клітку, які чергують з рухами грудної клітки шляхом захоплювання пальцями реберної дуги і розширення грудної клітки разом з витягуванням язика з ротової порожнини (вдих), і стискування грудної клітки і опускання язика (видих).

5. Боротьба проти ацидозу (1,4 %-ний розчин бікарбонату натрію 500,0 або 5 %-ний у дозі 50 мл через молочний катетер у пупкову вену).

6. Зняття опору легеневих судин: киснетерапія або тілазолін.

7. При анемії переливають материнську кров у дозі 1 л.

8. Забезпечення енергією нервової тканини (5 %-ний розчин глюкози 250-500 мл в/в).

9. Полегшити збагачення киснем головного мозку (мозкові оксигенатори). При гіпоксії деякі зони головного мозку можуть бути «дезактивовані» ішемією без руйнувань. Наприклад, при враженні смоктального центру. Ці зони можна активувати названими препаратами завдяки їх здатності до вибіркової дії, перерозподіляти кров саме у зони ішемії і стимулювати використання кисню і глюкози клітинами мозку.

10. Боротьба з гіпотермією.

11. Своєчасне напування молозивом у дозі 40 мл/кг маси тіла (дає необхідну енергію, тепло, імуноглобуліни).

4. Гіпотрофія і гіпертрофія новонароджених

Гіпотрофія новонароджених – порушення росту і розвитку плода як результат недостатнього живлення в утробний період розвитку. Зустрічається вроджена і набута гіпотрофія новонароджених.

Розрізняють також *функціональну* (відсутність рефлексу руху протягом 60 хв і більше та ссання протягом 70 хв і більше після народження теляти) і *морфофункціональну гіпотрофію* новонароджених телят (ознаки морфологічної незрілості та порушення рефлексів руху і ссання), які реєструються відповідно у 34 % і у 63 % випадків.

Гіпотрофія у телят є однією з основних причин, що знижують життєздатність новонароджених. Телята-гіпотрофіки погано розвиваються, мають низький приріст маси тіла, масово перехворюють у перші дні після народження діареями, а потім респіраторними захворюваннями зі значним відходом.

Причини: аліментарно-дефіцитні (недостатність раціону вагітних корів за загальною поживністю, перетравним протеїном, цукрами, вітамінами, макро- і мікроелементами), а також використання кормів низької якості; гінекологічні та метаболічні хвороби матері; плацентарна недостатність. За даними Є. Є. Костишина із співавторами (2002), *аномалії плацентації*, що виявляються зменшенням кількості котиледонів, змінами порядку і місця їх локалізації, викликають гіпотрофію плода зі зниженням маси тіла до 15-18 кг з клінічними ознаками гіпоксії; утробна інфекція.

Клінічні ознаки: низька маса тіла, запізнілий рефлекс вставання (більше години після народження), телята більше лежать, встають важко, голова опущена, тонус м'язів ослаблений. Шкіра сухувата, нееластична, видимі слизові оболонки анемічні. Характерною ознакою є недорозвиненість зубної аркади (4 різці і менше, навколо яких на яснах знаходиться червона кайма). Апетит знижений, смоктальний рефлекс запізнюється, зменшено виділення сичужного соку, низька активність травних ферментів, розлади травлення, діарея.

Розрізняють 3 стадії гіпотрофії:

Перша характеризується задовільним загальним станом тварин, значним зменшенням пружності шкіри і м'язів, меншою на 10-15 % від породних вимог масою тіла, незначним порушенням рефлексів руху і смоктання.

Друга стадія проявляється відставанням телят у масі на 20-25 %, майже повною відсутністю підшкірної жирової клітковини, зменшенням еластичності шкіри (шкіра легко збирається у складки), зниженням температури тіла на 0,5 °С, слабким проявом рухового і смоктального рефлексів.

Третя стадія – характеризується зниженням маси на 30-50 %, відсутністю підшкірної жирової клітковини, зморшкуватістю шкіри, зменшенням температури тіла на 1-2 °С.

Лікування: забезпечують тепло і належні гігієнічні умови; новонароджених телят добре розтирають, обігрівають попоною та інфрачервоними променями, частіше випувають молозиво, випоюють відвари на 1 %-ному розчині NaCl квітів ромашки, звіробою, кінського щавлю з додаванням вітаміну С 0,5 г, глюкози 10-20 г та суміші виявлених дефіцитних мікроелементів, призначають препарати, що стимулюють роботу шлунково-кишкового тракту: натуральний кінський шлунковий сік по 40 мл 2 рази на день, за 15-20 хв. до напування молозивом.

Гіпертрофія новонароджених – перерозвиненість плода. Зустрічається у телят при хорошій годівлі тільних корів.

Телята народжуються великими, але фізіологічно незрілими з причини порушення системи мати-плацента-плід. У крові таких корів збільшується кількість гормонів, що виробляються наднирниками (кортизол). Проходячи через плаценту, вони активізують обмінні процеси у плода, але пригнічують розвиток його наднирників. У результаті велике теля народжується з недорозвиненими

наднирниками і тому погано адаптується до нових умов післяутробного життя і гине.

Лікування має бути направленим на відновлення функціональної недостатності, підвищення тонуусу організму.

5. Гіпотермія новонароджених.

Новонароджений має незначні енергетичні запаси, які вичерпуються за кілька годин, особливо у разі затримки або давання недостатньої кількості материнського молозива. При перебуванні новонародженого до напування молозивом на холоді температура його тіла знижується і розвивається гіпотермія. Сприяють гіпотермії стан гіпоксії новонародженого (після ускладнених пологів), відсутність облизування роділлею, слабкість і перебування на холоді або на холодному вітрі.

В нормі через кілька годин ректальна температура у теляти встановлюється між 38,8-39,2 °С. Це залежить від температури повітря, активності самого новонародженого, його облизування і прийому молозива. Тремтіння свідчить про боротьбу організму з холодом, завдяки чому мінімальна температура стабілізується на рівні 38,3 °С. Нижча температура тіла вказує на нездатність організму компенсувати втрати тепла і розвиток гіпотермії. Стан гіпотермії може бути оборотним, якщо тварину помістити у тепле місце. При зниженні температури тіла до 36°С і нижче ситуація стає необоротною і призводить до смерті теляти.

Попередження гіпотермії полягає в оволодінні правилами ведення пологів, головним чином, у проведенні 2 заходів:

- випоювання 1-2 л молозива не пізніше 2 год після народження;
- попередження зниження температури нижче — 10 °С і протягів на рівні тіла новонародженого.

У випадку переохолодження теля слід покласти на рясну солом'яну підстилку і укрити теплим укритвом на 8-12 год, після чого дати молозиво. Можна також використовувати інфрачервону лампу або обігрівач.

6. Запалення пупка і пупковий сепсис.

Запалення пупка, судин пуповини – захворювання, яке виникає при інфікуванні мікроорганізмами пупкового канатика у перші години життя і виявляється лихоманкою, утворенням болісного припухання у ділянці пупка, а іноді й розвитком перитоніту, поліартриту і сепсису.

Хворіють частіше телята, поросята, цуценята.

Причини: відсутність або неправильна обробка пупкового канатика, антисанітарні умови утримання новонароджених. Основною причиною омфаліту є проникнення у травмовані судини пуповини синьогнійної чи кишкової палички, протея, коків і бацил (кlostридіум, перфрингеис, і т. п.). Ці мікроорганізми заносяться руками тваринників при розриві пуповини або із підстилки. Сприяє захворюванню гіпотрофія плода, вирощування телят тривалий період в одному приміщенні без його очищення, дезинфекції і «відпочинку».

Загальноприйнято, що це захворювання є результатом низького рівня ведення тваринництва і розвивається у господарствах, де грубо порушуються правила утримання, догляду і годівлі тільних корів і новонароджених телят. Але, при народженні телят-гіпотрофіків і їх масовому перехворюванні колібактеріозом, реєструються випадки, коли пупковим сепсисом хворіють майже всі новонароджені, навіть при дотриманні санітарних правил, до того ж із першого дня після народження.

Запалення пуповини у цуценят може бути спричиненим захворюванням зубів матері.

Клінічні ознаки. Перші симптоми виявляються через 10-48 год після народження у вигляді загального пригнічення, відмови від смоктання молока і підвищення температури тіла до 39-40,5 °С. Характерна поза – тварина стоїть з підтягненим животом. Пупковий канатик потовщений, болючий. Доторкування до черевної стінки у ділянці пупка викликає виразну больову реакцію; живіт напружений. Телята гинуть на 1-2-гу добу від сепсису. Інфекція швидко розповсюджується внаслідок того, що судини пупка, котрі ще не піддалися облітерації, мають прямий шлях до печінки і сечового міхура новонародженого.

Якщо захворювання розвивається у старших телят і набуває хронічного перебігу, то пуповина повільно (більше 10 днів) висихає (мацерація), виявляються ознаки артритів, пневмоній. Такі телята погано ростуть і розвиваються.

В окремих випадках у центрі пупкового канатика утворюється виразка, оточена грануляційним валком і покрита гнійним ексудатом, яка довгий час не загоюється.

Лікування. Застосовують антибіотики, в якості першого призначення – звичайно, пеніцилін із стрептоміцином, але при масовому захворюванні тварин – тільки після дослідження на чутливість. Частина дози вводять внутрішньом'язово, частину – у

клітковину навколо пупкового канатика. Добре діють гентаміцин, окситетрациклін -100 або 200, енроф локсацин-50 або 100. Ефективні обколювання 7 %-ним розчином іхтіолу.

У залежності від стану тварини призначають серцеві і полівітамінні препарати.

Профілактика. Треба навчити персонал, який приймає роди, як правильно обробляти пуповину новонародженого. Пупковий канатик краще розривати, відступивши у великих тварин на відстані 10-12 см від черевної стінки, після його розтягування між двома руками. Можна розрізати ножицями чи ножем, але розрізати у ділянці розтягування. Такий спосіб забезпечує, по-перше, потовщення судинної стінки від натягування і швидку зупинку кровотечі, а по-друге, втягання судини в глиб пуповини, що попереджує контакт кінців судин із елементами підстилки і т. п. Культю пуповини треба занурити у стакан із йодно-гліцериновим розчином. Новонароджених треба приймати на чисту мішковину або брезент. Вагітних тварин годують за повноцінним раціоном з введенням у його склад мікроелементів і вітамінізують; надають регулярний моціон. У приміщенні, де проходять роди, повинно бути чисто; потрібно проводити періодичні дезинфекції.

7. Контрактура суглобів (*contractura arthronis*) – обмежена рухливість суглобів у результаті скорочення зв'язок, сухожиль або м'язів.

Зустрічається також *анкілоз* (від *грец.* *agkylos* – зігнутий) – нерухливість суглобів внаслідок зрощення суглобових поверхонь.

Хворіють найчастіше новонароджені телята і лошата. Вражаються як передні, так і задні кінцівки.

Етіологія цього захворювання ще не зовсім з'ясована. Деякі види патологій успадковуються.

Клінічні ознаки: різні, у залежності від локалізації і тяжкості патологічного процесу. Бувають у вигляді повного анкілозу деяких суглобів (частіше плутових) або порушень постави кінцівок (опора на зацеп або, навпаки, на підшву).

Особливою формою контрактури, яка зустрічається тільки у телят, є *контрактура ікроножних м'язів*. Кінцівка у цьому разі дуже випрямлена, перенесена назад, зв'язка скакального суглоба напружена, відзначається опирання на передній край копитця (зачеп).

ЛЕКЦІЯ 6

Фізіологічні основи трансплантації ембріонів.

План:

1. Значення трансплантації ембріонів тварин.
2. Відбір тварин-донорів та вимоги до них.
3. Відбір тварин-реципієнтів.
4. Викликання суперовуляції у донорів.

1. Значення трансплантації ембріонів тварин

Під трансплантацією ембріонів розуміють видобування ембріонів з статевих шляхів самок-рекордисток і пересадка їх в статеві шляхи менш продуктивним самкам-реципієнтам. Найбільш широко цей біотехнологічний метод застосовується в скотарстві. Перевагою трансплантації ембріонів є можливість одержання від самок-рекордисток нащадків значно більше, ніж при фізіологічній репродукції. Потенційна можливість яєчників корів нараховує 300–400 тис. зародкових клітин, але за один естральний цикл овулює лише 1–2 клітини, тому за рік в середньому одержують одного нащадка.

Статевий цикл в корів в нормі складає в середньому 21 день, з відхиленнями від 17 до 24 днів і поділяється на чотири періоди: еструс, метеструс, дієструс та проєструс. Еструс характеризується проявленням охоти, яка продовжується в середньому від 10 до 14 годин з коливанням від 3 до 36 годин. В цей період швидко росте фолікул на яєчнику. В корів овуляція настає після закінчення охоти через 10–15 годин з коливаннями від 10–54 годин, або через 24–30 годин після початку охоти.

Ріст фолікулів забезпечує збільшення рівня гіпофізарного ФСГ в крові. В передовуляційний період баланс гіпофізарних гормонів зміщується від ФСГ до ЛГ (лютеонізуючий гормон), завдяки чому відбувається овуляція і початок формування жовтого тіла.

Метеструс, або період після охоти, продовжується 3 дні і характеризується припиненням вироблення яєчниками естрадіолу, тому зменшується гіперемія, набухання і ослизнення вульви, піхви і шийки матки.

В дієструс, або лютеальну фазу, повністю розвивається жовте тіло, яке секретує гормон прогестерон, під впливом якого ендометрій матки розвивається для підтримки вагітності. Якщо вагітність не

наступає, жовте тіло функціонує тільки 17–19 діб, а після дегенерує, що вказує на підготовку до нової охоти.

Проєструс, або підготовчий період, характеризується підвищенням в організмі рівня ФСТ, під впливом якого підвищується і посилюється ріст фолікулів, які в свою чергу збільшують секрецію естрогенних гормонів – естрадіолу, естрону і естріолу. Під впливом естрогенів посилюється кровопостачання статевих органів. Слизова шийки і матки набуває яскраво-червоного кольору, вульва, піхва і шийка матки набухають, починається виділення слизу з цервікального каналу – настає слідуєчий статевий цикл.

2. Відбір тварин-донорів та вимоги до них.

Донорів відбирають, виходячи з мети трансплантації, і враховують цілий ряд зооветеринарних вимог. При відборі в донори використовують дані первинного зоотехнічного і племінного обліку, показники клінічної та гінекологічної диспансеризації, результати вагінального та ректального дослідження статевих органів.

Корови повинні бути чистопорідні, по комплексу селекційних ознак відповідати вимогам класу еліта-рекорд:

- молочна продуктивність за декілька лактацій повинна на 50–60 % бути вище стандарту породи, а вміст жиру і білку в молоці – рівним або вищим за стандарт;
- корова повинна мати відоме походження, мати в родоводі видатних предків, підтверджене племінним свідоцтвом;
- при відборі враховується форма вимені, швидкість молоковіддачі, резистентність до стресових явищ виробництва.

Відбір корів-донорів проводять в господарствах, благополучних по інфекційним, вірусним та інвазійним захворюванням:

- корови повинні бути клінічно здорові, перевірені на туберкульоз, бруцельоз, інвазійні хвороби;
- корови повинні бути середнього віку, бажано з 3–5 лактацією.

Вибраковані корови можуть використовуватись тільки при високій племінній і продуктивній цінності, хорошому здоров'ї і при умові, що причини вибраковки не пов'язані з репродуктивною здатністю:

- корови повинні мати нормальні статеві цикли, легкі роди, без затримок посліду, без післяродових захворювань статевих органів, не мати маститів.

Кінцевий відбір проводять після встановлення реакції яєчників на введення гонадотропних препаратів і пробного вимивання ембріонів:

- реакція яєчників повинна бути не менше 5 жовтих тіл і не менше 4 повноцінних ембріонів, придатних до заморожування або пересадки.

В умовах господарства корів-донорів можна використовувати разово або багаторазово. При разовому використанні корова після вимивання ембріонів в наступну охоту осіменяється і використовується як молочна. Корови донори, які знаходяться в центрі трансплантації, використовуються для багаторазового одержання ембріонів. Після вимивання ембріонів донор приходить в охоту через 30–40 днів, але доцільно пропустити 2-3 цикли після вимивання, а тоді знову починати гормональну обробку.

3. Відбір тварин-реципієнтів.

Реципієнтом може бути телиця або корова, яка по племінній якості нижче за донора. Реципієнту пересаджують в роги матки один чи два ембріони або після штучного осіменіння підсаджують ще один ембріон. Співвідношення реципієнтів і донорів повинно бути 3 або 5 до одного.

При відборі реципієнтів виходять з таких вимог до них:

- реципієнти повинні бути клінічно здорові, з добре розвинутою статевою системою, без патології статевих шляхів;
- відбирають тварин міцної конституції, розвинених не нижче стандарту по породі. Телиці повинні бути парувального віку, 16-18 місяців, живою масою 350-420 кг;
- з метою запобігання розповсюдження інфекційних та інвазійних хвороб реципієнтів досліджують за тими ж показниками, що й донорів.

Не використовують в якості реципієнтів тварин дрібних порід для пересадки ембріонів від порід, більш крупних за масою. При ректальному дослідженні тварин-реципієнтів оцінюють функціональний стан та розміри яєчників, наявність фолікулів та жовтих тіл.

Пересадку ембріонів реципієнтам проводять на 7-8 день після статевої охоти при наявності на яєчнику функціонуючого жовтого тіла, розміром не менше 1-1,5 см.

Однією з головних умов одержання якісних ембріонів і життєздатних нащадків є науково обґрунтована годівля та утримання донорів і реципієнтів. Тому їх забезпечують повноцінною годівлею, відповідними умовами утримання, активним моціоном та уважним спостереженням за проявами статевих циклів.

4. Викликання суперовуляції у донорів.

Викликання суперовуляції у донорів засновано на підвищенні вмісту в їх крові фолікулостимулюючого гормону (ФСГ), за рахунок чого відбувається стимуляція дозрівання багатьох фолікулів, індукція в відповідний момент регресії жовтого тіла і овуляції максимальної кількості зрілих фолікулів. В практику виробництва впроваджено застосування для викликання суперовуляції препарати сироваточного гонадотропіну сироватки крові жеребних кобил (СЖК), та гіпофізарного гормону – фолікулостимулюючого (ФСГ).

Викликання суперовуляції за допомогою СЖК.

Для викликання суперовуляції застосовують препарати СЖК – Гравогормон та серогонадотропін виробництва Росії, гонадотропін СЖК – Чехія, маротропін – Німеччина, ГСЖК фолігон – Голандія та інші. В тваринництві СЖК використовується в нативному, очищеному, концентрованому та порошкоподібному вигляді, одержаному шляхом ліофілізованої сушки сироватки крові кобил.

Кров у жеребних кобил беруть на 50–100 день жеребності один раз на тиждень з розрахунку 10 мл на 1 кг живої маси тварини, т.п. 4–5 літри від кожного донора. Завадовський М.М. встановив, що гонадотропний гормон СЖК виробляється клітинами ендометрію кобил з 40 по 130 жеребності, максимальна його концентрація буває на 50–100 день. Він не проходить через нирочні фільтри і тому не виявляється в сечі. Сироваточний гонадотропін володіє фолікулостимулюючою і лютеїнізуючою дією, причому перша в 2–3 рази сильніша за другу.

Гормональний титр сироватки визначений за вмістом гонадотропінів, коливається від 60 до 300 І.О. в 1 мл нативної сироватки, що в середньому складає 120–180 І.О. в 1 мл. Оптимальною дозою СЖК для викликання суперовуляції вважається 5–6 тис. І.О. нативного або 2,5–3 тис. І.О. очищеного препарату. Збільшення дози СЖК викликає імунні реакції з утворенням антитіл проти гонадотропінів і навіть анафілактичні явища – шок. Тому

спочатку необхідно вводити 2 мл препарату і лише при відсутності побічних явищ вводити залишкову кількість. При застосуванні очищених препаратів СЖК, таких як фолігон, немає потреби робити пробу.

При викликанні суперовуляції застосовують різні схеми гормональної обробки корів-донорів (таблиця 6.1).

Таблиця 6.1

Схеми підготовки корів-донорів за допомогою СЖК

День естрального циклу	Назва препарату	Доза
Схема 1		
8 - 13	Гонадотропін СЖГ	2000 – 3500 І.О.
Продовження таблиці 1		
10 - 15	Простагландин	30 – 50 мг або 500 мкг
12 - 17	Охота і осіменіння	
21 - 23	Вимивання ембріонів	
Схема 2		
10 - 12	ГСЖК	3000 – 3500 І.О.
	Хоріогонін	500 І.О.
12 - 14	Простагландин	30 – 50 мг або 500 мкг
14 – 16	Охота і осіменіння	
21 - 23	Вимивання ембріонів	
Схема 3		
2	Вітаміни А, Е	150000 М.О., 100 мг
	Йодистий калій	100 – 200 мг
10 - 12	ГСЖК	2500 – 3000 І.О.
	Вітамін А, Е	75000 М.О., 50 мг
12 - 14	Простагландин	30 мг або 500 мкг
14 - 16	Охота і осіменіння	
21 - 23	Вимивання ембріонів	
Схема 4		
0	Вітамін А, Е	150000 М.О., 100 мг
	Йодистий калій	100 – 200 мг
	Санація матки	100 – 150 мг
10 -12	ГСЖК	2500 – 3000 І.О.
	Вітамін А, Е	75000 М.О., 50 мг
12 - 14	Простагландин	30 мг або 500 мкг
14 - 16	Охота і осіменіння	
21 - 23	Вимивання ембріонів	
24 - 26	Простагландин	30 мг або 500 мкг

За “0” день циклу приймається день спонтанної повноцінної охоти. В цей день проводиться дослідження статевих органів, при потребі санація матки та вводяться внутрішньом’язево вітамінні препарати.

На 10–12 день циклу проводять ректальне дослідження і якщо яєчник має повноцінне жовте тіло, то починають гормональну обробку донора з метою викликання суперовуляції. Введення препаратів повинно проводитись в один і той же час, краще вранці або ввечері.

В таблиці вказана доза ГСЖК в межах для корів-донорів з різною живою масою. Вітчизняні препарати ГСЖК вводять одноразово внутрішньом’язево в максимальних дозах – 3000-3500 І.О. Препарат фолігон (Голандія) вводять в дозах значно менше – 2000-2500 І.О. на корову. Це пов’язано з тим, що високі дози фолігону можуть викликати кістозне переродження яєчників, тому корови-донори не відновлюють статевого циклу.

Схеми викликання поліовуляції з застосуванням ГСЖК, при вірному і обережному використанні досить ефективні. Так, кількість дозрілих фолікулів на момент овуляції при введенні ГСЖК становить 9–12 і більше на один яєчник. Однак в багатьох випадках фолікули дозрівають несинхронно, час їх дозрівання розтягується, це пов’язано з великим періодом піврозпаду ГСЖК – 5-6 діб. Тому на час вимивання (7-8 день) в яєчнику виявляється разом з жовтими тілами значна кількість овульованих або неовульованих фолікулів. Крім того, часто важко підібрати оптимальну дозу ГСЖК, а при передозуванні викликається кістозне переродження яєчників. Багаторазова обробка донорів ГСЖК викликає імунний ефект, в результаті на ньому утворюються імунні тіла, які призводять до зменшення овуляції, асинхронної функції яєчників і матки. У зв’язку з цим виникає необхідність обробки донорів СЖК-антисироваткою, яка нейтралізує небажану довгострокову дію ГСЖК.

Викликання суперовуляції за допомогою ФСГ.

Фолікулостимулюючий гормон (ФСГ) – гормон передньої долі гіпофізу, він сприяє росту фолікула і дозріванню яйцеклітини. ФСГ при викликанні суперовуляції дає більш високі і стабільні результати в порівнянні з ГСЖК. Так ФСГ забезпечує значно більший вихід якісних і нормальних ембріонів на одного донора. Якщо при введенні ГСЖК вихід нормальних ембріонів складає в середньому 3–5 за одну обробку, то ФСГ забезпечує значно більший вихід ембріонів – 7-10.

При введенні ФСГ зустрічається менше випадків залишкових патологічних явищ в яєчниках. Реакція яєчників на ФСГ менш бурхлива, ніж при введенні ГСЖК. Яєчники хоча і вміщують більше розвинутих фолікулів, але не так сильно збільшуються в об'ємі і не такі чутливі при пальпації. Єдиним недоліком схем застосування ФСГ є багаторазовість його введення, що може викликати небажані стресові явища та потребує значних затрат праці.

Загальна доза ФСГ складає 50 мг на донора на одну обробку. Вводять ФСГ протягом 4–5 днів вранці і ввечері. Інтервал між ін'єкціями 12 годин, його необхідно суворо дотримуватись.

Але у багатьох центрах по трансплантації використовують інші схеми обробки донорів на ФСГ (таблиця 9.2).

Таблиця 6.2

Схеми підготовки корів-донорів за допомогою ФСГ

День циклу	Схема 1		Схема 2		Схема 3		Схема 4	
	Ранок	Вечір	Ранок	Вечір	Ранок	Вечір	Ранок	Вечір
0	Вітамін А, Е		Вітамін А, Е		Вітамін А, Е		Вітамін А, Е	
	150000 М.О.		150000 М.О.		150000 М.О.		150000 М.О.	
	100 мг		100 мг		100 мг		100 мг	
10	ФСГ		ФСГ		ФСГ		ФСГ	
	7 мг	7 мг	2,5 мг	2,5 мг	5 мг	5 мг	6 мг	6 мг
11	ФСГ		ФСГ		ФСГ		ФСГ	
	6 мг	6 мг	5 мг	5 мг	5 мг	5 мг	5 мг	5 мг
12	ФСГ		ФСГ		ФСГ		ФСГ	
	5 мг	5 мг	7,5 мг	7,5 мг	5 мг	5 мг	3 мг	3 мг
	ПГF _{2α}		ПГF _{2α}		ПГF _{2α}		ПГF _{2α}	
	500 мкг		500 мкг		500 мкг		500 мкг	
13	ФСГ		ФСГ		ФСГ		ФСГ	
	4 мг	4 мг	7,5 мг	7,5 мг	5 мг	5 мг	3 мг	3 мг
14	ФСГ		ФСГ		ФСГ		ФСГ	
	3 мг	3 мг	2,5 мг	2,5 мг	5 мг	5 мг		
	Осіменіння		Осіменіння		Осіменіння		Осіменіння	
15	Осіменіння		Осіменіння		Осіменіння		Осіменіння	
21 - 22	Вимивання ембріонів		Вимивання ембріонів		Вимивання ембріонів		Вимивання ембріонів	

Як видно з таблиці, разом зі схемою, яка передбачає щоденні введення однакових доз ФСГ, застосовується схема 1 з пониженням кількості введеного препарату, а також схема 2 з наростанням дози препарату. Схема 4, яка розроблена нами, розрахована на зменшення

загальної дози введення ФСГ до 34 мг на донора. Ця схема включає 4 дні обробки корів-донорів. Починають введення препарату на 10-й день статевого циклу і вводять ФСГ вранці і ввечері зменшуючи дозу з 12 мг у 1-й день обробки до 6 мг на 4-й.

На 3-й день обробки коровам вводять синтетичний аналог простагландину F_{2α}. Вимивали 5-6 якісних ембріонів, придатних до пересадки та заморожування. Для проведення планомірної підготовки до трансплантації груп донорів і реципієнтів складається гормонограма, яка дозволяє контролювати хід робіт на протязі всього періоду роботи з тваринами. Приведена гормонограма розроблена при застосуванні фолітропіну, аналогічно складається гормонограма для всіх препаратів при трансплантації ембріонів.

ГОРМОНОГРАМА

підготовки корів-донорів і телиць-реципієнтів

Господарство _____ району _____ області _____
 _____ (при використанні фолітропіну) 200_ рік

№ п/п	Назва заходів	Група донорів				
		Приклад	I	II	III	IV
1.	Відбір корів після отелу до	10.01				
2.	Перше гінекологічне обстеження (наявність жовтих тіл яєчників)	22.01				
3.	Друге гінекологічне обстеження (контроль наявності жовтих тіл яєчників)	12.02				
4.	Перше визначення прогестерону	12.02				
5.	Друге визначення прогестерону	19.02				
6.	Інв. номер корів-донорів					
7.	Перше введення естрофану (при наявності жовтих тіл яєчників) введення вітамінів А, Д, Е	25.02				
8.	Друге введення естрофану (при наявності жовтих тіл яєчників) введення вітамінів А, Д, Е	07.03				
9.	Виявлення статевої охоти	10.03				
10.	Визначення прогестерону	10.03				
11.	Контроль жовтого тіла яєчників і введення вітамінів А, Д, Е	19.03				
12.	Введення фолітропіну-I (8 – 20 год.)	20.03				
13.	Введення фолітропіну-II (8 – 20 год.)	21.03				
14.	Введення фолітропіну-III (8 – 20 год.)	22.03				
15.	Введення фолітропіну-IV (8 – 20 год.) Введення естрофану (8 – 20 год.)	23.03 23.03				
16.	Осіменіння (8 – 19 год.)	25.03				
17.	Повторне осіменіння через 12 год.	26.03				
18.	Вимивання ембріонів	01.04				

Відбір тварин-реципієнтів						
1.	Відбір реципієнтів	29.01				
2.	Гінекологічне обстеження	05.03				
3.	Інв. номер реципієнтів					
4.	Перше введення естрофану (8 год.) введення вітамінів А, Д, Е	11.03				
5.	Друге введення естрофану – 16 год. (при наявності жовтих тіл яєчників) введення вітамінів А, Д, Е	22.03				
6.	Виявлення статевої охоти	25.03				
7.	Контроль жовтого тіла	01.04				
8.	Пересадка ембріонів 01.04					

ЛЕКЦІЯ 7

Технологія видобування ембріонів у тварин-донорів.

План:

1. Синхронізація статевої охоти донорів та реципієнтів.
2. Осіменіння та запліднення тварин-донорів.
3. Видобування ембріонів.
4. Пошук та оцінка ембріонів.

1. Синхронізація статевої охоти донорів та реципієнтів.

Успіх трансплантації та приживлення ембріонів залежить від синхронності статевого циклу донора і реципієнта, а при використанні заморожено-відтаяних ембріонів їх стадії розвитку та дня статевого циклу реципієнта.

Для синхронізації статевої охоти найбільш широко застосовуються синтетичні аналоги простагландину $F_{2\alpha}$ – простин (США), клопстенол, еструмат (Англія), естрофан, ремофан (Чехія), ензапрост (Угорщина), естуфалан, клатрапростин (Росія), овоген (Україна) та інші. Встановлено, що ПГ $F_{2\alpha}$ є єдиним синтезуємим в матці лютеолітичним фактором, який викликає морфологічну і функціональну регресію жовтого тіла і впливає таким чином на термін статевого циклу. При фронтальному введенні ПГ $F_{2\alpha}$ без врахування дня статевого циклу приходять в охоту через 48-96 годин лише 55-65% телиць парувального віку. Це пов'язано з стадією розвитку жовтого тіла, в період якого простагландин не проявляє лютеолітичної дії. Для подолання цього використовують дворазове введення препарату з інтервалом в 10-12 днів між ін'єкціями, що

викликає статеву охоту у 90% телиць-реципієнтів, решта телиць не приходить в охоту, бо не мають на яєчниках функціонуючих жовтих тіл взагалі.

Синхронність охоти у донорів і реципієнтів повинна бути такою, щоб забезпечити максимум реципієнтів в охоті на протязі доби. При дворазовій обробці реципієнтів охота спостерігається у 85% телиць через 48-56 годин, у 5% через 72 години, інші приходять в охоту пізніше, або взагалі не приходять. Синтетичний аналог простагландину $F_{2\alpha}$ вводять коровам-реципієнтам разом з введенням його коровам-донорам, а телицям-реципієнтам на 12-18 годин раніше, ніж коровам-донорам.

На протязі 1995 – 2001 років нами вивчалась синхронізація статевої охоти в телиць парувального віку – 16-18 місяців. Попередньо проводили ректальні дослідження, по наслідкам якого бракували 10-15% телиць з різними гінекологічними відхиленнями, а також тих, що мали дозріваючі фолікули на яєчниках. Для синхронізації статевої охоти відбирали тільки телиць, які мали на яєчнику функціонуюче жовте тіло, розміром не менше 1-1,5 см. Під час ректального дослідження проводили масаж матки, яєчників та компресію маткових артерій.

Найкращі результати одержані при синхронізації статевої охоти телиць-реципієнтів після ректального дослідження одноразовим введенням синтетичних аналогів простагландину $F_{2\alpha}$ - 500 мкг естрофану або 750 мкг клатрапростину в комплексі з 10% суспензією АСД-Ф2 (асептичний стимулятор Дорогова 2 фракція) на тетравіті (7-10 мл внутрішньом'язево). На протязі 56 годин після введення препаратів проявили статеву охоту 95-98% телиць-реципієнтів.

2. Осіменіння та запліднення тварин-донорів.

Питання осіменіння донорів потребує ретельного підходу і досконалого вивчення. Часто без яких-небудь причин при вимиванні ембріонів одержують незапліднені яйцеклітини. При цьому слід враховувати, що овуляція при великій кількості розвинутих фолікулів, як правило, не відбувається синхронно і часто затягується до 36-56 годин, тому рекомендують збільшувати кратність осіменіння корів-донорів. Тобто осіменяти необхідно на протязі всієї охоти, через 12 годин, щоб в одноразовій дозі сперми було 50-70 млн активних сперміїв.

Найкращі наслідки осіменіння корів-донорів одержуються при застосуванні ректо-цервікального способу осіменіння. У корів-донорів, оброблених препаратами гонадотропину, охота сильно виражена, яскрава. Майже в усіх них відкрита шийка матки і сперму вдається ввести значно глибше в канал шийки матки. Але слід враховувати, що оброблені корови донори мають підвищену чутливість статевих органів до ректальної пальпації і інфекції, тому осіменяти необхідно дуже обережно. Необережні маніпуляції можуть викликати зміщення бахромки яйцепроводу і тоді не всі яйцеклітини попадають в яйцепровід. Крім того, необережна пальпація яєчників може викликати передчасні розриви передовуляційних фолікулів і вихід незрілих яйцеклітин.

Введені в цервікальний канал спермії, перестальтичними скороченнями матки засмоктуються і поступово проштовхуються в сторону яйцепроводу, цьому також сприяє наявність в спермі простагландину. В матці відбувається капацітація сперміїв і відбір найбільш життєздатних, тому кількість їх зменшується і лише невелика частка досягає яйцепроводу. Спермії просуваються в яйцепроводах за рахунок його перестальтики, миготливих рухів в'їчастої епітелію слизової оболонки, власних рухів та здатності до реотаксису.

Яйцеклітини після овуляції попадають на бахромку яйцепроводу і просуваються разом з течією рідини в яйцепроводі, рухаючись в напрямку матки. Життєздатність яйцеклітин в яйцепроводах зберігається протягом 10-12 годин, тому що вони виходять з фолікулів незрілими, в стані овоциту 2 порядку. Яйцеклітини складаються з ядра і протоплазми, оточені жовтковою та прозорою (блискучою) оболонкою. Ззовні яйцеклітина оточена фолікулярними клітинами променевого вінця.

В верхній третині яйцепроводу відбувається зустріч яйцеклітин з сперміями і починається процес запліднення. При заплідненні розрізняють стадії: проникнення сперміїв в яйцеклітину; активування яйця і створення блоку поліспермії; утворення двох пронуклеусів; заміна пронуклеусів хромосомними групами; об'єднання двох хромосомних груп (сінгамія); утворення зиготи.

Накопичені в області перешийки яйцепроводів спермії набувають здатності до просування в сторону яєчника тільки після овуляції фолікула, з надходженням фолікулярної рідини у яйцепроводи. Проникнути через шари фолікулярних клітин і прозору

оболонку можуть тільки капацітовані, високоактивні спермії, для цього їм необхідно від 2 до 6 годин перебування в статевих шляхах самки.

При проникненні спермія через прозору оболонку яйцеклітини, він втрачає акрозому і плазматичну мембрану і прикріплюється до жовткової оболонки. В яйцеклітині це викликає активізацію обмінних процесів і друге ділення ядра з виштовхуванням 2 полярного тілця. Головка і шийка спермія проникають в цитоплазму яйця, а відділений хвостик залишається в коложовтковому просторі. Головка спермія збільшується до розмірів ядра яйцеклітини, яке трансформується в жіночий пронуклеус, а головка в чоловічий. Чоловічий і жіночий пронуклеуси наближаються і, втративши оболонки, перетворюються в хромосомні набори, які об'єднуються в ядро нової клітини – зиготи, яка має диплоїдний набір хромосом.

Ядро зиготи поступово ділиться з інтервалом 24 години на два, чотири, вісім і далі бластомерів. Через 3-6 днів ембріон поступає в роги матки на стадії 8-16 бластомерів і далі розвивається в морулу, бластоцисту і еспандьований ембріон далі зародок і плід.

Запліднення яйцеклітини залежить від якості сперми, тому биків слід підбирати не тільки за генетичним потенціалом, а і за запліднюючою здатністю їх сперміїв.

3. Видобування ембріонів.

До середини 70-х років ембріони в корів видобували хірургічним методом з яйцепроводів або з рогів матки в залежності на якій стадії проводили операцію. При цьому застосовували наступні методи:

- видобування ембріонів через розріз верхнього склепіння піхви – трансвагінальний метод;
- часткової гістероектомії за допомогою кастраційних щипців в донорів, які вибраковуються і здаються на забій;
- з геніталій забитих тварин;
- шляхом лапаратомії по білій лінії, який частіше застосовувався на телицях;
- шляхом лапаратомії в області голодної ямки.

Але на сучасному етапі впровадження трансплантації ембріонів великої рогатої худоби хірургічні методи застосовуються більше з наукових цілей.

У виробництві вимивання ембріонів проводять нехірургічним способом. Головні переваги нехірургічного вимивання ембріонів полягають в відносній простоті виконання, без особливого ризику втрати репродуктивної здатності донорів і повторного їх використання. Цей метод не потребує спеціального операційного приміщення, що дозволяє успішно застосовувати його безпосередньо на тваринницьких фермах. Оволодіти технікою вимивання ембріонів не складно, але від майстерності залежить ефективність вимивання і успіх трансплантації в цілому.

Для вимивання ембріонів нехірургічним методом бажано мати манеж, станок для фіксації донора. В умовах молочних ферм для цих цілей можна використовувати приміщення пункту штучного осіменіння з додатковим дообладнанням стерильної кімнати або настільного боксу для роботи з ембріонами.

Інструменти для вимивання ембріонів існують різних конструкцій: жорсткі металеві, гнучкі пластикові або гумові. Найбільш широко в практиці трансплантації для вимивання ембріонів використовують двоканальні катетери з гуми або еластичної пластмаси. Катетер складається з трубки, кінець якої – робоча частина – має надувний балончик і 4-6 отворів, які забезпечують введення і виведення промивного середовища. Кінець трубки залитий гумою, пластмасою або має жорсткий наконечник з сквозним отвором для фіксації кінчика стилету.

Надувний балончик натягнутий на робочу трубку і зафіксований герметично з обох кінців, до нього підходить надувний канал, який має вихід назовні. Кінцева частина надувного каналу має розширений контрольний балончик. Зовнішній кінець катетеру має замковий вузол для фіксації стилету в катетері за допомогою різьбового з'єднання головки стилету з кінцевою частиною металевого перехідника, вставленого в трубку.

Приведення в робочий стан катетеру відбувається таким чином: в зовнішній конусоподібний кінець катетеру вставляється металевий перехідник. Після чого, через цей перехідник вводять металевий стилет, для надання катетеру жорсткості і фіксують його в кінчику робочої частини. Зовнішній кінець стилету півобертом фіксують в металевому перехіднику, вставленому в катетер.

Перед роботою складові частини катетеру стерилізують кип'ятінням в дистильованій воді протягом 30 хв. Гумові і пластикові катетери стерилізують холодним способом, заливаючи в стерильні

ємкості 70° спиртом за 1,5 – 2 години до початку роботи. Перед вимиванням внутрішній канал катетера промивають стерильним розчином Дюльбекко. Катетер в зібраному стані зовні обробляють селіконом або кероланом і поміщають в захисний поліетиленовий чохол.

Вимивання ембріонів проводять на 7–8 – й день від початку статевої охоти. Безпосередньо перед вимиванням корову-донора фіксують в станку, звільняють пряму кишку від калових мас. Зовнішні статеві органи та перинеальну область миють водою з милом, висушують серветкою, дезінфікують аерозолем “Септонекс” або 70° етанолом. Для зняття напруги прямої кишки проводять сактральну анестезію 2% розчином новокаїну в дозі 5 – 10 мл. Новокаїн вводять між останнім крижовим і першим хвостовим хребцями. Донорам можна вводити внутрішньом’язево міорелаксанти – рампуни 0,5 – 0,7 мл або комбілен 0,7 – 1,0 мл.

Катетер в чохлі вводять в піхву по верхньому склепінню до шийки матки, його розчохляють і вводять в цервікальний канал шийки матки. Обережними рухами натягують шийку на катетер і просувають його по каналу шийки до біфуркації, а потім в один з рогів матки. Коли катетер доходить до великої кривизни рогу матки, стилет поступово видаляють по мірі просування катетера до верхівки рогу. Коли катетер доходить до верхівки рогу в балончик при допомозі шприця накачують 10 – 20 мл повітря. Перевіривши розміщення катетера в розі матки і ступінь перекриття балончиком рогу з катетера виводять стилет. Після цього продувають катетер стерильним повітрям і контролюють його вихід назовні. До задньої частини катетера через трійник приєднують промивну систему: поліетиленові трубки, зажими, флакони з промивною рідиною і порожні флакони для збирання рідини з ембріонами.

Посуд для збору рідини з ембріонами розміщують в термоізолюючий матеріал, а флакон з промивною рідиною закріплюють вище висоти донора – 190 – 200 см. Промивну рідину вводять в верхівку рога за допомогою шприця ємкістю 60 і більше мл, або самопливом і перекривають зажимом трубку. Рукою, введеною в пряму кишку, легко масажують верхівку рогу матки, потім знімають зажим і випускають рідину з ембріонами в порожній посуд. Наповнення рогу матки промивною рідиною та її відток контролюють ректально. Для більш повного видалення промивної рідини проводять обережно масаж і підняття верхівки рогу. Суворо

контролюють кількість введеної і зібраної промивної рідини. Через ріг пропускають порціями по 50–100 мл промивної рідини, загальної кількістю 200-500 мл на один ріг матки.

По закінченню вимивання з балончика катетера випускають повітря і, витягнувши катетер, ще раз ретельно промивають систему, щоб змити ембріони з стінок. Можна не виводити катетер назовні, а довести його до біфуркації і знову вставивши стилет, завести в другий ріг матки. аналогічно вимивають і другий ріг.

На етикетку ємкості з ембріонами наносять інформацію – правий чи лівий ріг, кількість жовтих тіл на яєчнику з цього боку, час закінчення вимивання, і ємкість залишають на відстоювання. Кількість жовтих тіл на яєчнику повинна дорівнювати кількості одержаних ембріонів.

Для санації в матку після вимивання вводять суміш антибіотиків – пеніцилін + стрептоміцин по 500 тис. І.О. в 20 мл 0,5% розчину новокаїну або йодосол. Донору також внутрішньом'язево вводять 500 мкг аналогу простагландину для швидкого розсмоктування жовтих тіл.

Але буває при хорошій реакції донора на гормональну обробку невдале вимивання ембріонів. Це трапляється тоді, коли в донора не вдається провести катетер через шийку матки, особливо в телиць-донорів. Деколи не виводиться стилет після введення в ріг матки катетера. Виймають катетер і підбирають новий стилет. Можлива закупорка отворів катетера цервікальним слизом, який не дає можливості витікати промивній рідині.

Прокол або розрив ендометрію, які можуть виникати при великому або швидкому наповненню балончика повітрям. В цьому випадку промивне середовище попадає під міометрій і відтік його стає важким. Тому повітря необхідно вводити поступово, нешвидко порціями до 10 – 15 – 20 см³ (мл).

Пошкодження слизової оболонки матки, які можуть виникати за інтенсивних маніпуляцій при промиванні рогу матки, стисканні рукою та використанні безманжетних катетерів. при цьому в промивній рідині з'являється кров. Слід враховувати, що при вимиванні катетер від скорочення м'язів матки поступово виштовхується з рогу в тіло матки. Тому постійно необхідно контролювати розміщення катетера в розі матки.

4. Пошук та оцінка ембріонів.

Вся робота по пошуку і оцінці ембріонів повинна проводитись в спеціальному стерильному боксі при температурі 25 – 26° С. В боксі проводять вологе прибирання, а за 1–2 години до роботи з ембріонами протирають 70% спиртом робочі поверхні приладів і включають бактерицидну лампу. Персонал повинний працювати в халатах, шапочках або косинках, користуватись стерильним посудом і інструментом. Руки перед роботою обробляють тампоном, зволженим 70% спиртом. По французькій технології передбачена вся робота з ембріонами під ламінарним потоком відфільтрованого повітря в спеціальних шафах.

При пошуку і оцінці ембріонів працюють в конкретній послідовності. Після вимивання ембріонів з статевих шляхів корів-донорів ємкості з промивною рідиною переносять в термостат при температурі 37° С, де відбувається відстоювання та осадження ембріонів. Після відстоювання верхню частину промивної рідини відсмоктують за допомогою сифону або шприця з довгою голкою, залишаючи 50–100 мл рідини. Залишок промивної рідини розливають в 2–3 чашки Петрі (з пластику), дно котрих для зручності пошуку розкреслено на квадрати 1x1 см. Під біноклярною лупою або стереоскопічним мікроскопом при 14–28-кратному збільшенні знаходять ембріони і за допомогою шприця з скляною прозорою голкою переносять в малі чашки Петрі в поживне середовище для короткотермінового зберігання і оцінки. Можна переносити знайдені ембріони в годинникові скельця в 1 мл поживного середовища, в лунки пластикових планшетів для серологічних досліджень.

Але процес пошуку ембріонів необхідно прискорювати, тому за Харківською технологією пропонується промивну рідину одразу збирати в одноразові конусоподібні поліетиленові ємкості, які підвішують на штатив на 20 хвилин для осідання (седиментації) ембріонів. По закінченню осідання нижню частину ембріоприймача перепаюють термозажимом і ножицями відрізають від приймальної ємкості.

За англійською технологією промивна рідина під час вимивання одразу проходить через ємкість з ситичком, діаметр отворів якого 90–100 мк, тому ембріони лишаються в ємкості, їх розмір коливається від 130 до 150 мк. Тому відпадає потреба відстоювати промивну рідину протягом 20 хвилин, а зразу починається пошук.

Якщо в промивній рідині багато слизу, то необхідно брати менше рідини, розбавляючи її поживним середовищем, а для пошуку ембріонів в слизу використовувати гістологічну голку.

Оцінку якості ембріонів проводять на інвертованому мікроскопі при 100-150-кратному збільшенні. При цьому виявляють незапліднені яйцеклітини, ембріони без ознак розвитку, з дегенерованими змінами оболонки або цитоплазми.

Головні методи визначення повноцінності і життєздатності ембріонів слідуючі:

- візуально-морфологічна оцінка якості ембріонів, прижиттєва оцінка ембріонів з використанням флуоресцентних барвників;
- оцінка життєздатності ембріонів методом культивування;
- цитологічна та цитогенетична оцінка ембріонів та інші.

При морфологічній оцінці ембріонів звертають увагу на відповідність між віком ембріону і стадією його розвитку, форму прозорої оболонки та її цілісність, рівномірність дроблення бластомерів та їх компактність, стан цитоплазми, прозорість перевітелінового простору. Біологічно повноцінні ембріони повинні мати чітку кулясту форму, світлу однорідну цитоплазму, непошкоджену прозору оболонку і однакового розміру бластомери з щільним міжклітинним комплексом (полігональні зв'язки).

Неповноцінними вважаються ембріони, які мають різного розміру бластомери з нечіткими клітинними мембранами та іншими ознаками дегенерації.

На 4-7 день свого розвитку ембріон досягає стадії морули, 7-8 день ранньої бластоцисти, на 8-9 - бластоцисти, 9-10 день – пізньої бластоцисти, 10-11 день – ембріон виходить з прозорої оболонки – вилупившийся або еспандьований ембріон.

Суперовуляція обумовлює неодночасне запліднення яйцеклітин, тому в промивній рідині можна спостерігати ембріони різного віку, про що свідчать дані таблиці 7.1.

В промивній рідині можуть спостерігатись незапліднені яйцеклітини в стані дегенерації, з зморщеною, нерівною формою цитоплазми, а також ембріони неправильної форми з порушеною цілістю оболонки, її розривами, розшаруванням, нерівномірним дробленням, порушення зв'язку між бластомерами та грануляцією цитоплазми.

Співвідношення віку ембріонів при вимиванні (%)

День вимивання	Стан вимитих ембріонів					
	Морули (Мо I)	Морули (Мо II)	Ранні бластоцисти (Бл I)	Бластоцисти (Бл)	Пізні бластоцисти (Бл II)	Еспандований ембріон
6 – й	25	67	8	-	-	-
7 – й	17	20	30	23	9	1
8 – й	4	10	21	24	36	5
9 – й			7	22	43	28

Відстаючі від нормального розвитку ембріони з ознаками асинхронності дроблення бластомерів, їх дегенерації – непридатні для трансплантації. Ембріони з невеликими морфологічними змінами вважаються умовно придатними. Але не завжди вдається точно визначити повноцінність 7-8 денних ембріонів, внаслідок їх багатоклітинності. Дегенерація ембріонів починається ще на стадії морули, під час просування їх по яйцепроводу, але морфологічно це проявляється на більш пізніх стадіях, коли вони опиняються в розі матки.

Тому дуже важливо вірно оцінити вимиті ембріони і є декілька систем оцінки їх. Так, Елсден (1978) поділяє ембріони на 4 класи – погані, середні, хороші, відмінні;

- Греве (1980) пропонував оцінювати ембріони на життєздатні, уповільнені (ретардовані), уродливі (дегенеровані) і не запліднені яйцеклітини;

- Райт (1981) класифікує ембріони на 3 класи – нормальні, ембріони з незначними відхиленнями і ембріони з збільшеною кількістю дегенерованих клітин;

- Сергєєв (1982) пропонує 5-бальну систему оцінки ембріонів за морфологічними ознаками.

Але 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.

Показники розвитку ембріонів

Стадія розвитку	Кількість бластомерів	Діаметр, мк	Форма	Стан структур	Перевітєліновий простір
Яйце-клітина	-	120-150	приплюснута	Однорідна клітинна маса	немає
Морула	8-16	130-150	сферична	Бластомери не зрощені, легко можна поррахувати	є
Пізня морула	більше 16	130-150	сферична	Бластомери зростаються в компактну масу, не можна підрахувати	є
Рання бластоциста	80-120	130-150	сферична	Не видно границь між бластомерами, ембріон трохи стислий, відокремлюється трофобласт, ембріобласт і невелика полость	малий
Бластоциста	300-480	140-200	сферична	Чітко виділяється ембріональний диск і трофобласт, полость бластоцисти розширена.	малий
Пізня бластоциста	1200-1500	200-400	сферична	Прозора оболонка тонка, розтягнута полость бластоцисти і займає всю прозору оболонку	немає
Еспандуваний ембріон	більше 1500	200-800	сферична або злегка видовжена	Ембріон не має прозорої оболонки, оточений одним шаром клітин трофобласту	немає

ЛЕКЦІЯ 8

Оцінка, культивування та зберігання ембріонів.

План:

1. Прижиттєва оцінка ембріонів з використанням барвників.
2. Оцінка життєздатності ембріонів методом культивування.
3. Кріоконсервація ембріонів.
4. Мікрохірургічне ділення ембріонів.
5. Пересадка ембріонів реципієнтам.

1. Прижиттєва оцінка ембріонів з використанням барвників.

Цей метод засновується на різниці ступеня проникнення барвників через прозору оболонку живих або загинувших ембріонів. Для фарбування використовують: акридиноранж (АО), флюоресцеїн диацетат (ФДА), 4,6-діаміно-2-фенілліндол (ДАПІ), 2,7-діаміно-10-етил-9-фенілфенантрідіум бромід (ЕБ), 1-аніліно-8-сульфонат (1,8-АНС).

Прижиттєву оцінку ембріонів проводять таким чином: його розміщують на предметному склі, додають відповідний барвник, проводять інкубацію і досліджують під люмінесцентним мікроскопом.

АО. Використовують барвник в концентрації 1 : 40000 на розчині Локка. Ембріон інкубують в темряві 10 хвилин, після чого барвник відмивають розчином Локка і в краплі цього розчину ембріон накривають покривним скельцем і проводять оцінку під люмінісцентним мікроскопом. Живі ембріони дають червонувате свічення, ті, що загинули – зелене.

ФДА. Застосовують барвник в концентрації 1 : 60000 в розчині Дюльбекко. В якості розчинника ФДА використовують ацетон – 1 мг на 1 мл середовища Дюльбекко. Ембріони інкубують протягом 3 хвилин. Барвник флюоресцює при контакті з гідролазами, які активні тільки в живих клітинах. Загинувши, ембріони не флюоресцюють, а живі флюоресцюють повністю або частково зеленим кольором.

ДАПІ. Це дуже чутливий реагент на ДНК. Для забарвлення ембріонів 0,1 мг ДАПІ розчиняють в 1 мл фізіологічного розчину і далі розбавляють розчином Дюльбекко для одержання концентрації 1 : 100000. Інкубація проходить за 10 хвилин при температурі 22° С.

ембріони оцінюють в відбитому світлі люмінесцентного мікроскопу. Ембріони, в яких ядра проявляють жовту флюоресценцію – нежиттєздатні, в живих ембріонів ядра не забарвлюються, тому вони не флюоресцюють.

Таблиця 8.1

Шкала оцінки якості ембріонів

Стадія розвитку	Морфологічна характеристика	Оцінка	Бал	Позначення
Мору-ларання MoI пізня MoII	*округла форма, ціла прозора оболонка, перевітеліновий простір прозорий, бластомери чіткі, однакового розміру з наявністю полігональних зв'язків, зерниста цитоплазма рівномірна заповнює оболонку	Відмінні	5	++
	*наявність в перевітеліновому просторі гранул і включень, бластомери не однакового розміру, розташовані асиметрично, стиснуті	Добрі	4	+
	*в перевітеліновому просторі гранули і включення, незначне стиснення бластомерів, одиничні зруйновані клітини	Задовільні	3	+ -
	*деформація прозорої оболонки, часткове руйнування бластомерів, їх стиснення, втрата зв'язку між ними, фрагментація цитоплазми.	Умовно придатні	2	+ - -
	*невідповідність стадії розвитку віку ембріону, дефекти прозорої оболонки, розпад бластомерів, сильне їх стиснення	Непридатні	1	- - -
Бластоциста рання БлI пізня БлII	*куляста форма, прозора оболонка має однакову товщину на всьому відстані, перевітеліновий простір вузький, прозорий, чітка диференціація клітин трофобласту і ембріобласту, добре розпізнається бластоціль	Відмінні	5	++
	*зона пелюцида потоншена, полость бластоцисти велика, займає весь перевітеліновий простір, має гладку поверхню, чітку диференціацію клітин, бластоціль не виражена в перевітеліновому просторі гранули, включення, клітини трофобласту стиснуті мало	Добрі	4	+
	*перевітеліновий простір збільшений, включення, гранули, бластополость не чітка, немає диференціації між клітинами трофобласту і ембріобласту	Задовільні	3	+ -
	*дефекти прозорої оболонки, наявність гранул, клітинних часток в перевітеліновому просторі, часткове руйнування клітин, стиснення бластомерів	Умовно придатні	2	+ - -
	*значні дефекти прозорої оболонки, розпад бластомерів, рихле їх з'єднання	Непридатні	1	- - -

ЕБ і АНС. Для фарбування ЕБ і АНС готують два розчини: перший – 3 мг барвника розчиняють в 3 мл дистильованої води, другий – 0,1 мл вносять в 9,9 мл сольового розчину Хенкса або Дюльбекко. Ембріони занурюють в дві краплі другого розчину, додають одну краплю першого і фарбують протягом однієї хвилини. Оцінюють життєздатність ембріонів при люмінісцентному світлі не більше 10 секунд. В нежиттєздатних ембріонів кліткова мембрана проникна для барвників. Барвник ЕБ зв'язується в клітині з нуклеїновими кислотами і люмінісцює червоно-малиновим світлом. АНС з'єднується в клітині з білками і дає блакитну люмінісценцію. Живі ембріони не фарбуються і не дають люмінісцентного свічення.

2. Оцінка життєздатності ембріонів методом культивування.

Біологічно повноцінні ембріони при забезпеченні оптимальних умов культивування продовжують свій розвиток. В якості поживного середовища для культивування ембріонів використовують середовища: ТС – 199, Хем Ф – 10, Ігла, сольовий розчин Дюльбекко, Брінстера з різними біологічними і синтетичними добавками. Осмотичний тиск поживних середовищ чи розчинів для культивування ембріонів повинний бути 300 міліосмолей, рН – 7,2-7,4. Культивування ембріонів можна проводити в краплях поживного середовища в годинникових скельцях під шаром вазелінового масла.

В стерильні годинникові скельця переносять піпеткою 25 крапель стерильного вазелінового масла, після цього шприцем і 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° С. Протягом 10 – 20 хвилин через ексікатор пропускають газову суміш, яка має 90 % азоту, 5 % вуглекислого газу і 5 % кисню.

Після цього з годинникових скелець, що знаходяться в ексікаторі, шприцем 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° 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

ексикатор 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 закисненні - оранжевим.

Більш простий метод культивування в пробірках та пайєтах. Для культивування в пробірках ембріони піпеткою переносять в пробірку з 1 мл поживного середовища і після додавання трьох крапель стерильного вазелінового масла, закривають алюмінієвою фольгою і переносять в термостат при температурі 37° С для інкубації. В паєту ембріон заправляють в такій послідовності:

- 20 % розчин фетальної сироватки в розчині Дюльбекко (30 – 45 мм),
- повітряний пухірець (5 – 10 мм),
- 20 % розчин фетальної сироватки в розчині Дюльбекко з ембріоном (20 – 30 мм),
- повітряний пухірець (5 – 10 мм),
- 20 % розчин фетальної сироватки в розчині Дюльбекко (30 – 45 мм).

Паєти з ембріонами закривають пробками і кладуть в поліетиленові трубки, які герметично запаюють і переносять в термостат для інкубації.

Також можна зберігати ембріони при пониженні температури. Охолодження ембріонів нижче температури тіла, але не нижче 0°С, дозволяє знизити в них метаболізм, уповільнити розвиток, що подовжує термін зберігання. Використовують охолодження до 0°С, але оптимальна температура 8 – 10°С. Термін зберігання 3 – 4 доби. Через 5 діб життєздатність ембріонів різко знижується, але зовнішньо дегенерації не спостерігається, такі ембріони не приживаються після пересадки. Встановлено, що пізні морули краще переносять охолодження, ніж ранні, а виживання бластоцист при 0°С складає 92% і не відрізняється від свіжих при зберіганні 2 доби при 4°С.

Використовують також культивацію ембріонів в репродуктивних шляхах проміжного реципієнта (*in vivo*) для транспортування і після реконструкції ембріона. Проміжним реципієнтом може бути вівця або лабораторна тварина (кролі, миші), тому що преімплантаційний ембріон толерантний до чужерідного середовища гетерогенного реципієнта. Кращим місцем репродуктивного тракту проміжного реципієнта для культивування

ембріона є яйцепровід. Зберігати ембріони в яйцепроводах реципієнта 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 таким чином, щоб великі судини не попали під лігатуру, тому що перев'яз яйцепроводу разом з судинами веде до загибелі ембріонів. В кожний яйцепровід можна пересадити звичайним способом до 25 ембріонів в невеликій кількості поживного середовища.

3. Кріоконсервація ембріонів.

Метод кріоконсервації ембріонів використовується в практиці та наукових дослідженнях для збереження цінних в племінному відношенні тварин і використання в програмах розведення, збереження генофонду зникаючих тварин, перевезення ембріонів на великі відстані, створення банків ембріонів і гамет з необмеженим терміном зберігання. При заморожуванні ембріонів немає потреби штучної синхронізації статевої охоти донора і реципієнта, це полегшує працю при підготовці пересадок. Метод заморожування ембріонів використовується для фундаментальних досліджень взаємодії матері і плода і накопичення ембріонального матеріалу для різних наукових досліджень.

Краща стадія для заморожування ембріонів є бластоциста 60-150 бластомерів т.п. віком 7-8 днів. Для заморожування використовують тільки свіжоодержані ембріони тому що зберігання негативно впливає на їх життєздатність при холодкових обробках. Максимальне скорочення часу підготовки ембріонів до заморожування - одне з найголовніших вимог успішного заморожування.

Заморожування і відтаювання ембріонів супроводжується кристалізацією води в бластомерах і концентруванням розчинних речовин в рідкій фазі, що приводить до загибелі ембріона. Ці два процеси відбуваються одночасно, хоча кристалізація більш помітна при швидкому заморожуванні, тоді як осмотичні зміни - при уповільненому. Під час заморожування спочатку знижується температура в навколклітинному середовищі, тут поступово

збільшується кількість льоду і збільшується концентрація солей в останній частині розчину. Виникає різниця осмотичного тиску між позаклітинною і внутрішньоклітинною фазами, яка зрівноважується осмотичною реакцією ембріона шляхом віддачі води в навколклітинне середовище. Щоб запобігти кристалізації води в склад середовища вводять кріопротектори гліцерин або диметилсульфоксид (ДМСО), а щоб запобігти осмотичному впливу штучно стимулюють кристалізацію (сидінг). Введення в склад середовища кріопротектора та його видалення також створює можливість пошкодження ембріона. Тому технології заморожування передбачають поступове введення ембріонів в 0,25; 0,5; 1,0; 1,5 М розчині кріопротектору і витримку в кожному розчині 5 - 10 хвилин, а в останньому 15 - 20 хвилин. При відтаюванні ембріонів їх поступово переносять в розчин з зменшенням вмісту кріопротектору.

Розчини кріопротекторів готують на фосфатносолевому буфері Дюльбекко (ФСБ), використовують хімічно чистий диметилсульфоксид - $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$ 78,136 спочатку готується 3М розчин - 15,74 мл ФСБ і 4,26 мл ДМСО. Рідкий ДМСО має питому вагу $1,1 \text{ г/см}^3$, то 4,26 мл буде важити 4,68 г, що відповідає 3М концентрації речовин, розчиненої в 20 мл розчину. Далі з 3М розчину ДМСО готують необхідні його концентрації: 1,5 М розчин ДМСО - потрібно взяти 5 мл 3М ДМСО і 5 мл ФСБ: 1,0 М - 4 мл 1,5 ДМСО і 2 мл ФСБ: 0,5 М - 3мл 1,0М ДМСО і 3мл ФСБ: 0,25 М - 3М 0,5М ДМСО і 3мл ФСБ.

Хімічно чистий гліцерин має молекулярну вагу 92,09. Для заморожування використовують 10% розчин, що складає 1 М концентрацію в ФСБ. Щоб виготовити 10% розчин гліцерину беруть 4мл гліцерину і додають 33 мл ФСБ, для виготовлення розчинів 3,3% і 6,6% беруть відповідно 10 мл ФСБ і додають 5 мл 10% розчину гліцерину і 5 мл ФСБ та 10 мл 10% розчину гліцерину.

Існує два головних методи заморожування–розморожування ембріонів – повільне заморожування і повільне відтаювання, та швидке заморожування і відтаювання.

При повільному заморожуванні спочатку охолоджують ембріон від 20°C до 7°C з швидкістю 1°C за хвилину, викликають штучну кристалізацію і тоді охолоджують з швидкістю $0,3^\circ\text{C}$ за хвилину до -36°C , а далі з швидкістю $0,1^\circ\text{C}$ за хвилину до -60°C і переносять в рідкий азот, температура -196°C . Відтаюють ембріон в спиртовій бані з температурою -50°C з швидкістю 4°C за хвилину до -10°C , після

чого переносять на 5 хв. в водяну баню з температурою +20°C. Після переносять ембріон в середовище для видалення кріопротектору.

При швидкому заморожуванні охолоджують ембріон від 20°C до -7°C з швидкістю 1°C за хвилину, викликають штучну кристалізацію і охолоджують далі з швидкістю 0,3°C за хвилину тільки до -30°C, після чого переносять ембріон в рідкий азот. Відтаюють ембріон в водяній бані з температурою 37°C на протязі 30сек. з швидкістю 3,0°C за хвилину.

4. Мікрохірургічне ділення ембріонів.

Ефективність трансплантації ембріонів значно зростає при використанні методів мікрохірургічного ділення зародків. Ці методи дозволяють в 1,4 – 1,6 разів збільшити вихід телят від високоцінних батьків, одержати монозиготних близнюків, генетичних хімер, а також клонування ембріонів.

В початковій стадії дроблення бластомери тотипотентні, т.п. кожний бластомер може розвиватись в окремий зародок. Для мікрохірургії відбирають ембріони тільки відмінної якості, класифіковані як пізні морули або ранні бластоцисти.

Для роботи по діленню ембріонів необхідні спеціальні мікроінструменти, прилади та пристрої. Мікроголки та деякі види мікроножів виготовляють з скляних товстостінних або суцільних заготівок. Різні види мікропіпеток виготовляють з тонкостінних капілярів. Виготовлення мікроінструментів проводять за допомогою мікрокузень.

Основні мікроінструменти для маніпуляцій з ембріонами – це фіксуєчі мікропіпетки, мікропіпетки для переносу половинок та четвертинок зародку, ін'єкційні піпетки, скляні мікроголки, металеві та скляні мікроножі. При діленні ембріону в вертикальному напрямку використовують мікроголку або металевий ніж, при горизонтальному напрямку скляний або металевий трикутної форми. Металеві ножі можна довго використовувати, але скляні більш гострі, прозорі і не кидають тінь на ембріон під час маніпуляцій з ним.

Під час ділення ембріона часто відбувається пошкодження деяких бластомерів, що обумовлено безпосереднім пошкодженням мікроножем або мікроголкою, а також з'єднання бластомерів між собою і прилипання їх мембран до інструментів. Встановлено, що чим більша величина перевітелінового простору, тим менше пошкоджується бластомерів. Кількість пошкоджених бластомерів

знижується, якщо при діленні ембріона використовують силіконізовані мікроголки і мікроножі.

При діленні ембріон не розрізають, а розділяють, роз'єднують бластомери для чого мікрохірургічні інструменти вводять в зародок повільно з перервами по часу на 8 – 20 сек, дозволяючи клітинам по можливості відхилитись від ділячого інструмента.

Ділення ембріонів краще проводити в охолодженому розчині Дюльбекко, тому що при температурі середовища вище 20°C клітинні мембрани стають більш липкими, це збільшує прилипання половинок і четвертинок ембріона до мікропіпетки, мікроножа.

Мікрохірургічні роботи проводять в стерильних боксах в камері або чашці Петрі в ФСБ з 20% фетальною сироваткою під вазеліновим маслом. Використовують при роботі пневмоманіпулятори під контролем мікроскопа з збільшенням 80 – 100 кратністю.

В практиці застосовують наступні основні 3 методи ділення ембріонів корів-донорів:

1. Ембріон присмоктують до фіксуючої мікропіпетки. З протилежного боку мікроножем або мікроголкою надрізають прозору оболонку і вводять в розріз мікропіпетку для маніпуляцій. Шляхом ін'єкції невеликого об'єму розчину виштовхують зародок з оболонки. На дні камери мікроножем або голкою ембріон ділять по вертикалі на дві рівні частини.
2. Ембріон фіксують мікропіпеткою. З протилежної сторони горизонтальним рухом мікроножа розрізають частину прозорої оболонки і ділять ембріон на дві групи клітин. Після цього в розріз вводять мікропіпетку для маніпуляцій, присмоктують і видаляють одну половинку.
3. Нефіксовану морулу або бластоцисту ділять по вертикалі на дні камери або у чашці Петрі разом з прозорою оболонкою на дві половинки.

Для розділення пізньої морули на 4 частини зародок спочатку ділять на дві половинки, після чого кожний напівембріон поза прозорою оболонкою ділять по вертикалі на дві частини. При проведенні маніпуляцій кут нахилу мікропіпеток і мікроголок відносно основи камери повинен бути 6 – 12°. Процес вертикального ділення зародка з прозорою оболонкою і без неї здійснюють шляхом повільного, з паузами по часу опускання мікроголки або мікроножа. При цьому не слід допускати рух ділячого інструмента вперед–назад, тому що це призводить до скручення половинок і пошкодження

бластомерів. При діленні ембріона мікроголкою її краще розміщати так, щоб ділення проходило в тонкому участку, а кінчик голки повинен виступати за ембріон.

Ділення бластоцист здійснюють таким чином, щоб внутрішня кліткова маса та трофобласт були розділені рівно між кожною половиною ембріону.

Прозора оболонка не є необхідною умовою подальшого розвитку половинок ембріонів на стадії пізньої морули та бластоцисти. Але напівембріони, розміщені в оболонку, краще ідентифікуються під мікроскопом, менше прилипають до стінок піпетки і менше травмуються при пересадці реципієнтам. Прозора оболонка важлива при пересадці та подальшому розвитку четвертинок ембріону. Вживаємість заморожено-відтаяних половинок 7-денних ембріонів значно підвищується, якщо ембріони розміщують в свою або чужу прозору оболонку.

Прозору оболонку одержують від дегенерованих зародків, не запліднених яйцеклітин або ооцитів, виділених з антральних фолікулів яєчників корів. Щоб одержати порожню оболонку – ембріон або яйцеклітину присмоктують до фіксуєчої мікропіпетки, а з протилежної сторони мікроножем або мікроголкою надрізають прозору оболонку і звільняють від вмісту. Далі присмоктують до мікропіпетки напівембріон та через розріз в прозорій оболонці вводять його в середину.

Після ділення частки ембріонів оцінюють під мікроскопом та морфологічно нормальні половинки та четвертинки зародків або пересаджують, або культивують в поживному середовищі від 30 хвилин до 24 годин для визначення здатності напівембріону до компактизації та розвитку поза організмом.

Половинки краще пересаджувати після недовгої культивації – 1-2 години при 37,5°C в розчині Дюльбекко з 20% фетальною сироваткою і антибіотиками. За цей час проходить компактування напівембріону і в залежності від ступеня компактизації рівномірні половинки класифікують: - відмінні – закруглені; - добрі – частково закруглені; - умовнопридатні – не закруглені. Культивування на протязі 16 – 20 годин призводить до утворення морфологічно нормальних розширюючихся бластоцист з полостью, клітинами трофобласту.

Трансплантація розділених ембріонів проводиться двом реципієнтам в роги матки або дві половинки пересаджують одному реципієнту в 1 ріг чи в два роги.

5. Пересадка ембріонів реципієнтам.

До середини 70-х років пересадку ембріонів проводили хірургічним методом, але тепер добре розроблені і впроваджені у виробництво нехірургічні методи пересадки ембріонів телицям-реципієнтам і коровам.

Хірургічний метод потребує операційної практики, спеціальних приміщень, відповідного обладнання і інструментів. Цей метод дозволяє ввести ембріони глибоко в ріг матки, що не завжди можливо при нехірургічному методі. Але хірургічний метод належить до полостних операцій, тому необхідна сувора стерильність, тварині наносяться травми при резекції тому неможливо реципієнта використовувати багаторазово. Ефективність хірургічної пересадки ембріонів дорівнює 60-70%.

Перші досліди по не хірургічній пересадці ембріонів проведені на початку 60-х років. При цьому використовувались різні інструменти у вигляді трубок та катетерів.

На перший погляд пересадка ембріонів нагадує метод штучного введення сперми з ректальною фіксацією шийки матки. Але фактично пересадка значно складніша. Якщо під час осіменіння шийка матки відкрита, слизові оболонки геніталій гіперемовані і ослизнені, а цервікальний слиз володіє бактерицидними властивостями, то під час пересадки ембріонів шийка закрита, полость матки стерильна, слизові оболонки дуже чутливі, легкоранимі і бактерицидні властивості маткового секрету знижені. Все це необхідно враховувати при роботі, звертаючи особливу увагу на асептику та майстерність техніки.

Необхідно також пам'ятати, що резистентність матки в лютеальну фазу знижується і чутливість ендометрія до інфекції підвищується. Тому бактеріальна інфекція, яка може проникати в матку при пересадці, значно понижує приживленість ембріонів. При пересадці можливе травмування ендометрію інструментами. Виникаючі при цьому крововиливи негативно впливають на ембріони, тому що кров являється ембріотоксичною рідиною.

Підготовку реципієнта проводять таким чином: їх фіксують в станку або на місті в стійлі, миють теплою водою з милом зовнішні статеві органи, витирають серветкою і дезінфікують. Після цього

роблять сакральну анестезію 2% розчином новокаїну 5-7 мл, а сильнозбудливим реципієнтам вводять внутрішньом'язево міорелаксанти комбелен 0,5 або ханегіф 10 мл, рампун.

Розроблено багато пристроїв та катеторів для нехірургічної пересадки ембріонів. Найбільш широке застосування знайшли катетери, які складаються з металевого тіла – трубки і поршня, за допомогою якого ембріон витискають з пайєти, а також захисних кожухів та чохла – французька фірма ІМВ, німецька мінітюб та ін. Перед початком роботи інструменти стерилізують кип'ятінням, висушують і зберігають в настільному боксі під бактерицидною лампою, яку вмикають перед початком роботи. Перед введенням катетера в статеві шляхи його дезінфікують і покривають силіконом. Пасту, в якій знаходиться ембріон, вставляють в наконечник катетера і приєднують до нього поршень, легко натискаючи на поршень, перевіряють, чи виходить крапля середовища з паєти. Назвні катетера надягають санітарний чохол і вводять катетер по верхньому склепінню піхви до шийки матки. Проривають санітарний чохол.

Далі вводять руку в пряму кишку, прощупують матку, визначають, в якому яєчнику знаходиться жовте тіло і під ректальним контролем направляють катетер в шийку матки. Якщо катетер ввели в отвір шийки матки, то обережно натягуємо її на катетер і проштовхуємо його в іпсілатеральний жовтому тілу ріг матки. Обережними рухами вводять катетер якомога ближче до верхівки рогу матки, постійно контролюючи місце знаходження кінця катетера. Якщо катетер правильно введений, його повертають міткою до слизової оболонки і дають команді помічнику натискати на поршень, щоби ембріон з середовищем ввести в матку.

Не рекомендується на протязі двох місяців після пересадки перегру-повувати, вакцинувати та піддавати іншим стресовим факторам реципієнтів. Годівля реципієнтів повинна бути повноцінною, тому що низький рівень, незбалансованість раціону викликає порушення обміну речовин, репродуктивної функції і знижує приживлення ембріонів.

Через 60–90 днів після пересадки ембріонів реципієнтів досліджують на тільність.

ЛЕКЦІЯ 9

Клонування ембріонів тварин.

План:

1. Історія клонування.
2. Види клонування.
3. Методи одержання монозиготних близнюків.
4. Створення химерних тварин.

1. Історія клонування.

Бурхливий розвиток біологічної науки за останні десятиріччя привів до створення декількох сучасних напрямів експериментальної біології, що поставили для вивчення принципово нові питання живої матерії, які вже найближчим часом можуть суттєво змінити деякі технології виробництва сільськогосподарської продукції, медичних і фармацевтичних препаратів. Одним з таких напрямів, що спирається на новітні досягнення ембріології, цитології, біологічного приладобудування та біотехнологічної промисловості, є клонування ссавців. Суть клонування полягає у принципово новому методі відтворення тварин, коли ембріон утворюється не шляхом запліднення жіночої статевої клітини чоловічою, а в результаті пересадки ядра з диплоїдним набором хромосом у яйцеклітину, з якої вилучено власний генетичний матеріал.

Отриманий таким чином зародок може дати початок розвитку новому організму, коли його буде трансплантовано до відповідно підготовленого реципієнта. Такий спосіб утворення організмів принципово відрізняється від усіх існуючих у природі, оскільки формування генотипу тварин відбувається не шляхом спонтанного комбінування генів гаплоїдних жіночої і чоловічої статевих клітин під час запліднення, а шляхом активізації вже сформованого набору хромосом диплоїдної клітини. Це дозволяє створювати великі групи (клони) генетично ідентичних особин, коли донором генетичного матеріалу є популяція ембріональних клітин з одного зародка, або навіть одержувати генетичні копії існуючих тварин, коли донорами ядер є соматичні клітини дорослого організму.

Є дві великі сфери застосування клонування в житті сучасного суспільства: наукова – вивчення фундаментальних принципів функціонування живої матерії, і виробнича – копіювання і

тиражування ссавців з унікальними властивостями. Щодо першої, то метод реконструювання ембріона шляхом пересадки ядер є могутнім методичним засобом вивчення таких базових властивостей тваринного світу на клітинному і субклітинному рівні, як роль позаядерної спадковості в формуванні фенотипових ознак, взаємодія

ядра і цитоплазми, диференціація генома протягом онтогенезу, в тому числі терміни та механізми активізації або інактивізації окремих генів та їх комбінацій, можливість втручатися в процес диференціації й інші. Вирішення багатьох актуальних біологічних проблем, таких як вплив різноманітних факторів зовнішнього середовища на організм тварини, реалізація генотипу в залежності від умов навколишнього середовища та ін. буде набагато ефективнішим при використанні клонів тварин.

Щодо другої сфери – застосування клонування у виробничих процесах, то перелік галузей, де цей метод може бути використано, обумовлюється кінцевим продуктом даної біотехнології, а саме нащадками, що є точними генетичними копіями донорського матеріалу, або великою кількістю генетично ідентичних особин. Як метод генетичного копіювання, клонування буде незамінним для відтворення існуючих у природі або створених людиною тварин з унікальними властивостями. Найяскравішим прикладом останнього може стати клонування трансгенних тварин. Як відомо, вартість штучної генної трансформації організму ссавця з метою надання йому принципово нових ознак нині висока, а ефективність такої процедури ще вкрай незадовільна. До того ж, ймовірність отримання ссавця, організм якого продукував би необхідний людині продукт, також залишається поки що дуже низькою. Тому, кожна тварина, виведена методами генної інженерії і здатна бути біореактором певних препаратів медичного чи фармацевтичного призначення, стане вкрай цінною. Щоб напрацювати необхідну для суспільства кількість такого препарату (інсуліну, інтерферону й ін.), потрібно або створювати певну кількість таких трансгенних особин, або відтворити (тобто скопіювати) вже створений один організм. Таким чином, саме комбінування трансгенезу і клонування дозволить розробити новітню, екологічно абсолютно чисту біотехнологію виробництва біологічно активних речовин (ліків, стимуляторів й ін.), якість яких буде максимально наближена до продуктів, що виробляє організм самої людини, і значно перевищує речовини, що синтезують рекомбінантні мікроорганізми. Така біотехнологія зробить справжню

революцію в фармацевтиці та медицині наступного століття.

Всі клітини організму тварин несуть однакову генетичну інформацію. Однак у процесі морфогенезу соматичні клітини диференціюються, внаслідок чого частина генома репресується. Чим вищий рівень спеціалізації клітин, тим менша їх тотипотентність. Ця закономірність була встановлена в експериментах з пересадження ядер.

Уперше трансплантацію ядер соматичних клітин зародків до енуклеїованих клітин жаби здійснили американські дослідники Р. Бриггс і Т. Кінг у 1952 році. Учені, користуючись мікропіпеткою, видаляли ядра з яйцеклітин шпорцевої жаби, а замість них пересажували ядра клітин ембріонів, що перебувають на різних стадіях розвитку. Проведені дослідження показали, що ядра ранніх ембріонів у стадії пізньої бластули й навіть ранньої гастрული володіють тотипотентністю й забезпечують нормальний розвиток ембріонів. Якщо брати ядра із клітин зародка на ранній стадії його розвитку - бластули, то майже у 80% випадків зародок нормально розвивається далі і перетворюється на справжнього пуголовка. Якщо ж розвиток зародка, донора ядра, переходить на наступну стадію – гастрული, то лише менш ніж у 20% випадків оперовані яйцеклітини розвивалися нормально. При пересадженні ядер з більш диференційованих клітин (мезодерми й середньої кишки) пізньої гастрული в ембріонів спостерігалось недорозвинення і навіть відсутність нервової системи. Після пересадження ядра із клітин більш пізнього розвитку яйцеклітини взагалі не розвивалися.

Більш ґрунтовні дослідження, що охоплюють не тільки амфібій, а й риб, а також дрозоділ, у 1962 р. були розпочато англійським біологом Дж. Гордоном. Він першим у дослідах з південноафриканськими жабами (*Xenopus laevis*) як донора ядер використав не зародкові клітини, а клітини епітелію кишечника плаваючого пуголовка, що вже цілком спеціалізувалися. Ядра яйцеклітин реципієнтів він не видаляв хірургічним шляхом, а руйнував ультрафіолетовими променями. Здебільшого реконструйовані яйцеклітини не розвивалися, але приблизно десята частина з них утворювала ембріони. 6,5% із цих ембріонів досягали стадії бластули, 2,5% - стадії пуголовка а тільки 1% розвився в статевозрілих особин. Однак, поява декількох дорослих особин у таких умовах могла бути пов'язана з тим, що серед клітин епітелію кишечника пуголовка, що розвивається, досить тривалий час

присутні первинні статеві клітини, ядра яких могли бути використані для пересадження. У наступних роботах як сам автор, так і багато інших дослідників не змогли підтвердити дані цих перших дослідів.

У подальшому Дж. Гордон разом з Пещення (1970) почали культивувати *in vitro* клітини нирок, легень та шкіри дорослих тварин і використовувати вже ці клітини як донори ядер. Майже 25% первинно реконструйованих яйцеклітин розвивалися до стадії бластули. При серійних пересадженнях вони розвивалися до стадії плаваючого пуголовка. У такий спосіб було показано, що клітини трьох різних тканин дорослого хребетного (*X. laevis*) містять ядра, які можуть забезпечити розвиток принаймні до стадії пуголовка.

У свою чергу М. Дж. Берардіно і Н. Хофнер (1983) використовували для трансплантації ядра клітин крові, що не поділяються та цілком диференційовані – еритроцити жаби *Rana ripiens*. Після серійного пересадження таких ядер 10% реконструйованих яйцеклітин досягали стадії плаваючого пуголовка. Ці експерименти показали, що деякі ядра соматичних клітин здатні зберігати тотипотентність.

У 1985 р. була описана технологія клонування кісткових риб, що розроблена радянськими вченими Л.А. Слєпцовою, Н.В. Дабагян і К.Г. Газарян. Зародки на стадії бластули відокремлювали від жовтка. Ядра клітин зародків вприскували в цитоплазму незапліднених ікринок, які починали дробитися й розвивалися в личинки. Ці експерименти показали, що втрата ядром тотипотентності в процесі онтогенезу пов'язана не з втратою генів, а їхньою репресією. За культивування соматичних клітин *in vitro* частота тотипотентності ядер збільшується.

Пересадження ядер у ссавців почалися пізніше, у 80-х роках. Це було пов'язано з технічними труднощами, тому що зигота ссавців має невеликі розміри. Наприклад, діаметр зиготи миші приблизно 60 мкм, а діаметр заплідненої яйцеклітини жаби – 1200 мкм, тобто у 20 разів більше. Зигота корові трохи більша за зиготу миші, діаметр її становить 160 мкм, але пронуклеуси приховані яєчним жовтком, тому перед мікроманіпуляціями необхідна спеціальна обробка зигот.

Незважаючи на названі труднощі, перші повідомлення про одержання клонів мишей, ідентичних донору, з'явилися вже у 1981 році. Як донори були використані ембріональні клітини однієї з ліній мишей, узяті на стадії бластоцисти. Вірогідність отриманих даних спочатку була поставлена під сумнів тому, що відтворити результати

проведених експериментів у інших лабораторіях не вдавалося, однак через два роки Дж. Мак Грат і Д. Солтер також досягли успіху. Американські дослідники С. Стік і Дж. Робл, використовуючи методику Мак Грата й Д. Солтера, у 1988 р. отримали шість живих кролів, пересадивши ядра 8-клітинних ембріонів однієї породи в позбавлені ядра яйцеклітини кролів іншої породи. Фенотип народжених повністю відповідав фенотипу донора. У цих експериментах тільки 6 з 164 реконструйованих яйцеклітин (3,7%) розвилися в нормальних тварин.

Перші успішні експерименти з клонування сільсько-господарських тварин були проведені С. Уїлладсеном (*S. Willadseri*) у 1986 р. Він зливав без'ядерні яйцеклітини із бластомерами, виділеними з 8- і 16-клітинного ембріона вівці.

Дж. Робл і його співробітники у 1987 р. провели роботи з пересадження ядер великої рогатої худоби. Вони пересаджували до зигот каріопласти - чоловічий і жіночий пронуклеуси разом з цитоплазмою, що їх оточує, а також ядра 2-, 4- або 8-клітинних ембріонів корови. Реконструйовані зародки в цій роботі розвивалися тільки в тих випадках, коли до зигот пересаджували пронуклеуси: 17% таких зародків досягли стадії морули або бластоцисти. Два зародки були пересаджені іншому реципієнтові - у матку корови, і розвиток їх завершився народженням живих телят. Якщо як донорів використовували ядра 2-, 4- або 8-клітинних зародків, то реконструйовані яйцеклітини не розвивалися навіть до стадії морули.

Пізніше були й більш успішні роботи. Зокрема С. Уїлладсен (1989) повідомив, що йому вдалося отримати чотирьох генетично ідентичних бичків голштинської породи пересадженням до реципієнтних яйцеклітин ядер бластомерів одного 32-клітинного зародка.

К. Бондіолі й співавтори (1990), використовуючи як донорів ядер 16-64-клітинні зародки корів, трансплантували 463 реконструйованих зародки в матку синхронізованих реципієнтів, було отримано 92 живих теляти. Сім з них були генетично ідентичні, являючи собою клон, отриманий у результаті пересадження ядер клітин одного донорського ембріона.

Експериментів з клонування свиней небагато. Успішні дослідження провели Р. Пратер зі співробітниками в 1989 р. Незначна кількість даних пов'язана з певними труднощами роботи із цим об'єктом.

У 1993-1995 роках група дослідників під керівництвом Я. Уїлмута (*Ian Wilmut*) з Рослинського інституту отримала клон овець – 5 ідентичних тварин, донорами ядер яких була культура ембріональних клітин.

Я. Уїлмут зі співавторами опублікував на початку 1997 року повідомлення, що в результаті використання донорського ядра клітини молочної залози вівці було отримано клоновану тварину - вівцю за кличкою Доллі.

Аналогічні експерименти здійснювали пізніше Т. Домінко (*Tanja Dominko*) і співробітники лабораторії Вісконсинського університету, які забезпечили клонування ембріонів із клітин шкіри вух дорослої рогатої худоби. Ембріони, генетично ідентичні корові, що пожертвувала клітини вуха, були пересажені в матки корів-реципієнтів. Спостерігалася поступова загибель ембріонів, тому життєздатних телят не отримали. Причини поки що не встановлено.

У серпні 1997 року з'явилося повідомлення про те, що Алан Троунсон (Австралія) розробив технологію, яка дозволяє сформувати ембріон з 16, 32 або 64 клітин, а потім кожна з них може використовуватися для формування 16, 32 або 64 ідентичних ембріонів. Колектив дослідників на чолі з Аланом Троунсоном створив 470 генетично ідентичних ембріонів рогатої худоби від єдиної бластоцисти. Така технологія забезпечує безмежне джерело генетичного матеріалу для клонування.

2. Види клонування.

Залежно від типу клітин-донорів генетичного матеріалу можна умовно виділити декілька типів клонування. Якщо донорами ядер є ранні зародки, то ми маємо так зване *ембріональне клонування*. До ембріонального клонування можна віднести і таке, коли донорами ядер є ембріональні стовбурні клітини (ЕСК), але цей тип відрізняється від першого можливістю маніпулювати великою кількістю клітин, які, крім того, можна розмножувати шляхом культивування поза організмом.

Клонування ембріонів шляхом пересадження ядра має три основних етапи: отримання клітин-реципієнтів, виділення інтактного ядра донора, пересадження ядра в енукейовану яйцеклітину. На відміну від амфібій пересадження ядра в ссавців не стимулює ооцит. Тому потрібно четвертий етап – активація ооциту і злиття мембран яйця й ооциту. Під дією електричного імпульсу відбувається

активація ооциту і злиття мембран між ядром клітини донора і енуклеюваним ооцитом-реципієнтом. Технологія пересадження ядер клітини сприяла успішному одержанню клонованих живих кроликів, мишей, овець, кіз, великої рогатої худоби і свиней.

Отримання клітин-реципієнтів – це один із перших етапів цієї методики. Як клітин-реципієнтів використовують або зрілі ооцити на стадії метафази II, тобто яйцеклітини, або зиготи. На початку досліджень з клонування тварин клітинами-реципієнтами були одержані *in vivo* яйцеклітини, зиготи або двоклітинні ембріони. Нині при цьому використовують ооцити, що дозрівають в умовах *in vitro*.

Вибір клітин-реципієнтів є досить суттєвим моментом клонування, тож слід враховувати фізіологічні процеси, що відбуваються під час клітинного циклу. Внаслідок проведених експериментальних робіт та аналізу клітинного циклу встановлено, що для отримання клітин-реципієнтів ядер краще використовувати яйцеклітини, ніж зиготи. Для їх отримання потрібно менше часу, менше препаратів і реактивів. Крім того, через непрозорість цитоплазми зигот великої рогатої худоби виникає необхідність центрифугувати зародки, а це зменшує їх життєздатність. До того ж, виходячи з гіпотези про ремоделюючі/репрограмуючі фактори, цитоплазма яйцеклітин здатна репрограмувати дію ядра клітини-донора, а цитоплазма зиготи – ні.

Технологія отримання клітин-реципієнтів полягає в тому, що після розрізу скляною голкою прозорої оболонки дозрілих до метафази II незапліднених яйцеклітин у частині полярного тільця, ооцити приєднували до розчину *PBS*, що містить 5 мкг/мл цитохалазину В. Приблизно за годину з експозиції в середовищі з цитохалазином В полярне тільце з прилеглою ділянкою ооплазми видаляли всмоктуванням за допомогою піпетки для мікроманіпуляцій. Ефективним способом *елімінації* (вилучення) ядерних структур дозрілих *in vitro* ооцитів корів може стати також хімічна енуклеація.

Перші досліди з мікроманіпуляцій показали, що безпосереднє введення піпетки з пронуклеусом або ядром бластомера, що міститься в ній, в ооплазму зиготи або яйцеклітини ссавців викликає незворотні ушкодження плазматичної мембрани реконструйованої зиготи та її загибель через великі розміри ін'єкційної піпетки.

Для полегшення введення бластомерів у перивителиновий простір ооцитів жіночі гамети дозволяється попередньо поміщати до

гіпертонічного середовища. Пересадження ізольованих поодиноких бластомерів 8-, 16- і 32-клітинних ембріонів кроля в еноклейовані ооцити, поміщені за 2-3 хвилини перед мікрomanipуляціями в 0,5 М розчину сахарози в розчині *PBS*, і наступне електрозлиття привели до розвитку 22,18 і 15% реконструйованих яйцеклітин відповідно до стадії морули-бластоцисти.

Уведення ядра або пронуклеусу під прозору оболонку в перивителіновий простір, як правило, не призводить до злиття каріопласту з плазматичною мембраною яйцеклітини або зиготи без застосування спеціальних фузогенів – інактивованого вірусу Сендай, поліетиленгліколю (ПЕГ) або електричного струму. ПЕГ широко використовується за роботи з рослинними і соматичними клітинами, однак, у дослідженнях на ембріонах звичайно не застосовується через варіабельність активності, сильно вираженої токсичної дії на клітини, складність його видалення з плазматичної мембрани, що викликає лізис клітин і перешкоджає розвитку ембріонів. Більш вдалим у цьому відношенні є вірус Сендай. Але і він має ряд недоліків, що обмежують його застосування за роботи з ембріонами. До них відносяться ризик збереження вірулентності вірусних часток, варіабельність властивостей різних партій, низька, на відміну від його використання за злиття каріопластів яйцеклітин і бластомерів ранніх ембріонів, ефективність для клітин більш пізніх ембріонів. Крім того, бластомери ембріона отримані злиттям каріопласта з яйцеклітиною, вже не можуть бути використані як донори ядер, оскільки повторне застосування цього фузогена неможливе внаслідок втрати клітинних рецепторів, що відповідають за зв'язування з вірусом. Найбільш ефективним фузогеном для ембріонів ссавців є електричний струм. За його допомогою можливо здійснюючі серійні пересадження ядер, установлювати стабільні, але легко замінюємі залежно від бажання експериментатора параметри електричного впливу – силу струму, тривалість впливу і число імпульсів.

Частота злиття ізольованих бластомерів великої рогатої худоби з еноклейованими ооцитами корів залежить від стадії розвитку ембріона. Показник злиття був вірогідно вищим у тому разі, коли для пересадження ядер використовували 16- і 32-клітинні ембріони порівняно з ембріонами на стадії 2-х і 4-х клітин (28,9; 25,0; 4,6 і 9,7%, відповідно). Установлено, що на ефективність злиття клітинних систем і розвиток ембріонів великої рогатої худоби до морули-бластоцисти впливає вік яйцеклітини-реципієнта – частота

формування реконструйованих бластоцист була значно вищою за злиття бластомерів 5,5-денних морул з енуклейованими ооцитами, що культивувалися *in vitro* протягом 36 годин, ніж протягом 28, 32 і 40 годин. Продемонстровано можливість використання як джерела ядер 16-48-клітинних морул великої рогатої худоби, отриманих *in vivo* і далі кріоконсервованих, а також морул, отриманих *in vitro*. Частота злиття, дроблення і формування бластоцист для свіжих ембріонів, отриманих *in vivo*, заморожено-відтаяних ембріонів, отриманих *in vivo*, і ембріонів, отриманих *in vitro*, становила 80,0; 75,4 і 30,2%; 74,0; 64,9 і 7,1%; 84,5; 70,7 і 22,6%, відповідно.

Додатковим джерелом ядер можуть стати ембріональні стовбурні клітини (ЕСК). Вирішення цієї проблеми дозволить, як очікується, одержувати велику кількість ідентичних нащадків.

ЕСК мають нормальний каріотип, лінії цих клітин можна зберігати в недиференційованому стані в культурі від 3-х місяців до року, заморожувати і відтаювати кілька разів без істотного зниження їх здатності до розвитку. Іншою перевагою ЕСК є те, що вони можуть бути отримані від ліній тварин, що несуть рецесивні летальні мутації або від партеногенетичних ембріонів. ЕСК не диференційовані і після утворення химерних ембріонів з них і звичайних морул або бластоцист можуть брати участь у формуванні різних органів, у тому числі клітин зародкової лінії. Оскільки ЕСК можна генетично трансформувати, з їх допомогою можливе створення трансгенних тварин. ЕСК можуть, імовірно, формувати повноцінний ембріон. Нещодавно проведені на мишах експерименти підтвердили це припущення, показавши принципову можливість злиття ЕСК з енуклейованими ооцитами і одержання реконструйованих ембріонів.

Пересадження ядер ембріональних стовбурних клітин, отриманих від ВКМ (внутрішньоклітинна маса) бластоцист і морул великої рогатої худоби, шляхом електрозлиття ЕСК (діаметр стовбурних клітин дорівнює 15-22 мкм) з енуклейованими ооцитами корів, що дозріли *in vitro*, дозволило одержати клони ембріонів на стадії бластоцисти, пересадження яких реципієнтам призвело до одержання трьох 38-45-денних плодів. Не було встановлено змін морфологічних характеристик ЕС-клітини протягом понад 12-місячного культивування клітин *in vitro*; показана здатність ліній ЕСК до спонтанного диференціювання в ембріодні тіла і ендодермоподібні клітини.

Великий інтерес викликають повідомлення К. Кемпбелла зі

співавторами про одержання 5-ти живих ягнят шляхом злиття поодиноких клітин ембріонального диска (ЕД-клітини) 9-денних ембріонів овець з енуклеюваними дозрілими до метафази II ооцитами, при цьому клітинні лінії ЕД-клітин залишалися тотипотентними, принаймні, протягом 3 пасажів.

Принципово вищим ступенем клонування є так зване *соматичне клонування*, коли донорами ядер є соматичні клітини дорослого організму. Якщо в перших двох типах клонування можливо отримати копії ембріона і невідомо, які властивості матимуть тварини з цих зародків, то в останньому - копіюється існуючий дорослий організм. Отримання генетичних копій тварин відкриває неймовірні перспективи як для науки, так і для виробництва, але й реалізація соматичного клонування набагато складніша. Це викликано ступенем диференціації генетичного матеріалу клітин, що є донорами ядер для пересадок. Якщо на ранніх стадіях розвитку ембріону (2-4 клітини) всі бластомери є тотипотентними і кожен з них може дати початок новому зародку, то на більш пізніх стадіях ембріогенезу це вже неможливо. Ядра 8-32- клітинних зародків уже диференційовані, але ступінь їх спеціалізації ще не високий, і вони здатні активізуватися в цитоплазмі енуклеюваної яйцеклітини, а створений ядерно-цитоплазматичний гібрид спроможний розвинути в повноцінний зародок. Більш високий ступінь диференціації ембріональних стовбурних клітин, які отримують з внутрішньоклітинної маси бластоцисти, робить завдання реконструювання ембріону з їх ядер ще важчою. Набагато складніше завдання активізувати ядра глибоко диференційованих соматичних клітин. Теоретично це можливо тільки в тому разі, якщо соматична клітина буде на певній стадії мітозу – коли вона не виконує відповідні функції в організмі, а розмножується, тобто певною мірою схожа на ембріональну клітину.

У лютому 1997 року з'явилося повідомлення, що в лабораторії Яна Уілмута в Рослинському інституті (Единбург, Шотландія) розробили ефективний метод клонування ссавців і на основі його використання вивели ягня Доллі. Насамперед, необхідно було виділити ооцити (яйцеклітини). їх витягли з овець породи шотландська чорноморда, помістили у штучне поживне середовище із додаванням ембріональної телячої сироватки за температури 37°C и провели операцію енуклеації (видалення власного ядра). Після цього виникнула потреба забезпечення яйцеклітини генетичною інформацією від організму, який належало клонувати. Для цієї мети

використали різні клітини донора, але найбільш зручними виявилися диплоїдні клітини молочної залози дорослої вагітної вівці. Ці клітини виводили зі стадії росту клітинного циклу, розбавляючи сироватку, і через п'ять днів з'єднували з енуклеїованим ооцитом. Останній потім активували до розвитку за допомогою електричного удару. Зародок, що розвивається, культивували протягом 6-ти днів у штучному хімічному середовищі або яйцепроводі вівці, перетягнутому лігатурою ближче до рога матки. На стадії морули або бластоцисти ембріони (від одного до трьох) трансплантували в матку прийомної.

З 236 дослідів успіх мав лише один, внаслідок чого і народилося ягня Доллі, яке містить генетичний матеріал дорослої вівці, що вмерла три роки тому. Точними молекулярно-генетичними дослідженнями було доведено, що Доллі є клонованою твариною.

Особливий інтерес викликають досліди групи вчених з університету в Гонолулу на чолі з Ріузо Янагімачі. Авторам удалося вдосконалити метод Уілмута, вони відмовилися від електричної стимуляції злиття донорської соматичної клітини з яйцеклітиною й винайшли таку мікропіпетку, за допомогою якої можливо було безболісно витягувати ядро із соматичної клітини й трансплантувати його в яйцеклітину, що позбавлена власного ядра. Крім того, автори використали як донорські ядра відносно менш диференційованих клітин, що оточують ооцит. Нарешті, вдалося синхронізувати процеси, що протікають у яйцеклітині й ядрі, що трансплантується в неї. Це дозволило забезпечити природні ядерно-цитоплазматичні взаємини між ядром і цитоплазмою, оскільки ядро, що трансплантується і диференційоване в певному напрямку, та цитоплазма яйцеклітини до того працювали ніби в різних режимах.

Автори використали для трансплантації ядра клітин, що оточують ооцит (клітин так названого *cumulus oophorus*), клітин Сертолі з сім'яників і клітин, виділених з мозку – нейронів. Ядра, виділені із соматичних клітин, ін'єстували в енуклеїоване яйце за допомогою мікропіпетки. Яйце активували до розвитку, помістивши в спеціальний розчин (так званий *HEPES-CZB*), вільний від кальцію, із додаванням стронцію і цитохалазину. Стронцій активував яйце, а кальцій придушував утворення полярних тілець.

Ембріони культивували до стадії 2-8 клітин, морули або бластули й потім трансплантували в матку прийомної матері, де значна їх кількість імплантувалася і деякі (15-16%) продовжували розвиток. Відсоток виходу народжених мишенят (їх витягували за

допомогою розтину кесарева на 18,5-19-й дні вагітності) був, однак, низький – у різних серіях експериментів від 2,0 до 2,8%. Молекулярні дослідження довели належність ядер народжених мишенят до клітин донора соматичних клітин. Таким чином, принаймні в деяких випадках було доведено здатність ядер соматичних клітин забезпечувати нормальний розвиток ссавців. Отже, одержання клону принципово можливе. Однак, це ще не означає одержання точної копії клонованої тварини. Насправді одержати абсолютно точну копію даної конкретної тварини (а саме така кінцева мета ставиться в експериментах по клонуванню) набагато складніше, ніж це здається за поверхневого знайомства із проблемою.

І справа зовсім не в технічній розробці методів клонування, а в тому, що структурно-функціональні зміни ядер у процесі індивідуального розвитку тварин досить глибокі: одні гени активно працюють, інші інактивуються й «мовчать», при цьому сам зародок являє собою своєрідну мозаїку статей розподілу таких функціонально різних генів. І чим організм більше спеціалізований, чим вищий підйом еволюційних сходів, на яких він стоїть, тим ці зміни глибші й сутужніше оборотні. У деяких організмів, наприклад, у відомого кишкового паразита аскариди, генетичний матеріал у майбутніх зародкових клітинах, залишається незмінним під час розвитку, а в інших, соматичних клітинах викидаються цілі великі фрагменти ДНК – носія спадкоємної інформації. У червоних кров'яних клітинах (еритроцитах) птахів ядра зморщуються в маленьку грудочку й не працюють, а з еритроцитів ссавців, що стоять еволюційно вище за птицю, ядра взагалі відсутні.

Відомо, що в соматичних клітинах у ході їхнього розвитку хромосоми послідовно коротшають на своїх кінцях, у зародкових клітинах спеціальний фермент - теломераза добудовує, відновлює їх, тобто отримані дані знов-таки свідчать про істотні розходження між зародковими і соматичними клітинами. І отже, постає питання, чи здатні ядра соматичних клітин повністю й еквівалентно замінити ядра зародкових клітин у їхній функції забезпечення нормального розвитку зародка.

У жаби, як істоти гірше розвиненої, ніж ссавці, ядерні зміни менше виражені. І при цьому відсоток успіху за клонування, як уже відзначали, невисокий (1-2%), а крім того, навіть ті жаби, які досягають у дослідах з клонування дорослого стану, не без дефектів, отже, про точне копіювання донора, на жаль, важко говорити навіть у

цьому найпростішому випадку. Але ссавці значно складніші, ніж жаби за власного організацією й ступенем диференціації клітин. Природно, у них відсоток успіху буде, принаймні, не вище (про що й свідчать результати дослідів Р. Янагімачі). Виникає проблема – як повернути ядра соматичних клітин, що змінилися, до вихідного стану, щоб вони могли забезпечити нормальний розвиток тієї яйцеклітини, у яку їх трансплантували. Успіх буде залежати від того, чи вдалося знайти таку соматичну клітину (із числа так званих *камбіальних*, від лат. *cambium* обмін; клітини, що подвоюються), ядро якої ще не втратило свого потенціалу, і так, щоб ще й не ушкодити це ядро в процесі складних хірургічних маніпуляцій. Крім того, умови розвитку в матці різних прийомних матерів будуть розрізнятися, а існує таке поняття, як норма реакції, тобто певні межі коливань прояву даного гена у фенотівій ознаці. Це значить, що в різних умовах розвитку зародка однакові гени будуть виявляти свою дію по-різному. Але ж таких генів тисячі. Отже, імовірність повної подібності клонованих тварин буде не дуже велика.

Таким чином, у наш час можливо розглядати як науковий напрямок з певними досягненнями тільки клонування ембріональне. І хоча з загальнобіологічної точки зору соматичне і ембріональне клонування суттєво відрізняються, з погляду на використання цього методу в народному господарстві, зокрема в тваринництві чи фармацевтичній промисловості, різниця між ними може бути невеликою. Це можливо за рахунок використання біотехнології, в якій комбінуються клонування як метод розмноження організмів і кріоконсервація як метод введення останніх в анабіоз. Запропонована біотехнологія дозволяє і у разі використання ембріонального клонування передбачати ознаки нащадків за рахунок того, що поки більшість ембріонів клону зберігається в замороженому вигляді - у скрапленому азоті, 1-2 з них пересаджуються реципієнтам і перевіряються за якістю нащадків. Для повторного розмноження і отримання чисельних нащадків використовуються тільки ембріони тих клонів, що мають необхідні господарсько-корисні ознаки. За кількісними та якісними показниками ембріональне клонування наближається до соматичного саме при повторному (багаторазовому) розмноженні зародків, коли клоновані ембріони попереднього покоління є донорами ядер для наступного циклу реконструкції. У цьому разі кількість зародків зростає з геометричній прогресії, а ефективність реалізації біотехнології отримання нащадків з

прогнозованими ознаками наближається до значень, що задовольняють практиків.

Незважаючи на те, що величезні потенційні можливості методу клонування привернули увагу багатьох провідних учених сучасності, що в розвинутих країнах виділяються великі кошти на дослідження в біотехнології тварин як у межах бюджетних асигнувань на науку, так і приватним капіталом, успіхи залишаються поки що незначними. Їх можна оцінити як такі, що показали принципову можливість клонування вищих тварин, але до розробки технологічного процесу, що давав би стабільні та задовільні за економічними показниками результати ще далеко.

Статистика свідчить, що вихід потомства від кількості проведених ядерних пересадок вкрай низький і для головних видів сільськогосподарських тварин становить: у свиней - 1%, у великої рогатої худоби коливається від 1% до 4%, у овець – 4%.

Низький рівень успіху, навіть у разі найпростішого методу – ембріонального клонування, зумовлений впливом на життєздатність реконструйованих ембріонів великої кількості факторів і невивченістю багатьох біологічних процесів, під час яких проводяться маніпуляції. Певною мірою, успіх кожного дослідження є результатом майстерності та інтуїції колективу експериментаторів. Тому глибоке вивчення механізмів перетворень, що відбуваються у статевих і ембріональних клітинах у процесі клонування, вдосконалення методик, що застосовуються на різних етапах клонування, має вирішальне значення для подальшого розвитку цього напрямку біотехнології.

3. Методи одержання монозиготних близнюків.

Як зазначалося, темпи селекційного прогресу сільськогосподарських тварин значною мірою гальмують низькі темпи розмноження. Тому одержання від однієї особини великої кількості нащадків сприяє завданням селекціонерів щодо створення високопродуктивних стад тварин. Але запроваджуючи трансплантацію ембріонів, слід пам'ятати, що при цьому отримують не ідентичних донору тварин. Це пов'язано з рекомбінаційною мінливістю, що виникає в процесі перекомбінації спадкового матеріалу батьків. Тому створені у період відбору й підбору унікальні генотипи в наступних поколіннях можуть не відтворюватися. На це вказували класики зоотехнії, які рекомендували використовувати

тварин у тих же типах парування, що раніше дали цінне потомство. На жаль, нині приймають «апріорі» високі продуктивні властивості нащадків, одержаних за трансплантації, але недостатньо вивчають повторюваність оцінок високопродуктивних донорів та їх потомство. Тому назріло питання виведення генетично подібних тварин, тобто особин з ідентичним генотипом. Як відомо, до них належать однойцеві двійнята, що є цінними об'єктами для генетичних досліджень. Усі онтогенетичні зміни, що відбуваються з ними, та реалізований рівень продуктивності залежатимуть лише від умов середовища. Вважають, що дані, отримані від однієї пари близнят, такі ж як і від 50 тварин.

Виведення однойцевих близнюків має велике значення для тваринництва. З одного боку, збільшується вихід телят від одного донора, а з іншого боку – з'являються генетично ідентичні двійні. Одержання їх у великій кількості могло б полегшити оцінку бугаїв за якістю нащадків, зменшити вартість спермопродукції, прискорити й здешевити тестування препаратів і спростити дослідження в галузі годівлі тварин. Генетично ідентичні копії ембріонів і телят можливо успішно застосовувати в дослідженнях з вивчення взаємодії генотип-середовище, зокрема, у таких дослідженнях, як вивчення впливу зовнішнього середовища на розвиток половинок одного ембріона після їх пересадження одному або різним реципієнтам, впливу годівлі і утримання тварин-близнюків на формування їх фенотипів та ін. У селекції також є інтерес до використання монозиготних близнюків для оцінки м'ясних якостей шляхом забою одного близнюка і перенесення отриманих даних на інший. Після розподілу ембріона одну половинку можна кріоконсервувати, а іншу – пересадити реципієнтові. За позитивних результатів оцінки отриманого потомства половинку, що залишилася, можливо буде використовувати в селекційному процесі.

Але частота народження близнят досить низька. Наприклад, корови народжують близнят один раз на 500-2000 отелень. Тому розраховувати на ініціацію спонтанного отримання двійнят або трійнят досить складно, а селекція на багатоплідність неефективна через низьку успадковуваність ознаки. Враховуючи ці обставини, спробували розподілити ранні ембріони як окремі бластомери і пересадити їх реципієнтам. Частина з них можна зберігати в умовах глибокого заморожування. Це дає можливість накопичувати частини ембріонів, які у подальшому, за результатами продуктивності їх

генетичних аналогів, що трансплантувалися реципієнтам, відбирають та здійснюють клонування найбільш цінних особин. Таким же чином можна зберігати генофонд деяких порід та видів тварин.

Можливість зазначених маніпуляцій доведено експериментами. Так, у 1979 р. в Гессенському університеті було пересаджено окремі половинки 5-6-денних ембріонів 39 вівцям і одержано 9 ягнят. Потім одержали однойцевих двійнят з 4- та 8-клітинних ембріонів овець, доведено можливість зберігання половинок у замороженому стані й виведення монозиготних двійнят різного віку.

У практиці використовують два способи розподілення ембріонів – перев'язуванням і розрізуванням. У першому разі зародки відбирають за допомогою мікроманіпулятора, не порушуючи прозорої оболонки, потім перев'язують їх синтетичною ниткою діаметром 15 мкм посередині. Розподілені половини окремо дробляться, утворюючи зародки. Ембріони також розрізають ножем навпіл або на більшу кількість частин.

Розподілення зародків проводиться на предметному склі в краплі середовища Дюльбекко скляною мікроголкою діаметром 10-15 мкм. Голку невеликими поступальними рухами опускають під кутом 15-20° до площини предметного скла по лінії передбачуваного розрізу на ембріон, який є в зоні *пелюциди* (прозора оболонка, що вкриває ооцит, на поверхні якої розташовані рецептори для розпізнавання сперміями; після запліднення сприяє процесу прикріплення у статевих шляхах самки), до повного розподілу його на дві частини. Мікроголка виконує при цьому дві функції: розподілення ембріона на частини і його фіксацію, що усуває необхідність застосування мікроприсоски.

Розподіл ембріонів мікроголкою, на відміну від мікроскальпеля, дає змогу одержувати частини зародків із найменшою кількістю пошкоджень. Це зумовлено тим, що голка не має гострих та ріжучих сторін і під час розподілу зародка на частини вона лише розриває зв'язки між бластомерами, а не розрізає їх як лезо.

Після розподілу ембріона на дві частини, одержані половинки переносять до термостату і культивують протягом 3-х годин. Якщо за цей час половинки зародків компактизувалися, їх пересаджують реципієнтам без попереднього поміщення в зону *пелюциди*.

Нещодавно розроблено новий спосіб розподілу ембріонів великої рогатої худоби на половинки шляхом проколювання заточеною мікропіпеткою прозорої оболонки бластоцисти, що

розширюється, поблизу внутрішньоклітинної маси (ВКМ) з наступним (через 24 години культивування) відсіканням бластоцисти-половинки, що вилупилася. Таким методом уже отримано дві пари монозиготних телят-близнюків. Даний спосіб, на відміну від звичайного, призводить до дуже малих клітинних витрат за розподілу.

Метод роботи з ембріонами на ранніх стадіях у практиці широко використаний не був, оскільки потребує хірургічного вилучення і трансплантації одержаних бластомерів.

Нині мікрохірургічними методами почали розділювати зародки великої рогатої худоби на стадіях морули або бластоцисти. З таких половинок зародків уже одержані телята (США, Англія, Франція, Німеччина). При цьому використовують нехірургічні методи. Так, відібрану із зони пелюцида половинку бластоцисти повертають у власну оболонку, а іншу розміщують у прозору оболонку яйцеклітини або непридатного для трансплантації ембріона.

Дослідженнями встановлено, що для розподілу ембріонів найбільш придатні пізні морули і ранні, або розширені бластоцисти. Ембріони даних стадій розвитку вимивають з рогів матки на 6-8-й день після запліднення донорів.

На 6-й день більшість ембріонів перебуває в стадії морули, а на 7-й день переважна їх кількість представлена бластоцистами. У той же час дослідження показали, що вимиті на 6-й або 7-й день ембріони перебувають на різних стадіях розвитку. Це пояснюється тим, що препарати, які викликають суперовуляцію, індукують неодночасний вихід яйцеклітин, і тому багаторазове запліднення донорів, що спрямоване на одержання великої кількості ембріонів, призводить до появи нормально розвинених ембріонів на стадіях морули і бластоцист.

Бластоциста є пристосованою стадією розвитку, необхідною для імплантації, і властива ембріогенезу ссавців. Бластоциста складається з двох клітинних популяцій, одна з яких трофктодерма (ТЕ) або трофобласт, необхідна для імплантації, а друга – внутрішня клітинна маса (ВКМ) або ембріобласт – необхідна для розвитку зародка та індукції у ТЕ процесів, без яких неможлива повноцінна імплантація і плаценталії. У формуванні зародкових оболонок крім ТЕ беруть участь і похідні ВКМ.

Морула ссавців – кулясте скупчення бластомерів, позбавлене порожнини, а бластоциста - пухирець, що складається зі стінки (ТЕ),

порожнини з рідиною (бластоціль) і скупчення клітин (ВКМ) на одному з полюсів внутрішньої поверхні ТЕ. Процес утворення порожнини, тобто формування бластоцисти, називається *кавітацією*.

ВКМ і ТЕ ранніх бластоцист розрізняються за рядом властивостей. Так, ізольовані ВКМ не здатні продукувати рідину бластоцїлі, а клітини ТЕ можуть це робити. Клітини ВКМ легко агрегують між собою, а фрагменти ТЕ позбавлені цієї здатності. Якщо трансплантувати ізольовані фрагменти ВКМ і ТЕ в матку самки-реципієнта, то ТЕ індукують *децидуальну реакцію* (зміни, що відбуваються напередодні імплантації в матці, а також зародковий сигнал, який продовжує життя жовтого тіла) і починають імплантуватися. Ізольовані ВКМ, потрапивши до матки, гинуть, не індукуючи в ній децидуальної реакції.

Отриманий з рогів матки матеріал оцінюють під мікроскопом за 80-100-кратного збільшення. На підставі морфологічної оцінки відбирають незапліднені яйцеклітини і ембріони: нормально розвинені, з частковими порушеннями і дегенеровані. За якістю морули і бластоцисти оцінюються як відмінні, хороші, задовільні, умовно придатні і непридатні. Оцінюючі якість ембріонів враховують стадію розвитку зародків, відповідність стадії розвитку віку ембріона, стан бластомерів, прозорої оболонки та ін. Для мікрохірургічних робіт відбирають ембріони відмінної і хорошої якості, класифіковані як: пізні морули; ранні, що розширюються і пізні (розширені) бластоцисти. Такі ембріони мають ознаки (Інструкція з трансплантації ембріонів великої рогатої худоби, 1987):

- пізня морула відмінної якості – компактна структура, що складається з 32-64 щільно з'єднаних між собою клітин із розходженнями за величиною між бластомерами не більше 2:1. Характерні округлої форми, не зруйновані, без ознак лізису бластомери з зернистою цитоплазмою, неушкодженою прозорою оболонкою; відносно широкий перивителіновий простір не містить ізольованих бластомерів, гранул і включень. Діаметр прозорої оболонки – 140-170 мкм;

- пізня морула хорошої якості - допускається наявність гранул і включень у перивителіновому просторі, поодиноких стиснутих бластомерів;

- пізні морули, що характеризуються значними порушеннями: дроблення частини бластомерів, великі розходження між бластомерами, стискування бластомерів, їхнє руйнування, порушення

зв'язків між бластомерами, невідповідність стадії розвитку віку ембріонів, ушкодження прозорої оболонки й ін., непридатні для мікроманіпуляцій;

- ранні бластоцисти відмінної якості складаються із > 64-130 рівномірно подрібнених клітин без ознак лізису, мають округлу форму, більш вузький, ніж у пізньої морули, перивителиновий простір, що не містить гранул, включень, поодиноких клітин, не ушкоджену прозору оболонку, що має таку ж товщину, яка властива прекомпактизованим ембріонам, помітний бластоціль, диференційовані клітини трофектодерми (ТЕ) і внутрішньої клітинної маси (ВКМ). Діаметр прозорої оболонки – 140-170 мкм;

- ранні бластоцисти хорошої якості можуть мати тонку прозору оболонку, нечітко виражений бластоціль, у перивителиновому просторі бувають гранули і включення, клітини трофектодерми можуть бути трохи стиснуті;

- бластоцисти, що розширюються, відмінної ї хорошої якості також складаються із > 64-130 клітин, мають товсту прозору оболонку, діаметр якої 140-200 мкм. Перивителиновий простір відсутній – витиснуто клітками трофектодерми, бластоціль великий, внутрішня клітинна маса локалізована на одному з полюсів ембріона, клітини ВКМ і трофектодерми добре помітні – останні мають більш витягнуту форму;

- розширені (пізні) бластоцисти відмінної і хорошої якості складаються із > 130-200 клітин, прозора оболонка ембріонів розтягнута, тонка, порожнина збільшена, клітини ВКМ і ТЕ добре виражені. Діаметр прозорої оболонки 180-220 мкм;

- бластоцисти, що характеризуються відсутністю вираженого бластоцілю, диференціюванням клітин ТЕ і ВКМ, зруйнованими зв'язками між клітинами, руйнуванням клітин, тріщинами в прозорій оболонці, вибраковують через їхню непридатність для мікрохірургічних робіт.

Морфологічна оцінка ембріонів великої рогатої худоби в даний час є основним методом оцінки якості ембріонів перед їхньою трансплантацією. Цей спосіб не позбавлений суб'єктивності, у деяких випадках буває складно відрізнити, наприклад, пізню морулу від яйцеклітини та ін. Тому було розроблено інші методи оцінки повноцінності ембріонів. До них відносяться культивування зародків і зафарбовування клітин вітальними барвниками.

Культивування ембріонів *in vitro* дозволяє визначити здатність

зародків до подальшого розвитку. Однак культивування ембріонів протягом тривалого часу в будь-яких середовищах знижує їх життєздатність.

Методи вітального зафарбовування засновані на здатності барвників проникати через плазматичну мембрану живих або загиблих клітин. Основна вимога, що висувається до барвників – їх нетоксичність.

За розробки оптимальних умов одержання монозиготних близнюків велика увага приділялася тривалості культивування *in vitro* після поділу і трансплантації половинок ембріонів, а також їхньому збереженню в замороженому стані.

За попарних пересаджень половинок обидві половинки одного ембріона пересаджували реципієнтові в один ріг матки, що знаходиться на боці яєчника з жовтим тілом.

Дослідження показали відсутність достовірних розходжень у приживаності половинок відмінної і хорошої якості (якість половинок і їх приживаність не залежали від типу використаних мікрохірургічних інструментів), приживаність половинок задовільної якості різко знижувалася.

Однак, стадія розвитку ембріонів істотно впливала на результати пересадження половинок - приживаність поодиноких половинок бластоцист була істотно вище, ніж за поодиноких половинок морул. Попарне пересадження половинок морул і бластоцист сприяло зростанню частоти приживаності половинок.

Визначаючи якості половинок, слід враховувати розміри половинок, ступінь їхньої компактності і формування бластоцілю:

1. До відмінних половинок відносять рівні за розмірами частини ($1/2 + 1/2$) і половинки, що мають великі розміри ($2/3, 3/4$), що зовсім округлилися протягом 30-хвилинного культивування. За 3 години культивування такі половинки мали виражений бластоціль.

2. У хороших половинок також є бластоціль, але вони незначно відрізняються своїми розмірами ($< 1/2$) і мають ще не зовсім округлу форму.

3. Задовільні половинки значно відрізняються за своїми розмірами ($1/3, 1/4$), характеризуються слабовираженою компактністю і відсутністю бластоцілю.

4. Дегенеровані половинки не компактні, мають багато зруйнованих клітин, на вигляд пухкі через руйнування міжклітинних зв'язків між бластомерами.

Отримані дані свідчать, що порівняно з пересадженням цілих ембріонів, трансплантація свіжоотриманих половинок сприяє збільшенню кількості народжених телят на 40-60%. Методи розподілу, що використані, є простими, деякі з них не потребують дорогого обладнання (мікрomanipуляторів, мікрокузні) і тому можуть бути впроваджені на будь-яких пунктах трансплантації ембріонів як складовий елемент технології одержання і трансплантації ембріонів.

Для одержання четвертинок ембріонів компактизовані половинки поділяють ще раз на дві частини.

Після оцінки стану четвертинки ембріонів, визнаних придатними для подальшого розвитку, пересаджують до порожніх зон пелюциди. Для цього прозору оболонку фіксують мікроприсоскою із зовнішнім діаметром 100-150 мкм і внутрішнім – 30-40 мкм. Пересадження частин ембріонів всередину зони пелюциди проводять за допомогою ін'єкційної мікропіпетки через розріз, зроблений у зоні раніше. У дослідах використовують мікропіпетки із зовнішнім діаметром 65-75 мкм як із рівним, так і зі скошеним (загостреним) кінцем. Останнє значно полегшує проникнення цього інструмента всередину зони пелюциди. Поміщені у прозору оболонку четвертини ембріонів заряджають до контейнерів для пересадок і пересаджують реципієнтам.

Порожні зони пелюциди отримують заздалегідь з ооцитів великої рогатої худоби. Ооцити добувають із яєчників і очищують від клітин кумулюсу. Потім поміщають на предметне скло у краплю середовища Дюльбекко і фіксують мікроприсоскою. Мікроножем, зробленим із леза бритви, трохи надрізають зону пелюцида, до якого підводять скляну мікропіпетку діаметром 50...70 мкм і виймають ооцит із прозорої оболонки. Одержані таким чином порожні зони пелюцида зберігають у середовищі Дюльбекко за температури +4,0-5,0°C.

За поділу пізньої морули або ранньої бластоцисти на 4 частини ембріони теж спочатку розділяють на дві половинки, кожна з яких культивують за температури 38,0°C у поживному середовищі 2-4 години, після чого кожен напівембріон поділяють на дві частини і культивують до формування бластоціля. Мікрохірургію ембріонів даних стадій розвитку краще проводити за кімнатної температури або в охолодженому розчині, тому що за температури середовища вище 20°C клітинні мембрани стають більш липкими, що утрудняє маніпуляції. У дослідах щодо чверті пізніх морул і ранніх

бластоцистів у процесі культивування *in vitro* компактизують і формують бластоциль з помітними клітинами трофктодерми і внутрішньої клітинної маси. Однак, їх приживаність була значно нижчою порівняно з половинками і цілими ембріонами.

Інший спосіб одержання бластоцист-чвертей великої рогатої худоби полягає у розподілі 4-клітинних ембріонів, отриманих *in vitro*, на окремі бластомери, поміщення їх у прозорі оболонки і наступного культивування до стадії бластоцисти. Від кожного з 73% 4-клітинних ембріонів було отримано 3-4 бластоцисти з кількістю клітин, у чотири рази меншою, ніж у звичайних бластоцист. У 1995 році вперше з'явилось повідомлення про одержання чотирьох монозиготних телят (після пересадження бластоцист-чвертей з ізольованих бластомерів 4-клітинного ембріона, отриманого *in vitro*).

Досліди показали, що з чвертей пізніх морул можуть утворюватися нормальні бластоцисти з числом клітин, у чотири рази меншим, ніж у звичайної бластоцисти. Ці бластоцисти можуть імплантуватися і розвиватися. Підтвердженням тому є народження двох живих теличок із чвертей однієї пізньої морули. Наступні досліди, однак, показали, що ембріони-чверті порівняно з цілими ембріонами і половинками, мають знижену приживаність, тому розподіл пізніх морул і ранніх бластоцист на 4 частини визнано недоцільним у комерційній діяльності. Очевидно, вироблення ранніх ембріональних факторів поодинокими чвертями недостатнє для запобігання лізису жовтого тіла реципієнтів. А кількість клітин трофктодерми і внутрішньої клітинної маси, що утворюється в таких ембріонах, не завжди забезпечує імплантацію і (або) формування позазародкових і ембріональних тканин плоду. До того ж, у процесі розподілу може відбуватися руйнування частини їх клітин. Збільшити частоту приживаності чвертей ембріонів великої рогатої худоби можна шляхом пересадження разом із чвертю свіжоотриманих трофобластичних пухирців.

Після розподілу пізніх морул і ранніх бластоцист на 2-4 частини з кожної частини ембріона формується бластоциста з числом клітин, удвічі або вчетверо меншим, ніж у звичайної бластоцисти. Успішна імплантація таких бластоцист завершується народженням нормальних нащадків. Дослідження, проведені на мишах, показали, що в зародках-половинках після імплантації на стадії гастрюляції відбувається прискорення проліферації клітин і до 10-ї доби вони досягають норми. Якщо ж агрегувати дві або більше морул миші, з

них сформується бластоциста, розміри якої значно більше розмірів звичайної бластоцисти. Проте, через 30-36 годин після імплантації в гігантських бластоцистах починається уповільнення темпів проліферації клітин і вже на стадії пізнього зародкового циліндра химерні ембріони за своїми розмірами не відрізняються від звичайних. Таким чином, постімплантовані ембріони мишей здатні дізнаватися про кількість клітин що відповідає гастрюляції і коректувати темп проліферації, нормалізуючи ріст і морфогенез. Очевидно, це стосується не тільки до мишей і великої рогатої худоби, а й усіх видів ссавців. Наприклад, трансплантація вівцям-реципієнтам реконструйованих бластоцист овець, що містять власну і чужу внутрішню клітинну масу, призвела до народження химерних ягнят; після пересадження половинок морул і бластоцист отримано монозиготних близнюків у свиней і кіз. Однак, здатність до регуляції маси клітин зародка не нескінченна і визначається певною граничною кількістю клітин. Значне зменшення їх кількості якщо і не перешкоджає здійсненню кавітації (від лат. *cavitatis* – заглиблення, порожнина – утворення пухирців), то і не призводить до формування нормальної бластоцисти, обмежуючись утворенням трофобластичних пухирців, нездатних до імплантації.

Як показали дослідження, наявність прозорої оболонки не є необхідною для подальшого розвитку половинок пізньої морули або бластоцисти. Значення прозорої оболонки для подальшого розвитку розподіленого ембріона зростає при трансплантації чверті ембріона. Оскільки напівембріони, поміщені в оболонку, легше ідентифікуються під мікроскопом, менше схильні прилипати до стінок піпетки або пайєти, можуть бути менше травмовані при трансплантації реципієнтам.

Прозора оболонка є складним біохімічним і антигенним комплексом позаклітинних глікопротеїнів, що оточують не тільки ооцити, а й доімплантаційні зародки. Прозора оболонка є потенційною імуноконтрацептивною мішенню, адже антитіла проти неї повністю пригнічують запліднення як *in vitro*, так і *in vivo*. У свиней прозора оболонка складається з 4-х глікопротеїнів (ZP1 - 82000, ZP2 - 61000, ZP3 - 55000 і ZP4 - 21000). У яйцеклітинах свиней переважає ZP3, цей глікопротеїн ізольований і очищений хроматографічно, його використовують для отримання протизаплідних вакцин.

У мишей прозора оболонка складається з трьох сульфатованих глікопротеїнів (ZP1, ZP2, ZP3), що розрізняються молекулярною

вагою та іншими властивостями. ZP3 має молекулярну вагу 83000 і є специфічним глікоротеїном для зв'язування сперматозоїдів. Ізольований ZP3 ефективно запобігає зв'язуванню сперматозоїдів з прозорою оболонкою і таким чином пригнічує запліднення у мишей. Якщо імунізувати мишей сироваткою проти прозорої оболонки, при цьому виникає безпліддя. Цей ефект зворотний і обумовлений запобіганням зв'язування сперміїв з прозорою оболонкою або її непроникністю для сперміїв. Найбільше у складі прозорої оболонки яйцеклітин мишей міститься сульфатованих глікопротеїнів з молекулярною вагою 140000 (ZP2). Цей глікопротеїн також змінюється після запліднення і, ймовірно, бере участь у блокаді поліспермії. Антитіла до ZP2 не заважають прикріпленню сперміїв до прозорої оболонки, але блокують запліднення, роблячи неможливою penetрацію прозорої оболонки.

Прозора оболонка розчиняється проназою, трипсином, хімотрипсином та іншими протеолітичними ферментами (у хом'яків і мишей – усіма цими ферментами, у корів – тільки проназою), та її стійкість до дії цих ферментів суттєво зростає після запліднення. Вважають також, що стійкість прозорої оболонки обумовлена часом перебування яйцеклітин у яйцепроводі самки (найшвидше перетравлюються прозорі оболонки незрілих яйцеклітин, найдовше - оболонки доімплантаційних зародків). Відомо також, що перебування ооцитів (незрілих або дозрілих *in vitro*) у середовищах без сироватки призводить до затвердіння прозорої оболонки, що викликає підвищення стійкості її до протеолітичних ферментів, а також до значного зниження частоти запліднення таких яйцеклітин. За штучної активації розчинність прозорої оболонки трипсином або проназою погіршується, але меншою мірою, ніж після запліднення.

Основне значення прозорої оболонки зводиться до участі у заплідненні. За допомогою глікопротеїну ZP3 спермії зв'язуються з прозорою оболонкою, а після проникнення одного спермія в яйцеклітину цей глікопротеїн прозорої оболонки модифікується, і вона стає недоступною для інших сперміїв. У яйцеклітин з інтактною прозорою оболонкою блокада поліспермії розвивається за одну хвилину після запліднення.

Прозора оболонка зберігається протягом значної частини доімплантаційного розвитку зародків (кролі, вівці, свині). Завдяки прозорій оболонці бластомери зародка, що дробиться, розташовуються компактно і впорядковано, орієнтуючись в

обмеженому тривимірному просторі. Це має важливе значення для взаємодії бластомерів і створення між ними максимальної кількості контактів, що сприяє нормальній компактизації і поляризації бластомерів. Якщо видалити прозору оболонку у некомпактизованих зародків, то дроблення бластомерів буде продовжуватися, однак у багатьох випадках вони будуть розташовуватися у вигляді ланцюга, і компактизація повністю порушиться і буде дуже запізнюватися.

Прозора оболонка перешкоджає випадковому злипанню сусідніх зародків (бластомери доімплантаційних зародків мають підвищену здатність до злипання), а також прилипання зародків до стінки яйцепроводу і матки, яке викликає загибель ранніх зародків. Тому при роботі *in vitro* з ранніми зародками з віддаленою прозорою оболонкою їх або поміщають в інші прозорі оболонки (наприклад, незрілих або дозрілих ооцитів), або використовують штучні оболонки, наприклад, з агару або желатину.

Важливу роль прозорої оболонки зазначено в досліджах, що продемонстрували можливість кріоконсервування половинок 7-денних ембріонів великої рогатої худоби. Половинки пізніх морул або бластоцист великої рогатої худоби, кріоконсервованих без оболонки, були непридатні для пересадження. Пересадження заморожено-відтаяних половинок відмінної і хорошої якості, що були в одній оболонці, індукувало тільність у 25,0% реципієнтів. Переміщення ж половинок до додаткової прозорої оболонки бластоцист, що вилупилися, отриманих у свині, призвело до тільності 46,2% реципієнтів. Таким чином, переміщення напівембріонів у додаткову оболонку є ефективним методом збереження їхньої життєздатності при кріоконсервуванні.

Для пересадження половинок і чвертей до прозорих оболонок, використовують оболонки свіжоотриманих дегенерованих зародків або незапліднених яйцеклітин, а також оболонки статевих клітин і зародків, що зберігаються в 2,0 М розчині сахарози за температури – 20°C.

Половинки і чверті ембріонів великої рогатої худоби пересаджують реципієнтам після нетривалого культивування, протягом якого вони компактизуються – набувають кулястої форми.

Застосовують різні способи нехірургічної трансплантації половинок ембріонів реципієнтам, синхронізованим за статевим циклом зі стадіями розвитку напівембріонів: по одній половинці пересаджують кожному реципієнтові в ріг матки; обидві половинки

трансплантують одному реципієнтові в ріг матки зі сторони яєчника з жовтим тілом; дві половинки пересаджують одному реципієнтові в різні роги матки.

Двійні, що розвиваються в одному розі, можуть призводити до ускладнення отелень і високої смертності монозиготних близнюків. З метою підвищення приживаності половинки в один ріг матки можна пересадити як половинку, так і нерозподілену бластоцисту умовно-придатної якості з життєздатними клітинами трофктодерми, що обумовить підвищену інтенсивність ембріональних сигналів матці реципієнта на продовження функцій жовтого тіла статевого циклу і перетворення його на жовте тіло вагітності.

Установлено, що тривалість культивування половинок ембріонів більше 4-х год. знижує результативність їх наступної приживаності. Культивування *in vitro* половинок ембріонів великої рогатої худоби протягом 24-х год. знижує їх приживаність приблизно в три рази порівняно з культивуванням *in vitro* протягом 4-6 год.

За даними Дж. Хан і Т. Розеліуса, розподіленню ембріонів суттєво не впливало на їх життєздатність. Якщо за пересадження цілих ембріонів одержано 63,5% тільності реципієнтів, то за трансплантації половинок – 58%. Тепер широко практикують розділення на половинки і четвертинки розморожених ембріонів.

Теоретично можливо розділити ембріони на досить велику кількість частин, і створити мікроклон, тим самим різко збільшити кількість нащадків. Проте, як зазначають Л.К. Ернст і А.К. Голубев, найперспективнішим шляхом є використання культури клітин. Якби вдалося культивувати окремо клітини ембріобласта і трофобласта без втрати їх специфічності, то потім створені ембріони (шляхом з'єднання клітин ембріобласта і трофобласта з клітинною культурою) давали б необмежені кількості однакових за генотипом нащадків (стандартних тварин). Але слід враховувати, що тут, як і за одержання монозиготних двійнят, відбувається копіювання генотипу, невідомого щодо продуктивних якостей організму. Це є основним недоліком зазначеного методу. Необхідно також враховувати, що за допомогою розглянутих методів поки що не вдалося одержати великої кількості ідентичних нащадків. Розподіл ембріона на велику кількість частин знижує їх здатність до розвитку. Однояйцеві близнюки не є абсолютними, зокрема фенотиповими копіями один одного. Так, у розподілених половинок 2-бластомерного ембріона миші була різна швидкість дроблення, а одержані таким способом

ягнята-близнюки мали відмінності у пігментації вовни. Це також спостерігали у телят.

4. Створення химерних тварин.

Поняття химера (грец. *chimaira*) означає складена тварина. У сучасному понятті термін химера використовується головним чином за одержання складених організмів, у яких генетично різні клітинні популяції походять більше, ніж від однієї зиготи або зародка. За класифікацією К. Форда (1969), варто розрізняти первинний химерізм, коли різні клітинні популяції співіснують із моменту запліднення або раннього ембріогенезу, і вторинний, за якого комбінуються тканини від двох і більше дорослих особин або ембріонів після початку глибокої клітинної диференціації. Наприклад, у близнюків великої рогатої худоби спостерігається загальний плацентарний кровообіг і в крові можна виявити вторинний химерізм (Завертяєв Б.П., 1987). Варто відрізнити химер від спонтанно виниклих складених тварин – мозаїків, що походять з однієї заплідненої яйцеклітини.

У цей час одним з перспективних напрямків біотехнології є штучне одержання химер або генетичних мозаїків. Сутність такого біотехнічного методу, заснованого на досягненнях клітинної інженерії і мікрomanipуляцій на ранніх ембріонах, полягає в штучному об'єднанні ембріональних клітин двох і більше тварин, що належать не тільки до однієї породи, а й до різних порід і навіть видів. Отримані тварини - химери мають ознаки різних генотипів. Сучасна мікрохірургія дозволяє одержувати химер, що мають чотирьох і більше батьків.

Методи створення експериментальних химер. Усі дотепер відомі в науці експериментальні химери ссавців створені методами агрегації двох (або більше) генотипічно різнорідних зародків або шляхом мікроін'єкції клітин внутрішньоклітинної маси (ВКМ) бластоцисти донорів у бластоціль ембріона-реципієнта. Перший метод дістав назву агрегаційний, другий - ін'єкційний. Схематично ці методи показано на рис. 65.

Агрегаційний метод. Уперше агрегаційний метод одержання химерних мишей був розроблений А. *Tarkowski* (1961, 1963) і В. *Mintz* (1962).

Два ембріони, що розрізняються генотипами на стадії 8-12 бластомерів, обробляють протеолітичним ферментом проназою,

вивільняють від зони пелюциду і зближають один з одним у культуральному середовищі. З'єднані ембріони культивують протягом 24-48 год. до завершення агрегації, тобто до утворення бластоцисти. Використають середовище Бринстера в краплях модифікованого розчину Кребса-Рингера з бікарбонатом, а також інші. Отримані таким чином химерні ембріони трансплантують реципієнтній миші. Агрегаційні химери можливо одержувати не тільки між двома ембріонами, а й між різним числом ізольованих бластомерів або окремими частинами ембріонів (Мак-Ларен Б., 1979). При цьому маса химерних ембріонів буває не більше ніж у звичайних, тобто вона підлягає дії механізмів ембріональної регуляції. Перевага агрегаційного методу полягає в тому, що він не потребує втручання мікрохірургічної техніки, що дозволяє широко його використати в ембріогенетиці.

Ін'єкційний метод. Ін'єкційний метод, що потребує застосування мікрomanipуляційної техніки й мікрохірургічного втручання, був розроблений Р. Гарднером (1968). За ін'єкційного методу використовують ембріони, що перебувають на стадії бластоцисти. Бластоцисту тримають усмоктувальною піпеткою й, використовуючи мікрomanipулятори, у трофобласті шляхом проколів голками зони пелюциду роблять отвір, через який ін'єктують ВКМ донорського зародка. Пізніше вдалося встановити, що за цим методом можливо ін'єктувати не тільки ВКМ ранніх ембріонів, а й більш диференційовані клітини. Отриману химерну бластоцисту трансплантують миші-реципієнтови.

Ін'єкційний метод знайшов застосування за одержання міжвидових химер.

Для ідентифікації химерних тварин застосовують ряд маркерів. Як маркерні використовують гени, що контролюють пігментацію, структуру шерсті, антигенні, біохімічні, морфологічні й ін. За одержання химерних тварин, що створюються від фенотипових контрастних порід або видів, широко використовують морфологічні маркери.

Створення химерних лабораторних ссавців. Першими створеними й ідентифікованими химерами були миші між лініями агуті і неагуті (чорна). Химери виявилися крапчастими, причому агуті (кремовий колір) і чорне забарвленням, перемішуючись, формували своєрідний візерунок (Mintz B., 1965). Надалі було показано, що в експериментальних химер, отриманих з пігментованої і

непігментованої лінії, стрижні деяких шерстинок були повністю пігментовані, інші – зовсім позбавлені меланину, а треті – були плямистими. Таким чином, у забарвленні шерсті мишей проявляється дія батьківських генів з характерним різним ступенем проміжної експресії генів. Якщо химеризм стосується кількох локусів, що впливають на колір шерсті, за утворення пігменту відбуваються фенотипові взаємодії.

Одержання агрегаційних внутрішньовидових химер-мишей дозволило встановити, що в організмі химери є генотипово різні популяції клітин, тобто генетична мозаїка. Це дозволяє аналізувати механізм дії різних генів, особливо мутантних, у процесі онтогенезу ссавців (Конюхов Б.П., Платонов Е.З., 1985).

Химери-миші отримані ін'єкційним методом, використання якого поглибило знання в проблемі детермінації клітин в онтогенезі. Наприклад, показано, що чим пізніше стадія розвитку ембріона, від якого взята ВКМ для ін'єкції в бластоциль, тим менша ймовірність одержання химер, і, нарешті, на основі ін'єкційного методу було отримано нові дані для розкриття механізму диференціації й малігнізації (від лат. *malignus* шкідливий, згубний, злоякісне переродження пухлини) клітин. На підставі цих даних з'ясовано, що, наприклад, багато генів які раніше «мовчали» у ракових клітинах, експресуються не тільки в онтогенезі миші, а й у її потомства. Отже, виникнення злоякісних новоутворень може бути обумовлено зміною експресії нормального клітинного генома і не слід розглядати мутації як єдину причину малігнізації.

У зв'язку з цим можна відзначити, що при ін'єкції в бластоцисту ВКМ тератокарциноми, її клітини у разі інтеграції в ембріон втрачають ракові ознаки. Отже, пухлинні клітини під впливом нормальних ембріональних клітин перетворюються на нормальні. Ці дані мають велике значення за виведення химерних тварин, стійких до пухлинних захворювань.

В останні роки велика увага приділяється одержанню міжвидових і міжпородних химер ссавців. Це особливо важливо в селекції сільськогосподарських тварин, тому що міжвидові або міжпородні химери в одному організмі можуть поєднувати різні господарсько-важливі ознаки.

Уперше міжвидові химери були отримані ін'єкційними і агрегаційними методами між двома близькими видами мишей, які звичайно не схрещуються – *M. musculus* і *M. castor*. У міжвидових

химер, отриманих шляхом ін'єкції ВКМ *M. caroli* у бластоцисти *M. musculus* і пересаджених реципієнтам останнього виду, не виявили імуногенетичної несумісності клітин, і їхній розвиток відбувався нормально. Якщо ж міжвидові химери одержували реципрокною ін'єкцією і розвиток зародків відбувався в організмі *M. musculus*, то химери гинули протягом 16 діб після пересадки. Це свідчить про те, що бластоцисти *M. caroli* дегенерують у матці *M. musculus*, в той час як агрегація двох генетично різних зародків забезпечує життєздатність химер.

Уперше міжвидові химерні зародки між мишею і пацюком шляхом агрегації морул було отримано у 70-х роках. У 1973 р. в експерименті з ін'єкції ВКМ пацюка в бластоцисту миші химерні бластоцисти були пересаджені в матку миші, де вони розвивалися до 30 пар сомітів (Gardner R. G., Johnson M., 1973). У подальших дослідках ці автори отримали всі химерні ембріони до середини вагітності й декілька - до народження. Результати досліджень показали вирішальну роль у виживанні ембріонів сумісності трофобласта і матки.

Створення химер сільськогосподарських тварин. Успіхи, досягнуті в розробці методів створення химерних лабораторних ссавців, дозволили практично підійти до створення химер сільськогосподарських тварин. На початку 80-х років була спроба одержання химерних телят від корів *Bos taurus* і *Bos indicus*. У цих експериментах використовували агрегаційний метод, тобто ранні ембріони, що були на стадії морули, обробляли проназою, видаляли *in vitro* прозору оболонку і змішаний агрегат бластомерів культивували *in vitro*. Пересаджені коровам-реципієнтам химерні морули гинули (Sammer P.M. et al., 1983). Автори довели, що метод агрегації неприйнятний для одержання химерних тварин великої рогатої худоби, тому що важко видалити 5-процентною проназою зону пеллюциду. Крім того, ще немає надійного середовища для культивування *in vitro* 8-12-клітинних змішаних агрегатів бластомерів.

Із цих причин дослідники застосували ін'єкційний метод, увівши ВКМ бластоцисти донора в бластоціль реципієнтного ембріона. Ін'єкцію ВКМ робили за описаною раніше методикою R. Gardnera (1968). Ембріони культивували у фізіологічному розчині Дульбекко з буферним фосфатом і добавками біологічно активних речовин.

Внаслідок ін'єкції від 1 до 6 клітин 7-денних ембріонів виду *Bos taurus* у бластоциль виду *Bos indicus* народилося 7 телят, серед яких одне (SV 29) був ідентифіковано як химерне чотирьох батьків. Фенотипово воно не відрізнялося від однолітків, але за еритроцитарного типірування в нього було виявлено еритроцитарний антиген, типовий для *Bos taurus*. Автори припускають, що химеризм міг би бути й в інших телят, однак через відсутність відповідних маркерів їм не вдалося точно встановити цей факт.

Останнім часом були отримані міжвидові химери між вівцею і козою, яких назвали вівцекозами. Відомо, що вівця ($2n = 54$) і коза ($2n = 60$) не належать до близьких видів і між собою не схрещуються. Уперше таких химерних тварин вивели в 1984 р. у Великобританії (Fehilly C. et al., 1984) і у ФРН (Meinecke-Tillmans, Meinecke B., 1984).

C. Fehilly зі співробітниками для одержання міжвидових химер між вівцею і козою застосовували агрегаційний та ін'єкційний методи і реципрокні пересадження. Агрегаційним методом було отримано 6, а ін'єкційним методом 2 химери. Шерсть у таких тварин являла собою суміш вихідних видів, роги за будовою були як у кози, але закручені як у барана, проте екстер'єр відповідав одному із батьківських видів. Таким чином, у химер спостерігали мозаїчність тільки волосяного покриву. Цікавим є факт народження ягняти від кози й цапеняти від вівці. Ці так звані однокомпонентні тварини розвивалися з ін'єкційних химер.

У досліді S. Meinecke-Tillman і В. Meinecke були отримані лише агрегаційні химери. Агрегація зародків відбувалася на стадії 8-12 бластомерів. Химерні бластоцисти пересаджували в матку вівці. З 15 трансплантованих ембріонів народилося два ягняти і одне цапеня, але аналіз крові не виявив химеризму. Однак, як і в першому досліді, вівця була здатною виносити цапеня. За припущенням авторів, відсутність імунологічної реакції обумовлено наявністю в плаценті агрегованого зародка клітин овечого генотипу.

У США в Каліфорнійському університеті від ін'єкції ВКМ бластоцисти кіз у бластоцисту овець було отримано овечо-козячі химери (Polzir V. et al., 1987). Двадцять дві химерні бластоцисти хірургічно трансплантували 12 вівцям-реципієнтам. Від 9 суягних овець було отримано 13 нащадків. За електрофоретичним аналізом крові і каріотипом десять тварин віднесли до вівці, одну - до кози і дві - до міжвидових овечо-козячих химер.

У 1987 р. в університеті штату Каліфорнія США за ін'єкційним

методом отримано міжпородні химери вівці - між породами рамбульє і фінський ландрас. З 36 отриманих ягнят у 16 за методом аналізу груп крові і каріотипу було підтверджено химерізм.

У 1982 р. у ФРН ін'єкція хромосомально маркірованих клітин бластоцисти в нормальну бластоцисту великої рогатої худоби і наступне пересадження корові-реципієнтові химерної зиготи призвели до народження химерної телички (Stranziger G., 1986). Чотири батьки, реципієнт і химерна теличка були досліджені цитогенетичними і біохімічними методами. У цієї телички за рядом ознак установлений химерізм. Автори довели ефективність ін'єкційного методу.

Пізніше у ФРН (1985) було отримано химерних телят після агрегації половинок 32-клітинних ембріонів від корів контрастних порід – швицької (бурої) і голштино-фризської. Із семи народжених телят у п'яти були відсутні ознаки химерізму, а в двох у фенотипі поєднувалася характерна масть вихідних порід – бура і чорно-строката.

У колишньому Радянському Союзі ін'єкційним методом виведено химерний бичок від чорно-рябої і червоної порід, що у фенотипі поєднує чорно-рябу масть із червоними плямами.

Таким чином, проведені експерименти показали можливість одержання химер (генетичних мозаїків) у тваринництві.

Химерні тварини не передають нащадкам характерну для них генетичну мозаїчність. Подібно гетерозиготним або гібридним тваринам у нащадків відбувається розщеплення, внаслідок чого порушуються цінні генетичні комбінації. Хоча химерні тварини підтримують господарсько-важливі ознаки лише протягом одного покоління, у розведенні великої рогатої худоби вони можуть викликати великий практичний інтерес. Наприклад, можна створити химерних тварин, що поєднують такі ознаки, як молочна і м'ясна продуктивність, що є антагоністами і несумісні в одному організмі. Створення ін'єкційних химер шляхом введення в ембріон певних ліній клітин дозволить поліпшити імунну систему і підвищити резистентність до ряду хвороб.

Метод одержання експериментальних химер становить великий інтерес для створення ліній (клонів) тварин шляхом партеногенезу. Ембріони ссавців, що розвиваються з партеногенетично активованих яйцеклітин, як показано, гинуть. Однак, за агрегації з біологічно повноцінними ембріонами клітини ранніх партеногенетичних

зародків впливають на побудову тканин химерної тварини. Якщо з партеногенетичних клонів клітин будуть формуватися гамети химерної особини, то її генотип можлив закріпити в наступному поколінні.

Важливою особливістю химерних ембріонів є те, що вони підтримують життєздатність клітин зародків летальних генотипів. Наприклад, химери, отримані від нормальних і нежиттєздатних зародків-трисомиків за хромосомами 17, 15 і 12, нормально розвивалися і давали потомство, що не має трисомиків. Химерні ембріони становлять великий інтерес для вивчення можливості розробки методів клонування дорослих тварин шляхом партеногенезу. Доведено, що пересадження мишам і великій рогатій худобі химерних ембріонів, які складаються з клітин звичайних (отриманих у результаті запліднення) і диплоїдних гомозиготних гіногенетичних зародків, призвело до народження живого потомства, органи і тканини якого походили як від звичайних, так і партеногенетичних бластомерів. Наступні експерименти підтвердили участь партеногенетичних клітин химерних зародків миші в розвитку ембріона. Отже, для завершення ембріонального розвитку наявність материнських і батьківських хромосом у кожному бластомері не обов'язкова. Для завершення ембріогенезу і народження химерного потомства миші може бути достатньою одна клітина 8-бластомерного звичайного ембріона, агрегованого з 4-бластомерним партеногеноном. Дослідження тканин химерних мишей показало, що всі клітини, що створилися від гаплоїдних партеногенонів, мали диплоїдний набір хромосом. Гаплоїдного набору не достатньо для проліферації клітин, тому виживають лише диплоїдизовані клітини. Виходячи з вищевикладеного, робимо висновок, що клонування тварин-донорів ооцитів шляхом трансплантації реципієнтам химерних зародків, які складаються з клітин звичайних і амейотичних партеногенетичних ембріонів становить великий інтерес. Такий химерний ембріон може бути отриманий методами мікроманіпуляцій шляхом заміни клітин ВКМ звичайної бластоцисти на ВКМ бластоцисти партеногенетичного походження, тобто химерна бластоциста буде складатися з клітин ТЕ звичайної бластоцисти і ВКМ бластоцисти-партеногенона. Наявність батьківських хромосом у трофктодермі химерної бластоцисти, ймовірно, забезпечить імплантацію і формування позазародкових тканин, а можливо, і розвиток ембріона з генотипом партеногенона.

Одержання тварин з бажаними якостями іншим шляхом може стати пересадження химерних ембріонів, що складаються з клітин різновікових партеногенетичних і звичайних зародків. Дослідження показали, що для одержання химерних телят не обов'язково використання одновікових ембріонів. Агрегація ізольованої імунохірургічним способом внутрішньої клітинної маси 8- і 10-денних ембріонів або шляхом розрізу внутрішньої клітинної маси 14-денних ембріонів великої рогатої худоби з 5,5-денними морулами відбувалася в 89, 62 і 0% випадків, відповідно. Трансплантація 8 агрегованих ембріонів, що складаються з клітин 5,5- й 8-денних ембріонів, і 11 ембріонів, що складаються з клітин 5,5- і 10-денних ембріонів, призвела до народження шести і чотирьох телят, відповідно. У першому випадку п'ять з шести телят виявилися химерами, причому з фенотипом, здебільшого характерним для ізольованих клітин внутрішньої клітинної маси.

У даний час обговорюються можливості використання химерних ембріонів за розробки нових підходів до клонування зародків з використанням ембріональних стовбурових клітин (ЕСК). Так, для мишей показана принципова можливість одержання живих нащадків, що повністю утворюються з ЕСК, шляхом введення 12-15 ЕСК у порожнину бластоцист із вилученої власної ВКМ. Однак, ці мишенята відрізнялися зниженою життєздатністю і загинули незабаром після народження.

Нові можливості в селекції тварин відкриваються з використанням у дослідах за одержання трансгенних тварин бластоцист, у порожнину яких ін'єктовано генетично трансформовані ембріональні стовбурові клітини. Пересадження таких химерних бластоцист може призвести до народження химерних тварин, у яких частина клітин різних органів, у тому числі гонад, буде походити від ембріональних стовбурних клітин. В останньому випадку частина потомства може виявитися трансгенною. Вважається, що такий метод одержання трансгенних тварин є більш ефективним, ніж ін'єкція ДНК (чужорідної ДНК) у чоловічий пронуклеус, тому що дозволяє оцінити трансформацію генома ЕСК до їх введення в ембріон.

Використання химерних ембріонів може розширити можливості дослідників у вирішенні ряду фундаментальних проблем біології розвитку.

Література

1. Акушерство, гинекология и искусственное осеменение сельскохозяйственных животных / [И. А. Бочаров, А. В. Бесхлебнов, И. Ф. Заянчковский и др.]. – Л. : Колос, 1967. – 245 с.
2. Ветеринарное акушерство и гинекология / А. П. Студенцов, В. С. Шипилов, Л. Г. Субботина, О. Н. Преображенский. – М. : Агропромиздат, 1986. – 480 с.
3. Генетика, селекция и биотехнология в скотоводстве / [М. В. Зубец, В. П. Буркат, Ю. Ф. Мельник и др.]; под ред. М. В.Зубца. – К. : БМТ, 1997. – 722 с.
4. Герасименко В. Г. Биотехнология / В. Г.Герасименко. – К. : Вища шк., 1989. – 343с.
5. Гончаров В. П. Справочник по акушерству и гинекологии животных / В. П. Гончаров, В. А. Карпов. – М. : Россельхозиздат, 1985. – 255 с.
6. Завертяев В. П. Биотехнология в воспроизводстве и селекции крупного рогатого скота / В. П. Завертяев. – Л. : Агропромиздат, 1989. – 255 с.
7. Квасницкий А. В. Трансплантация эмбрионов и генетическая инженерия в животноводстве / А. В. Квасницкий, Н. А. Мартыненко, А. Г. Близнюченко. – К.. : Урожай, 1988. – 260 с.
8. Коваленко В. П. Біотехнологія у тваринництві й генетиці / В. П. Коваленко, И. Ю. Горбатенко. – К.. : Урожай, 1992. – 150 с.
9. Осташко Ф. И. Биотехнология воспроизведения крупного рогатого скота / Ф. И. Осташко. – К. : Аграрная наука, 1995. – 183 с.
10. Практикум по акушерству, гинекологии и искусственному осеменению сельскохозяйственных животных / В. С. Шипилов, Г. В. Зверева, И. И. Родин, В. Я. Никитин. – М. : Агропромиздат, 1988. – 535 с.
11. Практикум по ветеринарному акушерству, гинекологии и искусственному осеменению сельскохозяйственных животных / [О. Г. Бахтов, Г. В. Паршутин, И. И. Родин и др.]. – М. : Колос, 1965. – 180 с.
12. Юлевич О.І. Біотехнологія : навчальний посібник / О.І. Юлевич, С.І. Ковтун, М.І. Гиль ; за ред. М.І. Гиль. – Миколаїв : МДАУ, 2012. – 476 с.
13. Яблонский В. А. Трансплантация эмбрионов у сельскохозяйственных животных / В. А. Яблонский. – Кишинёв, 1988. – 96 с.
14. Яблонський В. А. Біотехнологічні і молекулярно-генетичні основи відтворення тварин / В. А. Яблонський. – Львів : Афіша, 2009. – 217 с.
15. Яблонський В. А. Біотехнологія відтворення тварин / В. А. Яблонський. – К. : Арістей, 2005. – 293 с.
16. Яблонський В. А. Практичне акушерство, гінекологія та біотехнологія відтворення тварин з основами андрології / В. А. Яблонський. – К. : Мета, 2002. – 317 с.
17. Яблонський В. А. Практичне акушерство, гінекологія та штучне осіменіння сільськогосподарських тварин / В. А. Яблонський – К. : Урожай, 1995. – 286 с.

Навчальне видання

Мельник Володимир Олександрович
Кравченко Олена Олександрівна

АКУШЕРСТВО, ГІНЕКОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ
ВІДТВОРЕННЯ ТВАРИН

Конспект лекцій

Відповідальний за випуск: С. П. Кот

Формат 60×84 1/16 Ум. друк. арк. 8,75
Тираж 20 прим. Зам № _____

Надруковано у видавничому відділі
Миколаївського національного аграрного університету.
54020, м. Миколаїв, вул. Георгія Гонгадзе, 9
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 4490 від 20.02.2013 р.