МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
МИКОЛАЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Факультет технології виробництва і переробки продукції тваринництва, стандартизації та біотехнології

Кафедра біотехнології та біоінженерії

ОСНОВИ БІОТЕХНОЛОГІЇ ТВАРИН

методичні рекомендації для виконання лабораторно-практичних та самостійних робіт для здобувачів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти ОПП «Біотехнології та біоінженерія» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» денної форми здобуття вищої освіти



Миколаїв
2026

УДК 606:636
О-75

Друкується за рішенням науково-методичної комісії факультету ТВППТСБ Миколаївського національного аграрного університету від 14.10.2026 р., протокол № 2.

Укладачі:

О. І. Каратєєва – кандидатка с.-г. наук, доцентка, в.о. завідувачки кафедри біотехнології та біоінженерії, Миколаївський національний аграрний університет

І. М. Люта – асистентка кафедри біотехнології та біоінженерії, Миколаївський національний аграрний університет

Рецензенти:

С. І. Ковтун – докторка с.-г. наук, професорка, академік НААН, перший заступник директора з наукової роботи Інституту розведення і генетики тварин ім. М.В. Зубця НААН

О. І. Юлевич – канд. тех. наук, доцентка, доцентка кафедри біотехнології та біоінженерії Миколаївського національного аграрного університету

© Миколаївський національний аграрний університет, 2026

ЗМІСТ

Тема 1. Правила техніки безпеки при роботі в лабораторії біотехнології тварин 6
Тема 2. Обладнання лабораторії біотехнології тварин 7
Тема 3. Лабораторний інвентар 14
Тема 4. Правила роботи з лабораторним інвентарем 20
Тема 5. Будова статевих клітин 27
Тема 6. Штучне осіменіння сільськогосподарських тварин 30
Тема 7. Методи вилучення ембріонів 40
Тема 8. Пошук та оцінка ембріонів 44
Тема 9. Мікрохірургічне ділення, кріоконсервація ембріонів та пересадка реципієнтам 50
Тема 10. Клонування тварин 56
Тема 11. Одержання химерних тварин 62
Тема 12. Одержання трансгенних тварин 65
Рекомендована література 70

ТЕМА 1. ПРАВИЛА ТЕХНІКИ БЕЗПЕКИ ПРИ РОБОТІ В ЛАБОРАТОРІЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ ТВАРИН

Мета заняття: ознайомитися з основними правилами техніки безпеки під час роботи в лабораторії біотехнології тварин та навчитися безпечно поводитися з лабораторним обладнанням і матеріалами.

Робота у лабораторії біотехнології тварин пов'язана з використанням шкідливих горючих (далі ГР), пожежно-небезпечних, легкозаймистих (далі ЛЗР), токсичних речовин у газоподібному, рідкому або твердому стані. При виконанні лабораторних робіт використовуються електронагрівальні та вимірювальні прилади.

Під час роботи в лабораторії необхідно суворо дотримуватися таких загальних правил техніки безпеки:

1. Слідкувати за тим, щоб на всіх банках з реактивами були етикетки з ясним написом вмісту. Не залишати в лабораторному посуді розчинів будь якої речовини без відповідного напису спеціальним олівцем для скла. Не кидати осколків побитого посуду в раковину. Не залишати пустий посуд немитим. Не класти скляний посуд у шухляди разом з металевими предметами. Не пробувати хімічні речовини на смак. Не визначати хімічні речовини за запахом. Тримати робочий стіл чистим (все, що пролите, просипане або розбите має бути негайно прибрано). Лабораторні столи та підлоги забороняється промивати бензином та іншими рідинами, які легко займаються. Не захаращувати робочий стіл посудом, банками з реактивами та іншими речами. Не класти на робочий стіл їжу. Не розігрівати в лабораторному посуді чай. Не приймати їжу в приміщенні лабораторної кімнати.

2. Під час роботи з реактивами у витяжній шафі не вводити голову всередину шафи, не працювати в приміщенні лабораторії наодинці. Не захаращувати проходи, виходи, підходи до протипожежного інвентарю.

3. Під час переливання кислот, лугів та інших небезпечних рідин, а також при подрібненні твердих речовин вручну здійснювати роботу в захисних окулярах з оправою, яка щільно прилягає до обличчя.

4. Перед пуском в роботу того чи іншого лабораторного апарата ретельно перевіряти його технічний стан і лише після усунення всіх дефектів, що будуть виявлені, вмикати апарат. Усі електронагрівальні прилади обов'язково установлювати на листовому азбесті товщиною 8-10 мм.

5. Скляні посудини, в котрих можливо утворення пару чи газу, захищати металевими сітками або екранами для попередження розлітання осколків при

вибуху. Не вносити шпаристі порошкові тіла (пемза, активоване вугілля) в рідини, що нагріті більше 100°С, – для запобігання бурхливого закипання і викидання гарячої суміші.

6. Відпрацьовані ефіри, бромкислоти, хлористий бензол та інші речовини, що різко пахнуть, виливати у ті раковини, над котрими є витяжна шафа. Необхідні мінімальні запаси (кріпких димучих кислот), а також речовини, що легко випаровуються, пахучих (ацетон, бром, ефіри та ін.) зберігати в скляному посуді з добре притертими пробками у витяжній шафі, котра зачиняється герметично.

7. У випадку припинення дії вентиляції всі роботи, пов’язані з виділенням шкідливих речовин, газів і парів, негайно припинити.

8. Виходячи з лабораторії, не залишати ввімкнених нагрівальних приладів, пальників, що горять, відчинених газових кранів. В лабораторії, як правило, приходиться працювати з різними їдкими, отруйними для здоров’я речовинами. Невміле та недбале поводження з ними може призвести до нещасних випадків з тяжкими наслідками.

9. Під час роботи з розчинами кислот і лугів необхідно застосовувати герметичні окуляри з гумовою оправою або маскою від протигазу, фартухом з прогумованої тканини, гумовими рукавичками і нарукавниками.

10. Розколювати тверді куски їдкого калію, їдкого натрію слід, загорнувши у ганчірку або декілька шарів паперу. При цьому треба надягати захисні окуляри або гумові рукавички.

11. Відпрацьовані кислоти, луги не можна зливати в одну посудину, бо при цьому відбувається нейтралізація, яка супроводжується розігрівом і сильним випаровуванням. Для кислот, лугів треба мати окремі скляні або глиняні банки, після роботи здійснюється нейтралізація, і вміст банок виливають у спеціальні ями або каналізацію через раковину, промиваючи її потім не менш як 10-кратною кількістю води.

12. Роботу з газоподібними отруйними речовинами (бензолом, хлором тощо) треба обов’язково проводити у витяжній шафі, при цьому треба мати протигаз на випадок аварії. Роботи, пов’язані із застосуванням отруйних рідин, також треба проводити під витяжкою, при цьому працювати в гумових рукавичках, а після роботи, не знімаючи рукавичок, треба добре промити їх водою з милом і тільки після цього зняти. Знявши рукавички, треба ретельно вимити руки.

13. Слід стерегтися потрапляння токсичних рідин на одяг. У випадку пролиття отруйних рідин на одяг, його треба негайно зняти, обполоскати або попрати. Якщо рідина потрапила на тіло, то ці місця необхідно ретельно

вимити спочатку без мила, а потім з милом. Уходити до дому в змоченому отруйною рідиною одязі забороняється.

14. Цілком неприпустимо визначати невідому отруйну хімічну речовину по запаху або смаку. По закінченні роботи з отруйними речовинами треба негайно ретельно прополоскати водою посуд, який звільнився, і тільки після цього передати його для спеціального миття.

15. Під час роботи в лабораторіях необхідно пам’ятати про можливість утворення вибухонебезпечних сумішей парів газів і пилу з повітрям. Для безпечної роботи при застосуванні вибухонебезпечних речовин треба підтримувати такий режим, при котрому концентрації були б вище верхньої або нижче нижньої межі вибуху.

16. В приміщеннях лабораторій необхідно додержуватись протипожежних правил.

17. Для надання першої допомоги при нещасному випадку необхідно, щоб в лабораторії була в наявності аптечка з медикаментами, перев’язувальними засобами.

18. В лабораторіях не можна зберігати рідини, які легко займаються, у кількості, що перевищує добову потребу. Якщо добова потреба вище 0,5 літра, треба зберігати у залізних шафах.

Завдання 1. Заповнити таблицю. Який засіб захисту потрібен при кожній лабораторній операції?

Робоча операція	Небезпека	Засоби індивідуального захисту	Додаткові заходи безпеки
Робота з кислотами			
Робота з лугами			
Робота з леткими речовинами			
Подрібнення твердих речовин			
Робота зі скляним посудом			
Робота з електрообладнанням			
Робота з біологічним матеріалом			

Завдання 2. На лабораторному столі випадково перекинулася ємність із хімічним реактивом. Розташуйте наведені дії у правильній послідовності (від 1 до 8), сформувавши алгоритм дій працівника лабораторії:

повідомити відповідальну особу про аварійну ситуацію;

провести очищення та знезараження забрудненої поверхні;

припинити виконання роботи;

використати необхідні засоби індивідуального захисту;

оцінити характер і рівень небезпеки розлитої речовини;

зібрати та утилізувати забруднені матеріали відповідно до встановлених вимог;

попередити людей, які перебувають поблизу, про небезпеку;

локалізувати розлив та прибрати реактив відповідно до встановленої процедури.

Завдання 3. Для кожної ситуації визначити: «дозволено» / «заборонено» / «можна лише за спеціальних умов». Кожну відповідь обґрунтувати одним реченням.

Визначати невідому речовину за запахом.

Працювати з леткими речовинами у витяжній шафі.

Зберігати реактив у ємності без етикетки.

Приймати їжу в лабораторії.

Переливати кислоту без засобів захисту очей.

Залишати увімкнений нагрівальний прилад після завершення роботи.

Працювати з невідомим розчином.

Зберігати реактиви в герметично закритому та промаркованому посуді.

Залишати робоче місце забрудненим після завершення роботи.

Працювати з небезпечними речовинами без належної вентиляції.

ТЕМА 2. ОБЛАДНАННЯ ЛАБОРАТОРІЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ ТВАРИН

Мета заняття: ознайомитися із обладнанням лабораторії біотехнології тварин

Обладнання та прилади, наявні в лабораторії біотехнології тварин, залежно від мети призначення, поділяють на два класи: загальні та спеціальні. Перші є у всіх лабораторіях, другі – строго спеціалізовані.

До приладів **загального призначення** відносять:

1. Дистилятор – прилад, що дозволяє отримувати дистильовану воду (рис. 1). Ця вода майже не містить неорганічних і органічних речовин. Її отримують шляхом перегонки водопровідної води. Воду перетворюють на пар і конденсують. Таку воду застосовують для приготування розчинів, ополіскування посуду після миття і т. ін.



Рис. 1. **Дистилятор**

2. Термостат – прилад, що дозволяє підтримувати температуру на одному рівні. Термостати бувають рідинні і повітряні. Для перших теплоносієм є вода, для других – повітря (рис. 2, 3). Для біотехнологічних робіт застосовують повітряні термостати з електричним обігрівом, забезпечені терморегулятором і термометром.



Рис. 2. **Термостат сухоповітряний ТВЛ-К120**



Рис. 3. **Термостат рідинний циркуляційний LOIP LT-105a**

3. Електрична сушильна шафа – прилад, що дозволяє сушити посуд гарячим повітрям. Живлення нагрівальних елементів здійснюється від

електромережі. Максимальна температура, яка може бути досягнута всередині шафи, становить близько 125-250°С. Час розігрівання – 30-60 хв. (рис. 4).



Рис. 4. **Шафа сушильна ШС-0,25-20-М**

4. Автоклав – прилад, в якому проводиться стерилізація парою під тиском (рис. 5). Автоклав – це металевий казан з подвійними стінками. Простір між зовнішньою і внутрішньою стінкою під кришкою автоклава сполучається з простором усередині котла.



Рис. 5. **Автоклав**

Через воронку водомірного скла між стінками автоклава заливається вода до рівня, який зазначається на водомірному склі. Всередину автоклава укладають бікси, наповнені предметами, що стерилізуються, кришку автоклава щільно закривають і пригвинчують гвинтами. При кипінні вода випаровується, пар заповнює весь простір в автоклаві. Оскільки виходу для пару немає, в автоклаві починає підвищуватися тиск і температура. Вони швидко досягають рівня, при якому життя мікробів неможливе. Тиск і температура всередині

автоклава визначаються за манометром, встановленим на бічній стінці автоклава.

5. Баня водяна електрична – прилад, який використовується для нагрівання (рис. 6). Водяні бані застосовують тільки в тих випадках, коли потрібно нагрівання не вище 100°С. Бані закриваються зверху рядом концентричних кілець, що налягають одне на інше.



Рис. 6. **Водяна баня LOIP LB-140**

Нагрівання на водяній бані можна проводити двома способами:

- посуд, що обігрівається занурюють в киплячу воду – в цьому випадку температура нагріву досягає 100°С;
- посуд, що обігрівається не торкається води і нагрівається лише водяною парою, температура нагріву на кілька градусів нижче 100°С.

В баню наливають воду так, щоб до країв залишалося 2-3 см. Посуд, що нагрівається поміщають на кільце такого діаметру, щоб своєю нижньою частиною він перебував на 1,5-2,0 см всередині бані.

6. Холодильник – використовують для зберігання медикаментів, розчинів і поживних середовищ.

Спеціальним обладнанням лабораторії є: мікроскопи – інвертований і бінокулярний стереоскопічний (серії МБС); термостат-інкубатор; заморожуючий пристрій і посудина Дьюара, мікроманіпулятор з мікрокузнею і багато іншого:

7. Посудина Дьюара – посудина з хорошою теплоізоляцією і призначена для тривалого зберігання речовин при високих або низьких температурах. Посудина Дьюара була названа на честь її винахідника, шотландського фізика сера Джеймса Дьюара (1842–1923). Посудина Дьюара використовується для зберігання кріорідин, найчастіше рідкого азоту. У медицині, ветеринарії та біотехнології спеціальні посудини Дьюара використовуються для тривалого зберігання біологічних матеріалів при низьких температурах (рис. 7).



Рис. 7. **Схема будови та зовнішній вигляд посудини Дьюара**

8. Ламінарний бокс – це пристрій, завдяки якому забезпечується повна ізоляція і стерильність при роботі з гаметами і ембріонами.

Конструкція ламінарного боксу заснована на тому, що поверхня столу ізольована скляним «ковпаком», а всередині зосереджені необхідні прилади. Обов'язковим внутрішнім атрибутом даного столу є інвертований мікроскоп і мікроманіпулятор, за допомогою яких виконують різні мікроклітинні маніпуляції з ембріонами або гаметами тварин. (рис. 8).

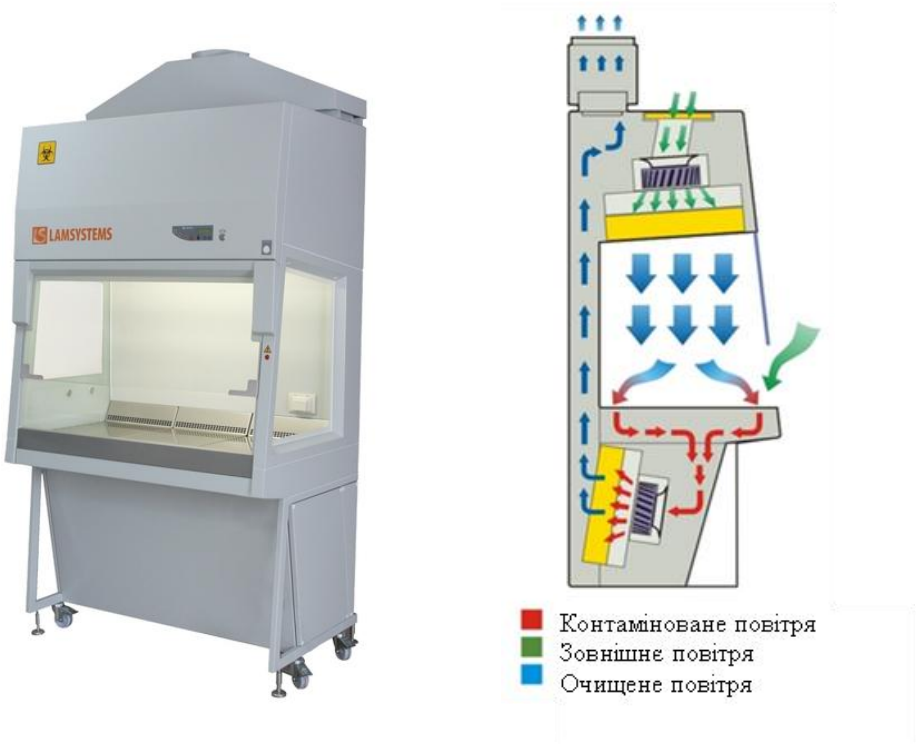


Рис. 8. **Ламінарний бокс та схема повітряних потоків у ньому**

У ембріокультуральних дослідженнях застосовують також ламінарні бокси, призначені для приготування поживних середовищ. При цьому ламінарний бокс першого типу не повинен перебувати в одному приміщенні з ламінарним боксом другого типу.

9. **Мікрокузня** – це прилад, призначений для виготовлення мікроінструментів (рис. 9). Мікроінструменти виготовляються зі скляних гачків, голок і капілярів із застосуванням спиртового пальника (спиртівки).



Рис. 9. **Мікрокузня**

10. **Термостат-інкубатор** (CO_2 інкубатор) – прилад, призначений для культивування гамет і ембріонів і створення гаметам умов для успішного запліднення. Даний інкубатор розрахований на 37,0-37,5°С (± 2°С) і містить 5% CO_2 в повітрі. Система контролю концентрації CO_2 зазвичай входить в конструкцію інкубатора.

Завдяки такому термостату в умовах *in vitro* ембріони і гамети отримують все необхідне для повноцінного розвитку в «культурі» (рис. 10).



Рис. 10. **CO_2-інкубатор HCP-258, Haier**

11. **Мікроскоп серії МБС** – прилад, призначений для ембріокультуральних досліджень (оцінка, селекція і відбір ембріонів).

12. **Мікроманіпуляційна система** – обладнання, призначене для клітинних технологій.

Мікроманіпулятори – технічні пристрої, що дозволяють робити різні дії (забір або впровадження, переміщення) з такими мікрооб'єктами, як окремі ядра клітин, клітини групи клітин (рис. 11).



Рис. 11. **Мікроманіпулятор**

Мікроін'єктор по суті є пристроєм, який може ін'єктувати або аспірувати рідини та об'єкти, розмір яких менший за діаметр мікрокапіляра.

Залежно від особливостей пристрою виділяють такі типи мікроін'єкторів:

- електропневматичні, що мають можливість синхронізації з мікроманіпулятором, призначені лише для введення розчинів об'ємом у декілька нанолітрів;
- механічні пневматичні для грубих маніпуляцій (фіксація клітин);
- механічні гідравлічні для більш делікатного введення або вилучення об'єктів та розчинів.

Найчастіше для полегшення проникнення капіляра в клітину або відділення однієї клітини від культури або тканини використовуються допоміжні пристрої – мікродиссектри або мікроперфоратори. Ці пристрої дозволяють зробити «надріз» або «отвір» у клітинній стінці з мінімальним пошкодженням вмісту клітини.

Обов'язковою умовою використання мікроманіпулятора та мікроін'єктора є наявність мікроскопа (прямого, інвертованого або стерео).

Завдання 1. Встановіть відповідність між назвою обладнання та його

основним призначенням.

Обладнання	Призначення
1. Дистилятор	А. Культивування гамет та ембріонів
2. Автоклав	Б. Отримання дистильованої води
3. CO_2-інкубатор	В. Стерилізація парою під тиском
4. Посудина Дьюара	Г. Зберігання біологічного матеріалу при низьких температурах
5. Мікроманіпулятор	Д. Виконання маніпуляцій з мікрооб'єктами
6. Водяна баня	Е. Контрольоване нагрівання
7. Сушильна шафа	Є. Сушіння лабораторного посуду

Завдання 2. Для одного із запропонованих приладів заповнити таблицю:

Характеристика	Відомості
Назва обладнання	
Тип загальне / спеціальне	
Призначення	
Принцип дії	
Основні робочі параметри	
Об'єкти роботи	
Використання у біотехнології тварин	
Потенційні небезпеки	
Основні правила експлуатації	

Прилади для вибору: автоклав, ламінарний бокс, CO_2-інкубатор, посудина Дьюара, мікроманіпулятор, термостат, мікроскоп МБС.

Завдання 3. Під час роботи з посудиною Дьюара студент помітив пошкодження її зовнішньої поверхні. Необхідно: визначити потенційні небезпеки; визначити, чи можна продовжувати роботу; запропонувати правильний алгоритм дій.

ТЕМА 3. ЛАБОРАТОРНИЙ ІНВЕНТАР

Мета заняття: ознайомитися із інвентарем лабораторії біотехнології тварин.

В лабораторії біотехнології тварин до лабораторного інвентарю можна віднести скляний посуд, гінекологічні інструменти, хірургічні інструменти і хірургічну білизну. Сучасний лабораторний інвентар (посуд, інструменти,

білизна) дуже різноманітний. У цьому розділі розглядається тільки той інвентар, який найбільш часто застосовується в навчальному процесі при постановці біотехнологічних досліджень на тваринах.

1. Лабораторний скляний посуд

Скляний посуд, що застосовується в лабораторії, залежно від призначення, ділять на: 1) загальний, 2) спеціальний і 3) мірний.

До групи *загального призначення* відносяться ті предмети, які завжди повинні бути в лабораторії і без яких не можна провести більшість робіт.

До них відносять:

1. **Пробірки** – це вузькі циліндричної форми посудини з заокругленим дном; вони бувають різної величини і діаметра. Їх використовують в різних маніпуляціях при ембріокультуральних дослідженнях. Зберігаються в штативах.

2. **Чашки Петрі** – це круглі плоскодонні чашки, використовуються для збору ембріонів, фолікулів і сперматозоїдів. Це необхідний атрибут при культивуванні і екстракорпоральному запліднені.

3. **Лабораторні склянки і конічні колби** – тонкостінні циліндри різної ємності, широко застосовуються в роботах, пов’язаних з приготуванням середовищ.

4. **Предметні і покривні скла** – плоскі прямокутної форми скляні предмети, необхідні для проведення робіт з клітинної селекції.

До групи *спеціального призначення* відносяться ті предмети які вживаються для однієї якої-небудь мети. До них відносять:

5. **Спермоприймач** – це скляний двостінний дзвоноподібний з циліндричною колбою на кінці посуд, який використовується для отримання сперми.

6. **Скляні гачки, голки, капіляри, які мають мікроскопічні розміри** і виготовляються на спеціальних пристроях – «мікрокузнях». Широко застосовуються в різних мікрохірургічних маніпуляціях для здійснення механічного впливу на клітини.

7. **Скляні піпетки**, необхідні для перенесення ембріонів при ембріокультуральних дослідженнях.

Мірний посуд, необхідний для вимірювання об’єму рідини. До нього відносять:

8. **Мірні циліндри і мензурки** – це скляні посудини циліндричної або конічної форми, на стінці яких є шкала розподілу. Вони необхідні при роботах, пов’язаних з ембріокультуральними дослідженнями, штучним осіменінням та трансплантацією ембріонів.

9. **Піпетки і мікропіпетки** – використовують для відмірювання малої кількості рідин, ємністю 1, 2, 3, 4 і 5 мл.

2. Гінекологічний інструментарій

Необхідний при роботах пов'язаних з біотехнологією відтворення сільськогосподарських тварин.

До найбільш часто використовуваних інструментів відносять:

1) **піхвове дзеркало**, призначене для дослідження піхви і піхвової частини шийки матки (рис. 12);



Рис. 12. **Піхвове дзеркало**

2) катетери різних конструкцій, які використовуються при штучному запліднені і трансплантації ембріонів.

3. Хірургічний інструментарій

До інструментів, що найбільш часто використовуються при трансплантації ембріонів хірургічним способом відносять:

1) черевцевий скальпель, який призначений для поверхневого неглибокого розрізу (рис. 13);



Рис. 13. **Скальпелі**

2) ножиці прямі загострені і ножиці Купера – застосовують для роз'єднання тканин (рис. 14);



Рис. 14. **Хірургічні ножиці**

3) затискач Кохера, затискач «москіт» – це кровоспинні затискачі (рис. 15);



Рис. 15. **Зажим кровоспинний типу «Москіт», вигнутий по ребру**

Кровоспинний затискач Кохера має зубці на кінці. При змиканні один зуб входить в проміжок між двома зубцями, забезпечуючи міцну фіксацію на кінці судини (рис. 16).

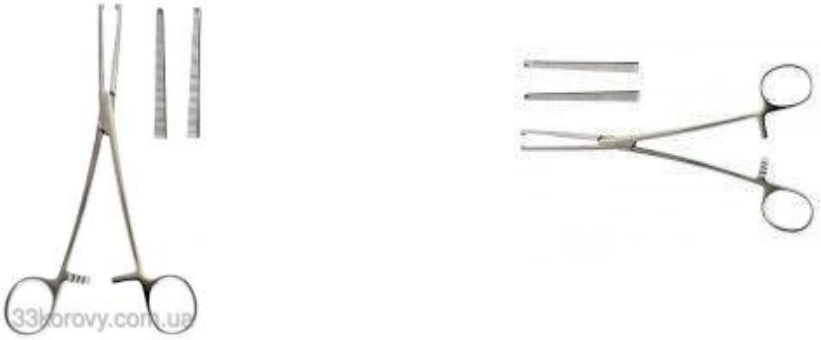


Рис. 16. **Зажим Кохера прямий кровоспинний**

4) пінцет хірургічний і анатомічний застосовують для захоплення тканин, утримання їх у зручному для зшивання або розділення положенні (рис. 17);



Рис. 17. **Пінцет хірургічний і анатомічний**

5) цапка для білизни, необхідна для фіксації простирадла (або серветки) з отвором на операційному полі тіла тварини (рис. 18);



Рис. 18. **Цапка для білизни**

6) гачок чотирьохзубчатий гострий і тупий (рис. 19), ранорозширювач Микулича – з їх допомогою здійснюють розширення ран і утримання їх в потрібному стані;



Рис. 19. **Гачок чотирьохзубчатий гострий і тупий**

7) вигнута або напівкругла хірургічна голка необхідна для закриття операційних ран шкіри з метою відновлення їх цілості і створення умов для сприятливого перебігу процесу загоєння; завдяки голці шовний матеріал (кетгут) проводять через тканини (рис. 20);



Рис. 20. **Хірургічні голки**

8) шприци місткістю 5, 10 мл застосовують для введення рідких форм лікарських речовин або біологічних препаратів в товщу тканин або порожнини організму;

9) шприци об’ємом 20 мл застосовують для промивання геніталій з метою вимивання ембріонів;

10) голки ін’єкційні різної довжини і діаметра до шприців.

4. Хірургічна білизна

При використанні хірургічного методу трансплантації ембріонів необхідна також наявність хірургічної білизни, це:

1) простирадла розміром 50×50 з отвором посередині, призначені для покриття операційного поля (розмір простирадла залежить від розміру тварин);

2) тампони (використовують при хірургічних маніпуляціях);

3) рушники, халат, ковпак;

4) гумові хірургічні рукавички.

Завдання 1. Розподіліть наведені предмети за групами: лабораторний скляний посуд, гінекологічний інструментарій, хірургічний інструментарій, хірургічна білизна.

Перелік: пробірка, піхвове дзеркало, чашка Петрі, скальпель, рушник, катетер, пінцет анатомічний, мірний циліндр, хірургічні рукавички, спермоприймач, ножиці Купера, скляна піпетка, цапка для білизни, предметне скло, шприц, простирадло з отвором, затискач Кохера.

Завдання 2. Установіть відповідність між лабораторним інвентарем та його призначенням.

Інвентар	Призначення
1. Чашка Петрі	А. Фіксація операційної білизни
2. Піхвове дзеркало	Б. Перенесення ембріонів
3. Скляна піпетка	В. Дослідження піхви та шийки матки
4. Цапка для білизни	Г. Робота з біологічним матеріалом
5. Пінцет	Д. Захоплення та утримання тканин
6. Мірний циліндр	Е. Вимірювання об’єму рідини

Завдання 3. Для кожної ситуації визначте один або декілька предметів лабораторного інвентарю, які необхідні для виконання роботи.

Необхідно виміряти певний об’єм поживного середовища.

Потрібно перенести ембріон під час ембріокультурального дослідження.

Необхідно дослідити піхву та піхвову частину шийки матки корови.

Потрібно зафіксувати операційне простирадло на тілі тварини.

Необхідно захопити та утримувати тканину під час маніпуляції.

Потрібно роз'єднати тканини під час хірургічної процедури.

Необхідно отримати сперму від самця-плідника.

Потрібно провести маніпуляції з дуже малими клітинними об'єктами.

ТЕМА 4. ПРАВИЛА РОБОТИ З ЛАБОРАТОРНИМ ІНВЕНТАРЕМ

Мета заняття: ознайомитися з правилами зберігання, миття, сушіння та стерилізації лабораторного інвентаря лабораторії біотехнології тварин.

Успіх будь-якого наукового експерименту вимагає дотримання чистоти і стерильності. Працюючи з лабораторним інвентарем необхідно забезпечити його безвідмовну і тривалу службу, що можливо при зберіганні та використанні лабораторного інвентаря в сприятливих умовах. Тому, працюючи в лабораторних умовах, необхідно володіти основними правилами щодо догляду, зберігання і використання лабораторного інвентаря. Засвоївши всі методи миття, сушіння та стерилізації лабораторного інвентаря, вивчивши технічне оснащення і організацію роботи лабораторії, студент зможе, в майбутньому, вільно орієнтуватися в різних роботах, пов’язаних з лабораторними дослідженнями з біотехнології в тваринництві.

Зберігання лабораторного інвентаря

Утримання лабораторного інвентаря в сприятливих умовах, ретельний догляд за ними забезпечують безвідмовність у роботі і тривалу його службу.

Від правильного догляду і зберігання залежить довговічність лабораторного інвентаря. Тому необхідно дотримуватися таких правил при роботі з лабораторним інвентарем:

1) інвентар, що був у вжитку повинен бути негайно вимитий теплою водою з милом, причому дуже ретельно щіткою промиваються нерівні поверхні і місця з’єднань частин інструменту;

2) вимиті інструменти і посуд ретельно висушуються в сушильній шафі, замки на інструментах змащуються вазеліном і потім інструменти розкладаються або розвішуються в інструментальних шафах, а посуд – в лабораторних шафах;

3) не можна допускати появи іржі на інструментах, яка дуже швидко з’являється при зберіганні у вологих умовах або недостатньому видаленні вологи з замків;

4) всі ріжучі інструменти повинні бути гострими;

5) ін’єкційні голки після промивання зберігають зі вставленими в них

мандренами в закритій посудині, наповненій спиртом навпіл з ефіром;

6) шприци зберігають у розібраному вигляді;

7) кетгут зберігають в 4%-вому водному розчині формаліну;

8) гумові предмети поміщають окремо від металевих інструментів.

Догляд за рукавичками – це один з найважливіших моментів асептики. Після роботи рукавички ретельно миють, одночасно перевіряють їх цілість. Для цього рукавички надувають, найкраще закручуванням, і занурюють у воду.

Дефект в рукавичці легко визначається за повітряними бульбашкам, що з'являються.

З усього вищевикладеного випливає, що після використання посуду і інструментарію необхідно провести наступні етапи робіт: очищення, миття, сушіння і перед вживанням – стерилізація.

Миття лабораторного інвентаря

Уміння мити лабораторний скляний посуд, хірургічний і гінекологічний інструментарій є тією частиною лабораторної техніки, знання якої обов'язкове для кожного працівника лабораторії.

Лабораторний посуд і інструментарій повинні бути абсолютно чистими, без виконання цієї умови працювати не можна. Тому слід навчитися мити посуд і інструменти до повної впевненості в їх чистоті. Способи миття посуду та інструментів різні й залежать від типу забруднення. Видалити забруднення зі стінок посуду можна різними методами: механічними, фізичними, хімічними, фізико-хімічними або комбінуючи їх.

Щоб вибрати спосіб миття посуду та інструментів у кожному окремому випадку необхідно наступне:

1. Знати властивості забруднюючих посуд речовин.

2. Для миття можуть бути використані всі речовини, що володіють поверхнево-активними властивостями (мило, синтетичні миючі речовини, миючі глини і ін.).

3. Якщо осад, що забруднює посуд і інструментарій є хімічно стійким, для його видалення можна застосувати механічне очищення (за допомогою йоржів і ін.).

4. Хірургічні та гінекологічні інструменти ретельно миються щіткою особливо в місцях, що мають нерівні поверхні і місця з'єднання частин інструменту.

5. Потрібно завжди пам'ятати про техніку безпеки та імовірність нещасних випадків при митті посуду. Кожен новий працівник лабораторії повинен бути ознайомлений з правилами техніки безпеки.

Миття водою. Скляний посуд вважається чистим, якщо на його стінках не утворюється окремих крапель і вода залишає рівномірну тонку плівку.

Правила миття скляного посуду:

1. Якщо на стінках посуду є наліт або осад, посуд очищають (попередньо змочивши водою) щіткою або йоржем і вже потім остаточно миють водою. Посуд миють у теплій воді.

2. При роботі з йоржем потрібно стежити, щоб нижній кінець його не вдаряти ні об дно, ні об стінки посуду, оскільки цим кінцем можна вибити дно або проломити стінку. Щоб запобігти можливості розбивання посуду металевим кінцем йоржа, на його кінчик потрібно надіти шматочок гумової трубки відповідного розміру.

3. Добре вимитий в теплій воді посуд обов'язково споліскують дистильованою водою для видалення солей, що містяться у водопровідній воді.

4. У раковину не можна викидати біологічні препарати (геніталії), перев'язувальні матеріали, що одержують при роботі.

Миття парою. Посуд не завжди може бути відмитий однією водою, наприклад, таким шляхом не можна відмити забруднення жировими речовинами. У цих випадках кращих результатів можна досягти, якщо мити посуд струменем гарячої водяної пари.

Миття іншими миючими засобами. Для миття посуду можна застосовувати і інші речовини, наприклад, мило або спеціальні миючі синтетичні речовини.

При митті водою з миючими засобами корисно помістити в колбу шматочки чистого фільтрувального або будь-якого іншого м'якого паперу. При струшуванні колби папір механічно видаляє зі стінок забруднення, що до них пристало.

Абсолютно неприпустимо застосовувати для очищення посуду пісок, оскільки він дряпає скло. Посуд, що має подряпини, при нагріванні руйнується.

Сушіння лабораторного інвентаря

Іноді вимитий посуд повинен бути добре висушений. Розрізняють методи холодного сушіння (без нагрівання) і гарячого (при нагріванні). Якщо роботу проводять з водними розчинами, то, як правило, сушіння посуду нераціональне.

Сушіння на кілочках. Це найпоширеніший спосіб сушіння посуду. У лабораторії повинна бути спеціальна дошка з кілочками, яку зазвичай поміщають над раковиною для миття посуду. Вимитий посуд надягають на ці кілочки і залишають на них до тих пір, поки він не висохне.

Потрібно стежити за чистотою кілочків і протирати їх, оскільки на вологих кілочках легко утримується пил і випадкові забруднення. Щоб

уникнути забруднення посуду від кілочків, їх можна обгортати чистим фільтрувальним папером і вже потім розміщувати на них посуд.

Сушіння повітрям. Вимитий посуд можна висушити струменем повітря. З цією метою слід застосовувати гумові груші. Сушити можна як холодним, так і нагрітим повітрям. Через висушуваний посуд продувають повітря до повного видалення слідів вологи.

Сушіння спиртом і ефіром. Обтерши посудину зовні чистим рушником, споліскують її спочатку чистим етиловим спиртом, а потім чистим діетиловим (сірчаним) ефіром. Пари ефіру видаляють продуванням холодного повітря.

Сушіння в сушильній шафі. Швидко висушити посуд можна також в сушильній шафі. Звичайно в сушильну шафу посуд ставлять після того як він деякий час постояв перевернутим (на кілочках) для видалення води.

Сушіння проводять при температурі 80-100°С протягом 30-60 хв. Перед сушінням на полицю шафи слід покласти шматок чистого фільтрувального паперу.

Посуд при висушуванні в сушильній шафі не слід ставити догори дном, оскільки це уповільнює випаровування парів води. Після сушіння в сушильній шафі посуд відразу застосовувати не можна, йому потрібно спочатку дати охолонути.

Таким чином, при митті і сушінні лабораторного посуду та інструментів необхідно пам’ятати наступне:

1. Посуд завжди повинен бути чисто вимитим і обполіснутим дистильованою водою;

2. При роботі з йоржем потрібно стежити, щоб нижнім його кінцем не проткнути дно або не пробити стінку посуду;

3. При сушінні посуду треба стежити, щоб він не забруднився;

4. Вибираючи спосіб миття, перш за все, потрібно враховувати, якою речовиною забруднено даний посуд;

5. При митті посуду слід дотримуватися правил техніки безпеки та санітарії. Мити посуд бажано в гумових рукавичках;

6. Для відмивання забруднень слід застосовувати найбільш дешеві матеріали;

7. Хірургічні та гінекологічні інструменти після миття обов’язково потрібно висушити. Неприпустимо інструменти зберігати у вологих умовах. Тому їх висушують у сушильних шафах.

Сушіння інструментів проводять при температурі 100-120°С протягом 40-80 хвилин. До наступного застосування інструменти зберігають в інструментальних шафах А перед повторним застосуванням – стерилізують.

Стерилізація лабораторного інвентаря

Знищення мікробів і їх спор на хірургічній білизні, інструментарії і лабораторному посуді називають *стерилізацією*. Способи стерилізації різні й залежать від виду матеріалу, що стерилізується.

Правила стерилізації лабораторного інвентаря:

1. Всі **металеві інструменти, скляний посуд** стерилізують кип'ятінням. Перед кип'ятінням інструменти очищають від мастила, що їх покриває, ін'єкційні голки звільняють від мандренів, гострі частини інструментів, а також скляний посуд загортають в марлю. Шприци стерилізують у розібраному вигляді, попередньо загорнувши в серветку.

У стерилізатори наливають воду, кип'ятять протягом приблизно 15 хв, потім додають луг (1%-ний натрій карбонат, 0,1%-вий гідроокис натрію), які підвищують ефект стерилізації і кип'ятять ще приблизно 3 хв і тільки після цього на знімну решітку за допомогою пінцета обережно укладають інструменти; решітку опускають спеціальними гачками в воду, закривають кришку і кип'ятять протягом 15 хв з Na_2CO_3 або 10 хв з NaOH.

Після кип'ятіння решітку з інструментами виймають зі стерилізатора і перекладають на операційний інструментальний столик.

2. **Кетгут** виготовляють з підслизового шару кишечника дрібної рогатої худоби. Кетгут має властивість розсмоктуватися в тканинах тваринного організму в терміни від 7 до 30 днів. Випускають кетгут в стерильних ампулах або в мотках, що вимагають стерилізації. Найбільш простий і швидкий спосіб стерилізації – це спосіб Покотило, коли кетгут поміщають на 72 години в 4%-ний водний розчин формаліну.

3. Стерилізація перев'язувального матеріалу, білизни і предметів хірургічного ужитку. Для стерилізації операційної білизни, перев'язувального матеріалу і рукавичок, а також інструментарію використовуються спеціальні металеві посудини – так звані бікси (рис. 21). Бікси служать для зручності заповнення автоклава, для перенесення стерильної білизни в операційну і зберігання стерильної білизни.

Бікс є металевою нікельованою коробкою з кришкою, що щільно закривається і застібається. Бокова стінка подвійна, причому зовнішня стінка зміщується і має кілька великих прорізів, внутрішня – нерухома і в ній є дрібні отвори, що займають площу, рівну прорізам на зовнішній стінці.

Коли бікси нестерильні, отвори на внутрішній стінці встановлюються проти прорізів на зовнішній стінці (решітка відкрита). Після стерилізації решітка закривається. Це досягається зміщенням зовнішньої стінки.



Рис. 21. **Бікси**

Бікси перед заповненням матеріалом, призначеним для стерилізації протирають і обов'язково відкривають решітки. Заповнюють бікси матеріалом не щільно, оскільки в протилежному випадку може не відбутися стерилізації білизни, що знаходиться всередині.

Зазвичай бікси заповнюють однорідним матеріалом, наприклад в один бікс укладають халати, простирадла і рушники, в інший – марлеві серветки, кульки, бинти, дерев'яні палички з накрученою на них ватою, в третій – рукавички, гумові дренажі. До ручки кришки прив'язують клейончатий ярлик із зазначенням виду матеріалу, кількості, дати стерилізації.

При відсутності спеціальних біксів операційну білизну, перев'язувальний матеріал можна стерилізувати в мішках зі щільної тканини.

При температурі 120-134°С і тиску не вище 2 атм. через 30-45 хв досягається повна стерильність усіх предметів. Однак не можна у всіх випадках проводити стерилізацію при 2 атм. Деякі предмети можуть псуватися при даній температурі. Так, рукавички і вироби з деяких пластмас треба стерилізувати при 1 атм. протягом 45-60 хв.

Автоклавування проводять в наступному порядку:

- в автоклав заливають воду до мітки, встановленої на водомірному склі (при надмірній кількості води можливо закидання її всередину автоклава);
- в автоклав закладають предмети, що будуть стерилізуватися (бікси з відкритими решітками, мішки) і кришку автоклава міцно загвинчують;
- закривають всі крани, крім крана, що сполучається з внутрішньою частиною автоклава і призначений для видалення повітря;
- вмикають підігрів, і через деякий час з відкритого крана починає надходити пар. Після того як пар почне виходити сильним струменем, кран закривають;

- коли на манометрі стрілка піднімається до 1 атм., кран знову відкривають. Цим повністю видаляють атмосферне повітря, надлишок вологи, що осідає на холодних предметах, що знаходяться всередині автоклава;
- з моменту, коли стрілка манометра знову встановиться на цифрі «1», починають відлік часу стерилізації. Зміною ступеня нагріву або видаленням частини пару через запобіжний клапан підтримують необхідну температуру і тиск.
- через 30-45 хв від початку стерилізації вимикають нагрівальний прилад і через крани випускають пару з автоклава. Кришку автоклава відгвинчують тоді, коли на манометрі стрілка вкаже «0».

Простерилізована білизна має бути завжди сухою, в іншому випадку стерильність її сумнівна.

Операційний білизна при стерилізації може стати мокрою, якщо:

1) автоклав переповнений водою, яка при кип'ятінні закидається всередину автоклава;

2) не видалити частину пару перед початком відліку часу стерилізації;

3) залишити охолоджуватися бікси в автоклаві;

4) гарячі стерильні бікси винести на холод або в вологе приміщення.

4. **Стерилізація рукавичок**. Стерилізація рукавичок може бути здійснена в автоклаві, кип'ятінням і зануренням в антисептичні розчини. Перед стерилізацією в автоклаві рукавички необхідно після висушування покрити шаром тальку як всередині, так і зовні. Крім того, для попередити склеювання, кожну рукавичку окремо обгортають шаром марлі. У біксах рукавички не повинні стикатися з його стінками, для чого на дно вкладають рушник або шар серветок.

Стерилізація шляхом кип'ятіння здійснюється в дистильованій воді протягом 20-35 хвилин. Холодна обробка полягає в занурені рукавичок в 2%-ний розчин хлораміну на 15-30 хвилин або в розчин сулеми 0,1% (1:1000) на 1,0-1,5 години з наступним промиванням стерильним фізіологічним розчином або дистильованою водою, висушуванням, обробкою тальком і зберіганням в стерильних біксах.

Перед операцією рукавички, одягнуті на руки, незалежно від способу стерилізації протягом 2 хвилин обробляють спиртом.

Завдання 1. Установіть відповідність між способом обробки лабораторного інвентарю та його характеристикою.

Спосіб обробки	Характеристика
1. Миття водою	А. Видалення вологи за допомогою нагрітого повітря
2. Миття парою	Б. Видалення залишків водопровідних солей
3. Сушіння в сушильній шафі	В. Очищення посуду від забруднень струменем гарячої пари
4. Сушіння повітрям	Г. Очищення посуду теплою водою
5. Сполоскування дистильованою водою	Д. Видалення вологи струменем повітря

Завдання 2. Визначте, чи правильне твердження. Позначте «+» або «–».

Твердження	+ / –
1. Посуд після миття необхідно сполоскувати дистильованою водою.	
2. Для очищення скла можна використовувати пісок.	
3. Вологі металеві інструменти можна зберігати в шафі.	
4. Ріжучі інструменти повинні бути гострими.	
5. Шприци рекомендують зберігати в розібраному вигляді.	
6. Гумові предмети зберігають разом із металевими інструментами.	
7. Посуд після сушіння в сушильній шафі повинен охолонути перед використанням.	
8. Хірургічні та гінекологічні інструменти після миття потрібно висушити.	

Завдання 3. Розташуйте етапи автоклавування у правильній послідовності:

А. Увімкнути підігрів.

Б. Завантажити предмети для стерилізації.

В. Залити воду до встановленої позначки.

Г. Після завершення стерилізації вимкнути нагрівання та випустити пару.

Д. Закрити кришку автоклава.

Е. Після зниження тиску до нуля відкрити автоклав.

ТЕМА 5. БУДОВА СТАТЕВИХ КЛІТИН

Мета заняття: вивчити форми розмноження організмів, порівняти їх. Розглянути механізми статевого розмноження, та вивчити будову статевих клітин.

Наступність поколінь у природі здійснюється завдяки розмноженню організмів. **Розмноження** – здатність організму залишати потомство, тобто відтворювати собі подібних. У природі існують два типи розмноження

організмів: *нестатеве та статеве*.

Нестатеве розмноження – утворення нового організму з однієї або групи клітин вихідного материнського організму. У цьому випадку в розмноженні бере участь тільки одна батьківська особина, що передає свою спадкову інформацію дочірнім організмам. В основі нестатевого розмноження лежить **мітоз.**

Зустрічається декілька форм нестатевого розмноження: ***простий поділ навпіл,*** характерний для одноклітинних організмів. З однієї клітини шляхом мітозу утворюються дві дочірні, кожна з яких стає новим організмом.

Брунькування – форма нестатевого розмноження, під час якого від батьківської особини відокремлюється дочірній організм. Така форма характерна для грибів, гідри і деяких інших тварин.

У спорових рослин (водоростей, мохів, папоротей) розмноження відбувається спорами, спеціалізованими клітинами, що утворюються в материнському організмі. Кожна спора, проростаючи, дає початок новому організму.

Вегетативне розмноження – різновидність нестатевого розмноження окремими органами, частинами органів або тіла. Воно ґрунтується на здатності організмів відновлювати відсутні частини тіла – регенерації. Поширене і рослин (розмноження стеблами, листям, пагонами), у нижчих безхребетних тварин (кишковопорожнинних, плоских червів).

Статеве розмноження – утворення нового організму за участю двох батьківських організмів. Під час статевого розмноження відбувається злиття статевих клітин – **гамет ч**оловічого і жіночого організму. Новий організм несе спадкову інформацію обох батьків.

Статеві клітини формуються в результаті **мейозу,** при якому число хромосом у клітинах, що утворюються внаслідок поділу, у два рази менше, ніж у вихідній материнській клітині. В результаті злиття двох гамет кількість хромосом у клітині, що знову утворилася, – **зиготі,** збільшується у два рази, тобто відновлюється, причому одна половина усіх хромосом є батьківською, інша – материнською. Процес утворення статевих клітин називають **гаметогенезом.** Гамети утворюються у статевих залозах або спеціалізованих клітинах. У тварин це *сім'яники та яєчники.* Гаметогенез відбувається послідовно у трьох зонах і закінчується дозріванням гамет. Розрізняють **сперматогенез** (процес утворення чоловічих статевих клітин – сперматозоїдів) та **овогенез** (процес утворення жіночих статевих клітин – яйцеклітин).

Сперматозоїди плацентарних ссавців мають мікроскопічні розміри – 10-80 мкм. Сперматозоїд морської свинки має коротку головку, в якій міститься ядро

та особлива органела – акросома. Вона допомагає розчиняти оболонку яйцеклітини, тому що містить спеціальні ферменти. За головкою розміщується шийка, яка плавно переходить в хвостик, або джгутик. Джгутик з мітохондріями забезпечує активний рух сперматозоїдів в насінній рідині.

Головна функція сперматозоїдів – запліднення нерухомої яйцеклітини. Яйцеклітина ссавців оточена кількома оболонками, які утворюють так званий променистий вінець. Він виконує захисну та живильну функції. У більшості ссавців розміри яйцеклітин становлять 50-180 мкм. У людини діаметр яйцеклітини 90 мкм. Яйцеклітина має ядро та цитоплазму. Після запліднення навколо зиготи утворюється спеціальна оболонка, яка не пропускає до клітини інші сперматозоїди. У ссавців живлення зародка відбувається через плаценту, тому яйцеклітини мають невелику кількість поживних речовин і дрібні розміри. Функція яйцеклітини – після запліднення дати нове життя, новий організм.

Завдання 1. Заповніть таблицю:

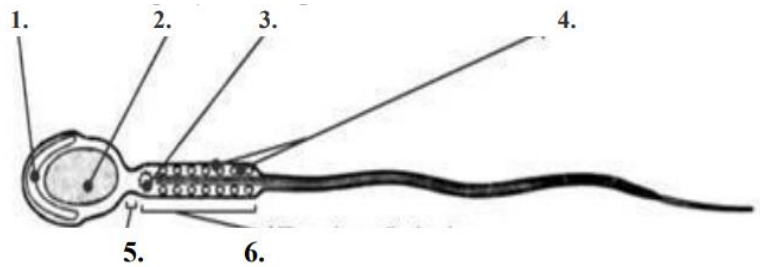
Порівняльна характеристика форм розмноження організмів

Ознаки	Нестатеве розмноження	Статеве розмноження
Клітини, які беруть участь		
Подібність нащадків		
Біологічне значення		

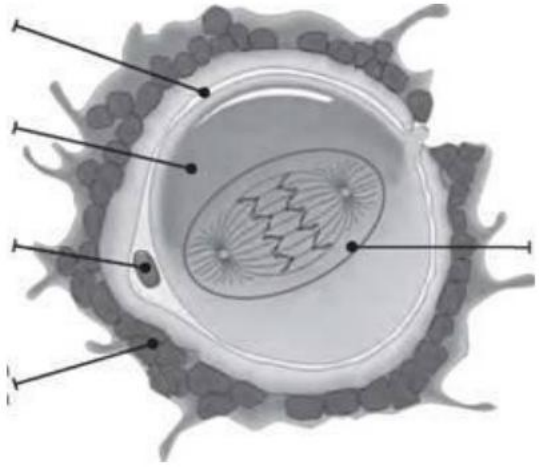
Завдання 2. Заповніть таблицю:

Назва	Визначення і приклади
Партеногенез	
Гермафродитизм	
Роздільно-статевість	

Завдання 3. Розгляньте рисунок сперматозоїда, і позначте його основні частини.



Завдання 4. Розгляньте рисунок яйцеклітини, намалюйте схему будови і позначте її основні частини.



Завдання 5. Заповніть таблицю.

Порівняльна характеристика сперматозоїдів та яйцеклітин плацентарних ссавців

Ознаки порівняння	Яйцеклітина	Сперматозоїд
1. Розміри, форма		
2. Будова клітини (особливі органоїди та їх функції)		
3. Де розвиваються		
4. Запас поживних речовин		
5. Значення		

ТЕМА 6. ШТУЧНЕ ОСІМЕНІННЯ СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКИХ ТВАРИН

Мета заняття: ознайомитися з теоретичними основами та практичними методами штучного осіменіння сільськогосподарських тварин, засвоїти техніку проведення штучного осіменіння різних видів тварин.

Техніка осіменіння корів ректо-цервікальним способом (з ректальною фіксацією шийки матки). Корів осіменяють без піхвового дзеркала за допомогою пластмасових інструментів одноразового вжитку. Полістиролові піпетки 45 см завдовжки стерилізують ультрафіолетовим промінням на заводі і надсилають на пункти в поліетиленових пакетах по 10-20 штук у кожному. Крім піпеток слід мати пластмасовий двограмовий шприц з поліетиленовою чи гумовою сполучною муфтою (або балончик з гуми чи пластмаси), а також

поліетиленові рукавички.

Перед осіменінням беруть чисто вимитими і продезинфікованими (спиртовими тампонами) руками одну піпетку з пакета через розірваний в куті пакета шов і з'єднують муфтою з шприцом або накладають на її кінець поліетиленовий балончик. Отвір у пакеті відразу ж запаюють над полум'ям спиртівки чи сірника.

Пластмасовим шприцом набирають у піпетку 1 мл сперми. Якщо користуються балончиком, то, стиснувши його двома пальцями, опускають кінець піпетки у флакон зі спермою і, ослабивши стиск, набирають у піпетку 1 мл сперми; зазначений об'єм заповнятиме приблизно дві третини довжини піпетки. Слід заздалегідь натренуватися в точному набиранні потрібного об'єму сперми.

На одну руку натягають поліетиленову рукавичку і зволожують її мильним розчином. Обмивають і обтирають насухо зовнішні статеві органи корови.

Розсунувши пальцями руки в рукавичці статеві губи, вводять піпетку у піхву, спрямовуючи її навскоси догори по верхньому склепінню піхви, щоб кінець піпетки не міг потрапити в отвір сечовипускального каналу. Руку в рукавичці вводять у пряму кишку корови і видаляють звідти калові маси, захищаючи піпетку від забруднення. Намацують через нижню стінку прямої кишки шийку матки і фіксують її вказівним і середнім пальцями. Водночас великим пальцем або мізинцем намацують кінець піпетки і спрямовують його в канал шийки матки, ніби насаджуючи її на піпетку. Другою рукою подають піпетку вперед, щоб вона увійшла в шийку матки на глибину 6-8 см. Відвівши піпетку на 0,5 см назад, стискають балончик (або натискують на поршень шприца) і виштовхують сперму в шийку матки. Обережно виймають піпетку зі статевих органів корови, продовжуючи стискати балончик, щоб сперма не всмокталася назад у піпетку.

Піпетку і рукавичку після осіменіння знищують, а шприци і гумові балончики стерилізують.

Ректо-цервікальний спосіб має ряд переваг порівняно з використанням піхвового дзеркала. Усуваються больові відчування і подразнення слизової оболонки піхви. Забезпечується значно глибше введення сперми, завдяки чому сперма не витікає у піхву. Масаж матки при осіменінні сприяє посиленню скорочень матки і швидкому просуванню сперми до яйцепроводів. Недоліком цього способу є те, що технік не може виявити і визначити характер патологічних процесів у статевих органах корови. Проте ректо-цервікальний спосіб широко застосовується за рубежем і дає добрі результати.

Осіменіння корів спермою у пластмасових капілярах (пайєтах, «соломинках») широко застосовується за кордоном (особливо у Франції) при використанні замороженої сперми. Крім капіляра зі спермою, необхідно мати металевий катетер з тонким поршнем-штовхачем усередині та пластмасову піпетку-футляр з вузьким отвором на одному кінці.

Після відтаювання замороженої сперми капіляр уставляють в кінцевий отвір металевого катетера, попереду витягнувши з нього поршень на довжину капіляра. Потім на катетер надівають пластмасову піпетку-футляр і осіменяють корову візо-цервікальним або ректо-цервікальним способом за звичайними правилами. Капіляр і піпетку-футляр після осіменіння знищують, а катетер і поршень дезинфікують.

Техніка осіменіння корів мано-цервікальним способом

Осіменіння проводять без піхвового дзеркала, вводячи у піхву корови руку в поліетиленовій рукавичці. Сперма міститься в поліетиленовій ампулі.

Перед осімененням ампулу виймають з термоса, протирають тампоном, змоченим 70°-ним спиртом, струшують, щоб краще перемішати сперму, відрізують ножицями ковпачок, вставляють у шийку ампули полістироловий катетер 7,5 см завдовжки і видавлюють краплю сперми для дослідження активності сперміїв.

Після обробки зовнішніх статевих органів корови технік натягає поліетиленову рукавичку, змочує її 1 % розчином натрію хлориду, вводить руку в піхву, робить легкий масаж піхвової чакстини шийки матки, щоб викликати її скорочення, і видаляє прилиплий до неї слиз Потім, не витягуючи руки з піхви, другою рукою додає ампулу з катетером, кладе її вздовж вказівного пальця і притискає великим. Увівши руку з ампулою д) шийки, технік вставляє катетер у п канал на глибину 1,5-2 см і, масуючи шийку, проштовхує катетер, поки він повністю не увійде в канал. Піднімає ампулу на 2-3 см догори і, стискуючи її великим і вказівним пальцями, видавлює сперму в канал шийки матки. Потім слід покласти порожню ампулу на дно піхви і ще раз зробити легкий масаж шийки матки, після чого руку з ампулою виймають з піхви.

Ампулу з катетером і рукавичку після використання знищують.

Дозування сперми бугая. При цервікальному осіменінні коровам звичайно вводять 1 мл розведеної сперми з активністю сперміїв не нижчою за 7 балів (після заморожування – не нижчою за 4 бала). При цьому в дозі повинно міститися не менш як 25-50 млн. сперміїв з р нормальним поступальним рухом.

При дворазовому осіменінні корів в одну охоту слід щоразу вводити повну дозу сперми. Штучне осіменіння корів м'ясних порід має характерні

особливості.

М'ясних тварин, як правило, утримують без прив'язі, і вони не закріплені за доярками. Осіменіння проводять звичайно влітку. Ферми та гурти корів м'ясних порід часто розташовані на великих відстанях один від одного. Тому іноді застосовується маршрутно-кільцевий метод організації штучного осіменіння; технік на автомашині об'їжджає гурти вранці та ввечері.

При фермах обладнують стаціонарні пункти, а під час літнього утримання гуртів на пасовищах – пересувні пункти. На пунктах треба мати станки з механічними фіксаторами і кілька індивідуальних станків – боксів для перетримування корів після осіменіння. На пересувних пунктах треба мати, крім того, карду-розкіл, у яку відбирають корів і телиць в охоті. Скотар заганяє корів у стані охоти по розколу у станок, накладає поперечну скобу на спину корови, фіксу хвіст і обмиває зовнішні статеві органи тварини. Осіменіння проводиться за одним з методів, які були описані вище.

Методи підвищення запліднюваності корів. Основним методом підвищення запліднюваності маточного поголів'я всіх видів тварин є правильна, повноцінна годівля. В раціонах корів повинна бути достатня кількість повноцінного білка, вітаміну А (або каротину), кальцію, а також кухонної солі. Влітку тваринам потрібно згодовувати в достатній кількості зелені корми, взимку – доброякісне зелене сіно і силос, а також коренеплоди. Особливо багата на каротин червона морква.

Важливе значення має правильне утримання корів і передусім щоденний активний моціон на свіжому повітрі у вигляді прогону на відстань 3-4 км (в обидва кінці) по добрій дорозі і випускання на кілька годин в обгороджений двір біля корівника.

Якщо поява охоти затримується, корисно, крім поліпшення годівлі й утримання, влітку купати корів у водоймах або обливати водою зі шланга.

Корів необхідно запускати за 1,5-2 місяці до отелення, щоб краще підготувати тварину до родів і посиленої лактації. Така підготовка сприятливо позначається на діяльності яєчників. І, навпаки, погано підготовлені, виснажені корови, як правило, довго не приходять в охоту після отелення.

Техніка осіменіння свиней. Техніка осіменіння свиней попередньо розведеною спермою (нефракційний спосіб). Для осіменіння застосовують поліетиленовий прилад, ПОС-5, який складається з тонкостінного флакона місткістю 150 -250 мл, кришки, що нагвинчується на нього, і катетера з сполучною муфтою.

Можна користуватися складним градуйованим флаконом. Через гумову пробку флакона пропускають дві гумові трубки кожна по 70 см завдовжки.

Кінець однієї трубки закривають короткою скляною паличкою, роблять вище від неї розріз у трубці і опуксають її майже до дна флакона. До вільного кінця трубки приєднують фільтр з ватою всередині кулі Річардсона. Другу трубку пропускають через пробку флакона на 0,5см, а вільний кінець з'єднують з гумовим катетером Іванова або з пластмасовим катетером. Флакони перед осіменінням розігрівають у теплій воді 30- 35˚, а потім ставлять у поролоновий термос. Перед осіменінням відгвинчують кришку поліетиленового флакона і приєднують катетер. Свиней осіменяють на пункті штучного осіменіння, де обладнують індивідуальні металеві клітки для свиней. Технік вводить катетер у піхву свині на глибину 25-30 см (до упору в шийку матки). Поліетиленовий флакон піднімають вище від спини тварини і злегка стискують його стінки. Якщо шийка матки розкрита, сперма самопливом надходить у матку. Для витиснення сперми з скляного флакону стискують кулі Річардсона. Вводити сперму треба повільно протягом кількох хвилин. Якщо сперма витікає з піхви (коли шийка матки закрита), слід припинити введення сперми до нового розкриття шийки матки.

Доза розведеної сперми – близько 4 мл на 1 кг живої ваги свині, але не більш ніж 150 мл. У дозі повинно міститися 4-5 млрд. активних сперміїв.

Техніка осіменіння свиней фракційним способом має ту особливість, що вводять спочатку розведену сперму а слідом за нею – розріджувач (заповнювач), що проштовхує сперміїв до верхівок рогів матки. Фракційне введення сперми дає можливість значно зменшити дозу сперми що використовується на осіменіння однієї свиноматки. У дослідах М. Т. Плішка була висока запліднюваність свиноматок при фракційному введенні їм усього 0,5 млрд, сперміїв (тобто 3-5 мл нерозведеної сперми). У виробничих умовах такі малі дози застосовувати поки що не можна.

При осіменінні свиню ставлять у спеціальну клітку з лямками, які не дають свині лягти під час осіменіння, і перегородкою, пересуваючи яку можна змінювати довжину клітки.

Для осіменіння застосовують уніфікований зонд УЗК-5.

До складу приладу входять два скляні (місткістю по 100 мл) або пластмасові (по 150 мл) флакони, які містяться під плексигласовим ковпаком. Флакони з'єднані гумовими трубками з кулями Річардсона і з металевим зондом (катетером), що має на кінці м'яку гумову головку, яка закриває вхід в канал шийки матки. Сполучною муфтою можна приєднувати до приладу замість зонда пластмасовий катетер. Плексигласовий ковпак має металеве дно, яке можна опускати, щоб замінити флакон.

Перед осіменінням свинарка обмиває зовнішні статеві органи свині

чистою теплою водою з кружки Есмарха.

Зонд вводять у піхву свині на 20-30 см (до упору). Затримуючи зонд лівою рукою, відкривають затискач флакона зі спермою і, натискаючи на з'єднанні з флаконом кулі Річардсона, витісняють тиском повітря сперму в канал шийки матки свині. Якщо шийка матки закрита, сперма не проходить навіть лід сильним тиском. У цьому разі слід почекати від 5 до 40 сек, коли шийка матки знову відкриється. Після витікання потрібної дози сперми з флакона закривають його затискач і відкривають затискач флакона з розріджувачем. Розріджувач проштовхує сперму вглиб рогів матки. Молодим свинкам вводять сперму і розріджувач повільніше, у меншій кількості і під меншим тиском.

При фракційному осіменінні можна використовувати поліетиленові прибори ПОС-5. В один флакон наливають сперму, а у другий – заповнювач. Після випорожнення флакону зі спермою, його відгвинчують від катетера і приєднують флакон із заповнювачем. Температура сперми і заповнювача повинна бути близько 39°.

Дозування сперми кнура при осіменінні фракційним способом. Дорослим свиням вводять 50 мл розведеної сперми, молодим – 35 мл. В дозі для дорослих свиней повинно міститися 2,5 млрд, активних сперміїв, для молодих – 1,75 млрд. Сперму розводять залежно від її якості, але не більш як у 6 разів (1 : 5). Після сперми дорослим свиням вводять 100 мл заповнювача, молодим – 70-80 мл.

Техніка осіменіння кобил. Кобилу при осіменінні ставлять у спеціальний станок або накладають парувальну шлею. Корінь хвоста кобили слід забинтувати, щоб жорстке волосся хвоста не потрапило в піхву.

Кобил осіменяють тільки в матку, вводячи катетер на глибину 10-12см через розкриту шийку матки.

Сперму, що зберігалася при низькій температурі, після оцінки необхідно обов'язково підігріти до температури 30-35° у теплій воді або в долонях рук протягом 15-20 хв. При введенні холодної сперми матка скорочується і виштовхує сперму в піхву.

Є кілька способів введення сперми кобилам. Найчастіше користуються м'яким гумовим катетером Іванова, з'єднаним з скляним шприцом місткістю 20-30 мл або з скляною ампулою місткістю 30 мл.

Гумовий катетер вводять у піхву кобили рукою, яку попередньо підготовляють; коротко обрізують нігті, миють теплою водою з милом і щіткою, насухо витирають чистим рушником, протирають спиртовим тампоном і зволожують 1% розчином натрію хлориду. Миття і дезинфекцію проводять

перед осіменінням кожної кобили.

Визначивши кінцями пальців ступінь розкриття шийки матки, спрямовують кінець катетера в канал шийки матки, а вільною рукою просувають вперед, поки катетер не увійде в матку на глибину 10-12 см. Потім до катетера приєднують шприц зі спермою і повільно виштовхують сперму в матку, натискуючи на поршень. Після цього катетер повільно виймають із статевих органів.

Іноді застосовують скляний або ебонітовий катетери (відповідно знезаражені). Ці катетери вводять через піхвове дзеркало. До скляного катетера приєднують гумовою муфтою шприц після введення катетера. Ебонітовий катетер, що має 50 см завдовжки, заздалегідь приєднується до канюлі шприца металевим хомутиком з гумовою прокладкою.

Кобил можна осіменяти також ампульним способом. Скляна ампула зразка 1952 р. має 190 мм завдовжки, в діаметрі 18 мм і вміщує 30 мл сперми. Ампула водночас є посудиною для зберігання і перевезення сперми (для чого обидва кінці її закривають гумовими ковпачками). При осіменінні ампула може використовуватися замість шприца або замінювати катетер. У першому разі, знявши гумовий ковпачок з гострого кінця ампули, приєднують її до заднього кінця гумового, скляного або ебонітового катетера, введеного в матку, а потім виймають пробку з другого кінця ампули і злегка піднімають останню. Іноді вводять ампулу рукою в шийку матки кобили і, натискаючи на з'єднаний тонкою гумовою трубкою з ампулою гумовий балон, виштовхують сперму в матку.

Дозування сперми жеребця. Доза нерозведеної або розведеної сперми, що вводиться при кожному осіменінні, - від 20 до 40 мл. Великим, старим, а також кобилам, які недавно ожеребилися, слід вводити максимальну дозу, оскільки об'єм матки у них збільшений.

Можна також користуватися скляним градуйованим флаконом (пляшкою для консервування крові). Через гумову пробку флакона пропускають дві гумові трубки кожна по 70 см завдовжки. Кінець однієї трубки закривають короткою скляною паличкою, роблять вище від неї розріз у трубці і опускають її майже до дна флакона. До вільного кінця трубки приєднують фільтр з ватою всередині і гумові кулі Річардсона. Другу трубку пропускають через пробку флакона на 0,5 см, а вільний кінець з'єднують з гумовим катетером Іванова або з пластмасовим катетером.

Флакони зі спермою перед осіменінням розігрівають у теплій воді (30-35°), а потім ставлять у поролоновий термос. Перед осіменінням відгвинчують кришку поліетиленового флакона і приєднують катетер.

Штучне осіменіння овець. Тривалість статевого циклу у овець коливається від 14 до 19 діб. Із збільшенням віку маток тривалість статевого циклу дещо подовжується.

Тривалість періоду штучного осіменіння маток повинна становити не менше двох статевих циклів, тобто 33-40 днів. «Зачистку» (покриття маток, які 90 перегуляли після штучного осіменіння) бажано проводити 1-1,5 статевих цикли, тобто 20-25 днів. Таким чином, у тварин контролюються 3-4 статеві цикли, що дозволяє проводити окоти протягом двох місяців, одержувати майже одновікових ягнят, що полегшує умови формування сакманів і проводити одночасне відлучення ягнят перед стрижкою.

Свіжоодержані спермії баранів зберігають біологічну повноцінність і рухливість у геніталіях фізіологічно нормальних і клінічно здорових овець до 30-40 годин. А спермії, які зберігалися в замороженому стані, зберігають рухливість у геніталіях маток до 16-18 годин.

Яйцеклітини після овуляції зберігають свою біологічну повноцінність протягом 6-10 годин. Тому, щоб забезпечити запліднення всіх овульованих яйцеклітин маток необхідно осіменяти два рази - ранком зразу після виявлення охоти і через 8- 10 годин після першого осіменіння. А якщо охота у тварин продовжується до ранку наступного дня, то необхідно провести й третє осіменіння.

Період кітності у овець становить п'ять місяців (142-154днів).

Манеж для осіменіння овець повинен забезпечувати санітарногігієнічні умови проведення штучного осіменіння тварин, а також оптимальні умови для роботи і мати нормальний температурний режим. Розміри манежу визначаються технологією осіменіння, що застосовується на пункті й можуть бути від 6 до 20 кв.м і навіть більше, коли, наприклад, застосовується карусельна установка. Підлога в манежі повинна бути не слизькою і легко митися, краще її покривати асфальтом або робити з дерев'яних дощок. Стіни в манежі на висоту до 1,5-1,7 м бажано облицьовувати кахельною плиткою, а верхню їх частину і стелю білять водоемульсійною фарбою білого кольору.

Штучне осіменіння курей, індиків, гусей, качок, цесарок. Для осіменіння птахів користуються шприцами-напівавтоматами, що застосовуються при штучному осіменінні овець, індивідуальними полістироловими чи скляними піпетками і поліетиленовими (гумовими) кульками.

При організації штучного осіменіння курок-несучок їх утримують у батареях з індивідуальними клітками (для моноспермного осіменіння), батареях з груповими клітками (для поліспермного осіменіння змішаною спермою

кількох плідників) і на підлозі.

Осіменіння курей проводять дволанковою бригадою у другій половині дня після закінчення яйцекладки. Одна ланка отримує сперму від півнів, друга проводить осіменіння курок. Їм вводять сперму у яйцепровід на глибину 4-5 см. Осіменяють курок один раз за 5 днів. Для того, щоб забезпечити насичення статевих шляхів курей необхідною кількістю спермій під час першого осіменіння, слід вводити подвоєну дозу сперми. Збір яєць на інкубацію можна починати через 48 годин після такого осіменіння.

Для штучного осіменіння індичок обладнують біля пташника невелику лабораторію, мийку, кімнату для отримання сперми і в кожному пташникуматочнику ізольоване приміщення для осіменіння індичок. Молодих індичок починають осіменяти після знесення ними перших яєць. Потім їх осіменяють через кожних 3 дні до тих пір, поки в стаді не почне нести яйця остання маса індичок. Після цього інтервал між осіменінням збільшується до 10-14 днів. Пункт штучного осіменіння гусей влаштовують у приміщенні, де утримують гусаків. Для виконання робіт створюють бригаду з чотирьох працівників: два з них одержують сперму, оцінюють її і розріджують, а два інші – виловлюють і осіменяють гусок.

Штучне осіменіння гусок бажано проводити після 12 годин дня, коли у більшості з них у матці (2–5-ти сантиметрова каудальна частина яйцепроводу) відсутнє яйце. Для підтримання високого рівня заплідненості осіменіння гусок повторюють через кожні 5-6 днів. Після першого осіменіння відбирають яйця для інкубації, починаючи з третього дня.

Штучне осіменіння качок проводять спермою 4-6-ти самців, зразу ж після її одержання і розрідження. Висока заплідненість яєць (понад 90 %) зберігається протягом 4-х днів після осіменіння, тому осіменяють качок в умовах виробництва через кожні 4 дні о 16-18-й годині.

Штучне осіменіння цесарок проводять через кожні 8-10 днів, пам’ятаючи, що заплідненість яєць забезпечується протягом 8-10-ти днів.

Штучне осіменіння кролів. Якість приплоду значною мірою залежить від якості плідника. Для парування самок підсаджують у клітку до самця. Через 10-15 днів після парування вже можна точно визначити крільність матки.

Крільність у самок триває 30 днів. При народженні кроленята мають масу 40-64 г. Самки можуть поєднувати крільність з лактацією, тому здатні давати 4-5 окролів протягом року.

Штучне осіменіння кролів ускладняється тим, що овуляція фолікулів спонтанно не здійснюється, вона проходить тільки за умови природнього парування. При застосуванні штучного осіменіння кролиць, їх спочатку

спаровують з вазектомованим кролем і після цього через 2-4 години вводять сперму одержану від племінних кролів-плідників. Необхідно звертати увагу на те, що матка у самок кролів двороздільна. Тому при штучному осіменінні сперму необхідно вводити окремо в два роги.

Сперму від племінних кролів-плідників починають одержувати з річного віку. Для цієї мети використовується звичайна штучна вагіна, що і для барана, тільки вкорочена на 8-10 см або ж виготовлена із скла. В якості підставної тварини можна використовувати кролематку або ж чучело, виготовлене із шкіри забитої кролиці.

Для розбавляння сперми використовують, в основному, глюкозо-жовтковий розріджувач. Спеціально виготовлених інструментів для введення сперми при осіменінні кролиць практикою не запропоновано. Проте для цієї мети можна використовувати одноразовий пластиковий двохграмовий шприц до якого приєднують піпетку довжиною 10-12 см.

Можна рекомендувати також інструменти, які використовуються при маноцервікальному осіменінні корів. У молоці кролематок 13-27% жиру, 10-15% білка, 1,8-2,1% молочного цукру, 2,6% мінеральних речовин.

Висока поживність молока забезпечує швидкий розвиток кроленят, вже на 5-7-й день життя вони покриваються пухом і їх жива маса подвоюється, па 10-11-й день починають бачити, на15-20-й день починають вилізати з гнізда.

Кроленята народжуються голими і сліпими. Відлучають кроленят від матки у віці 1,5-2 місяці при досягненні живої маси 0,9-1,2 кг. Утримують самок окремо від самців, якщо такої можливості нема, то самців каструють. Тривалість життя кролів сягає 5-8 років, а тривалість племінного використання у відтворенні 4-7 років.

Завдання 1. Заповнити таблицю.

Порівняльний аналіз способів штучного осіменіння

Показник	Ректо-цервікальний метод	Мано-цервікальний метод
Необхідне обладнання		
Спосіб введення сперми		
Особливості техніки		
Переваги		
Недоліки		
Ризик контамінації		
Застосування замороженої сперми		

Завдання 2. Який із методів найбільшою мірою пов'язаний із використанням сучасних біотехнологій кріоконсервації сперми? Обґрунтуйте відповідь.

Завдання 3. Розподілити тварин за особливостями технології штучного осіменіння: корова, свиня, кобила, вівця, курка, індичка, гуска, качка, цесарка, кролиця. Для кожного виду визначити:

- спосіб введення сперми;
- особливості репродуктивної системи;
- орієнтовний інтервал між осіменіннями;
- особливості дозування.

ТЕМА 7: МЕТОДИ ВИЛУЧЕННЯ ЕМБРІОНІВ

Мета заняття: ознайомитися з існуючими методами вилучення ембріонів ВРХ та дати їх порівняльну оцінку.

Хірургічне вилучення ембріонів

Вилучення ембріонів з рогів матки шляхом лапаротомії по білій лінії. Витримують тварину два дні на голодній дієті, вводять їй внутрішньом'язово для заспокоєння ромпун чи комбелен. Фіксують на операційному столі в спинному положенні і проводять операцію під загальним наркозом. Підготувавши операційне поле, розрізають черевну стінку по білій лінії довжиною 15-20 см спереду молочної залози, виводять назовні один ріг матки з яйцепроводом і яєчником і підраховують в ньому кількість жовтих тіл. Фіксують тіло матки в раневому отворі, проколюють стінку рога матки біля біфуркації гострим гемостатичним пінцетом і вводять через утворений отвір стерильний катетер Фолея з надувною кулькою, нагнітають в неї повітря і приступають до вимивання ембріонів матковим чи матково-трубним методом. В першому випадку проколюють верхівку рога матки тупою голкою з оливою для введення промивної рідини і вводять у просвіт рога порційно 120-140 мл рідини Дюльбекко.

Збирають промивну рідину через катетер Фолея в стерильну посудину. Аналогічно чинять з другим рогом матки.

При матково-трубному промиванні (застосовується на 3-5-й день після осіменіння) тупу голку з еластичним шлангом вводять в ампульну частину яйцепроводу і промивають так же.

Закінчивши промивання, опускають матку на своє місце, перевіряють правильність розміщення її рогів, зрошують черевну порожнину фізіологічним розчином, впорскують у неї 1 млн ОД пеніциліну та стрептоміцину, розчинених в 20 мл новокаїну. Накладають кетгутні шви на очеревину, м'язи разом з підшкірною клітковиною, припудрюють поверхню рани порошком трициліну, накладають шовковий шов на шкіру, обробляють її 10%-ним розчином йоду і обробляють клейовим аерозолем.

Хірургічне вилучення ембріонів з рогу матки через лапаротомію в області голодної ямки (справа чи зліва). Даний метод значно простіший, менш трудомісткий і може проводитися під місцевою анестезією. Премедикація у даному випадку включає внутрішньом'язове введення ромпуна, епідуральну ін'єкцію новокаїну, паралюмбальну та інфільтраційну анестезію 20%-ним розчином новокаїну по лінії розрізу.

Фіксують тварину в станку, готують операційне поле і роблять вертикальний розріз шкіри, підшкірної клітковини та м'язового шару довжиною 15 см на віддалі 8 см спереду лінії колінного суглоба між зовнішнім горбом клубової кістки і заднім краєм ребра, на 10 см нижче поперечно-реберних відростків поперекових хребців. Підтягують гемостатичним пінцетом очеревину, розрізають її ножицями, розширюють розріз пальцями і вводять руку в черевну порожнину. Захоплюють великим та вказівним пальцями один ріг матки, підтягують його у просвіт розрізу, підраховують кількість жовтих тіл та проводять вимивання ембріонів спочатку з одного, а тоді з другого рога матки, як описано вище. Завершують операції так же, як при лапаротомії по білій лінії живота.

Кращих результатів досягають при вимиванні ембріонів з рогу матки з боку розрізу, оскільки до протилежного рогу важко добратися.

Після операції залишають тварину під наглядом протягом двох тижнів, після чого знімають шви.

Хірургічний метод вилучення ембріонів через розріз верхнього склепіння піхви (трансвагінальний метод). Фіксують тварину в станку і підраховують (ректально) кількість жовтих тіл у кожному яєчнику, наводять туалет перинеальної області, проводять епідуральну анестезію, забинтовують корінь хвоста, відводять його набік і зрошують внутрішню поверхню піхви 2%-ним розчином діоциду.

Старанно миють і обробляють руки, беруть скальпель, затискають його між складеними конусом пальцями і вводять руку в піхву. Роблять з одного боку шийки матки дорзоназальний розріз склепіння піхви довжиною 2-3 см. Виймають з піхви скальпель, вводять через розріз в черевну порожнину

спочатку два пальці, потім решту і тоді цілу руку, спеціально підготованою тупою голкою (діаметром 1-2 мм) проколюють біля біфуркації іпсілатеральний ріг матки (що з'єднаний з яєчником, в якому виявлені жовті тіла) і вводять через утворений отвір кінець катетера з надувною кулькою для вимивання ембріонів. Нагнітають в кульку 7-10 $см^3$ повітря і за допомогою шприца вливають в ріг матки теплу (37°С) промивну рідину і відсмоктують її назад.

Вимивання ембріонів з геніталій вбитих тварин виявляється ефективним, якщо після забою пройшло не більше 2,0-2,5 годин.

Нехірургічне вилучення ембріонів

Робота виконується групою з трьох чоловік: оператор і два помічники. Заводять корову в манеж, фіксують її в станку, звільняють пряму кишку від калових мас, визначають стан статевих органів та кількість жовтих тіл у кожному яєчнику. Правда, яєчники важко пальпуються і точно встановити кількість жовтих тіл, без відповідного досвіду, нелегко.

Наводять туалет перинеальної області і роблять епідуральну анестезію, вводячи 5 мл 2%-го розчину новокаїну, ксилокаїну чи медокаїну або 8-10 мл 2%-го розчину прокаїну. Для зняття напруження кишки можна ввести внутрішньом'язово 0,5-0,7 мл ромпуна чи 0,7-1,0 мл комбелену.

Беруть чистий стерильний катетер, вставляють у його просвіт металевий стилет і вводять його в піхву в напрямку шийки матки. Ліву руку вводять у пряму кишку, промацують нею катетер, скеровують його кінець в устя шийки матки, захоплюють її рукою і натягують обережно на катетер. Після цього просовують катетер на всю глибину в іпсілатеральний ріг матки, виймаючи обережно стилет. Помічник нагнітає в кульку10-15 $см^3$ повітря і, з'єднавши зовнішній кінець катетера з наповненим промивною рідиною 50-мілілітровим шприцом, вводить його вміст у порожнину рога матки і відсмоктує назад. Оператор при цьому легко масажує ріг матки і дещо підіймає його верхівку. Зливши обережно промивну рідину по стінці в стерильний циліндр чи мензурку і, накривши її стерильною фольгою, помічник знову набирає свіжу порцію розчину в шприц і промиває ним ріг матки і т. д.

На один ріг матки витрачають до 500 мл рідини. При цьому слід уникати зворотного введення відсмоктаної рідини та попадання в неї крові. Введена кількість рідини повинна відповідати кількості відсмоктаної. Якщо промивна рідина втрачається і проходить мимо кульки, то збільшують в ній тиск повітря, проте при надмірному тиску повітря можуть виникати розриви слизової оболонки.

Закінчивши промивання одного рога матки, випускають з кульки повітря і вводять в ріг суміш антибіотиків, розчинених у 20 мл 0,5%-го розчину

новокаїну. Після цього беруть інший стерильний катетер, вводять його в такій же послідовності в другий ріг матки і промивають його.

Збирають промивну рідину в стерильний мірний циліндр чи ділильну лійку і накривають фольгою.

У наведеній таблиці 1 зроблено порівняння хірургічного і нехірургічного методів вимивання ембріонів (за А. Брендом).

Таблиця 1

Порівняльна оцінка методів вимивання ембріонів

Хірургічні методи	Нехірургічні методи
Переваги	
Донор нерухомий	Донор відносно нерухомий
Забезпечення стерильності	Можливість пересаджування в умовах ферми
Безпосереднє маніпулювання з маткою	Не потрібне голодне витримування
Точна оцінка стану яєчників	Менші затрати часу
Потрібна невелика кількість промивної рідини	Немає хірургічного ризику
Недоліки	
Утворення спайок	Необхідна висока техніка маніпулювання з рогами матки
Ризиковане застосування загального наркозу	Потрібно біля 500 мл промивної рідини на один ріг
Складності застосування методу у лактуючих тварин	Важко забезпечити стерильність
Необхідне складне хірургічне обладнання	Іноді неможливо пройти цервікальний канал
Потрібне голодне витримування тварин	

Завдання 1. Установіть відповідність.

1. Лапаротомія по білій лінії	А. Вилучення ембріонів без розтину черевної стінки
2. Лапаротомія через голодну ямку	Б. Хірургічний доступ через черевну стінку
3. Трансвагінальний метод	В. Доступ через розріз верхнього склепіння піхви
4. Нехірургічний метод	Г. Може проводитися під місцевою анестезією
5. Катетер Фолея	Д. Використовується для вилучення ембріонів шляхом промивання

Завдання 2. Розташуйте етапи нехірургічного вилучення ембріонів у правильній послідовності:

А. Промивання рога матки та збір промивної рідини.

Б. Фіксація тварини.

В. Визначення стану статевих органів та кількості жовтих тіл.

Г. Підготовка перинеальної області та проведення анестезії.
Д. Введення катетера в ріг матки.
Е. Обережне вилучення промивної рідини та її збір у стерильну ємність.

Завдання 3. Розподіліть наведені характеристики у дві групи:

Хірургічні методи	Нехірургічні методи

немає хірургічного ризику;
можливе утворення спайок;
донор відносно нерухомий;
потрібне хірургічне обладнання;
можна застосовувати в умовах ферми;
необхідна висока техніка маніпулювання з рогами матки;
потрібна невелика кількість промивної рідини;
приблизно 500 мл промивної рідини на один ріг;
точна оцінка стану яєчників;
іноді неможливо пройти цервікальний канал.

ТЕМА 8: ПОШУК ТА ОЦІНКА ЕМБРІОНІВ

Мета заняття: ознайомити з методами пошуку та оцінки ембріонів, їх морфологічними ознаками й критеріями придатності до подальшого використання.

Пошук ембріонів

Вся робота по пошуку і оцінці ембріонів повинна проводитись в спеціальному стерильному боксі при температурі 25-26ºС. 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, зволоженим 70% спиртом. По французській технології передбачена вся робота з ембріонами під ламінарним потоком відфільтрованого повітря в спеціальних шафах.

При пошуку і оцінці ембріонів працюють в слідуючій послідовності. Після вимивання ембріонів з статевих шляхів корівдонорів ємкості з промивною рідиною переносять в термостат при температурі 37ºС, 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 розчерчено на квадрати 1х1 см.

Під бінокулярною 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 підвишують 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 до150 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.

Оцінка ембріонів

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 2, 3.

Таблиця 2

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)	Еспандьований ембріон
6-й	25	67	8	-	-	-
7-й	14	20	30	23	9	1
8-й	4	10	21	24	36	5
9-й			7	22	43	28

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.

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;

Таблиця 3

Показники розвитку ембріонів

Стадія розвитку	Кількість бластомерів	Діаметр, мк	Форма	Стан структур	Перевітеліновий простір
Яйцеклітина	-	120-150	приплюснута	Однорідна клітинна маса	немає
Морула	8-16	130-150	сферична	Бластомери не зрощені, легко можна порахувати	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
Еспандьваний ембріон	більше 1500	200-800	сфера або злегка видовжена	Ембріон не має прозорої болонки, оточений одним шаром клітин трофобласту	немає

- 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 (табл. 4).

Таблиця 4

Шкала оцінки якості ембріонів

Стадія розвитку	Морфологічна характеристика	Оцінка	Бал	Позначення
Морула рання МоІ пізня МоІІ	*округла форма, ціла прозора оболонка, перевітеліновий простір прозорий, бластомери чіткі, однакового розміру з наявністю полігональних зв'яз-ків, зерниста цитоплазма рівно-мірна 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	Задо-вільні	3	+-
	*деформація прозорої оболонки, часткове руйнування бласто-мерів, 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	Непри-датні	1	---
Бластоциста рання БлІ пізня БлІІ	*куляста форма, прозора обо-лонка має однакову товщину на всьому відстані, перевітеліно-вий простір вузький, прозорий, чітка диференціація клітин трофо-бласту і ембріобласту, добре розпізнається бластоціль	Відмінні	5	++
	*зона пелюцида потоншена, полость бластоцисти велика, займає весь	Добрі	4	+

	перевітеліновий простір, має гладку поверхню, чітку диференціацію клітин, бластоціль не виражена в перевітеліновому просторі грану-ли, включення, клітини трофо-бласту стиснуті мало			
	*перевітеліновий простір збіль-шений, включення, гранули, бластополость не чітка, немає диференціації між клітинами трофобласту і ембріобласту	Задо-вільні	3 2	+- +--
	*дефекти прозорої оболонки, наявність гранул, клітинних часток в перевітеліновому просторі, часткове руйнування клітин, стиснення бластомерів	Умовно придатні		
	*значні дефекти прозорої оболонки, розпад бластомерів, рихле їх з’єднання	Непри-датні	1	---

Завдання 1. Установіть відповідність між обладнанням або матеріалом та його призначенням.

Обладнання / матеріал	Призначення
1. Термостат	А. Первинний пошук ембріонів
2. Чашка Петрі з розміткою	Б. Осадження ембріонів
3. Стереоскопічний мікроскоп	В. Відстоювання промивної рідини
4. Шприц зі скляною прозорою голкою	Г. Перенесення знайдених ембріонів
5. Інвертований мікроскоп	Д. Детальна оцінка якості ембріонів
6. Поживне середовище	Е. Короткотермінове зберігання ембріонів

Завдання 2. Визначте, чи відповідає наведена ознака повноцінному ембріону.

Ознака	Повноцінний	Неповноцінний
Чітка куляста форма		
Світла однорідна цитоплазма		
Пошкоджена прозора оболонка		
Бластомери однакового розміру		
Щільний міжклітинний комплекс		
Нерівномірне дроблення		
Грануляція цитоплазми		
Порушення зв’язку між бластомерами		
Непошкоджена прозора оболонка		
Бластомери різного розміру		

Завдання 3. Установіть відповідність між віком ембріона та стадією його розвитку.

Вік ембріона	Стадія
1. 4-7 день	А. Бластоциста
2. 7-8 день	Б. Пізня бластоциста
3. 8-9 день	В. Морула
4. 9-10 день	Г. Рання бластоциста
5. 10-11 день	Д. Ембріон, що виходить із прозорої оболонки

ТЕМА 9: МІКРОХІРУРГІЧНЕ ДІЛЕННЯ, КРІОКОНСЕРВАЦІЯ ЕМБРІОНІВ ТА ПЕРЕСАДКА РЕЦИПІЄНТАМ

Мета заняття: оволодіти методикою мікрохірургічного ділення ембріонів, їх кріоконсервації та трансплантації цілих ембріонів і їх половинок реципієнтам.

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 фіксуючі 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 мікрохрургічні інструменти вводять в зародок повільно з перервами по часу на 8-20 сек, дозволяючи клітинам по можливості відхилятись від ділячого інструмента.

Ділення ембріонів краще проводити в охолодженому розчині Дюльбекко, тому що при температурі середовища вище 20ºС 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 вазелиновим маслом. Використовують при роботі пневмоманіпулятори під контролем мікроскопа з збільшенням 80-100 кратністю.

В практиці застосовують слідуючі 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 6-12º. 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 тонкій частині, 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 реціпієнтам. Прозора оболонка важлива при пересадці та подальшому розвитку четвертинок ембріону. Виживаємість 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 фіксуючої 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 37,5ºС 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 реціпієнтам в роги матки або дві половинки пересаджують одному реціпієнту в 1 ріг чи в два роги.

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 холодових 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 навколоклітинному 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 навколоклітинне середовище.

Щоб запобігти кристалізації води в склад середовища вводять кріопротектори гліцерин або диметілсульфоксид (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 останьому 15-20 хвилин. При відтаюванні ембріонів їх поступово переносять в розчин з зменшенням вмісту кріопротектору.

Розчини кріопротекторів готують на фосфатносольовому буфері Дюльбекко (ФСБ), використовують хімічно чистий диметилсульфоксид – (CH_3) 2CO 78,136 спочатку готується 3М розчин – 15,74 мл ФСБ і 4,26 мл ДМСО. Рідкий ДМСО має питому вагу 1,1 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 4 мл 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 20ºС до 7ºС з швидкістю 1ºС за хвилину, викликають штучну кристалізацію і тоді охолоджують з швидкістю 0,3ºС за хвилину до – 36ºС, а далі з швидкістю 0,1ºС за хвилину до -60ºС і переносять в рідкий азот, температура -196ºС. Відтаюють ембріон в спиртовій бані з температурою –50ºС з швидкістю 4ºС за хвилину до –10ºС, після чого переносять на 5 хв. в водяну баню з температурою +20ºС. Після переносять ембріон в середовище для видалення кріопротектору.

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

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 телицямреципієнтам, коровам і кобилам.

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 техніка.

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 приживленність 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 стойлі, миють теплою водою з милом зовнішні статеві органи, витирають серветкою і дезинфікують. Після цього роблять сакральну анестезію 2% розчином новокаїну 5-7 мл, а сильнозбудливим реціпієнтам вводять внутрішньом'язево міорелаксант комбелен 0,5 обо 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 чохлів – французька фірма IMB, 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 дезинфікують і покривають силіконом. Пайєту, в якій знаходиться ембріон, вставляють в наконечник катетера і приєднують до нього поршень, легко натискаючи на поршень, перевіряють, чи виходить крапля середовища з пайєти. Назовні 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

команду помічнику натискати на поршень, щоби ембріон з середовищем ввести в матку.

Не рекомендується на протязі двох місяців після пересадки перегруповувати, 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.

Завдання 1. Установіть відповідність.

Мікроінструмент	Призначення
1. Фіксуюча мікропіпетка	А. Перенесення половинок і четвертинок
2. Мікроніж	Б. Фіксація ембріона
3. Ін’єкційна піпетка	В. Розділення ембріона
4. Скляна мікроголка	Г. Мікрохірургічні маніпуляції

Завдання 2. Розташуйте етапи мікрохірургічного ділення ембріона:

А) оцінювання отриманих половинок;

Б) фіксація ембріона мікропіпеткою;

В) розділення ембріона на частини;

Г) підготовка мікроінструментів;

Д) подальше культивування або пересадка.

Завдання 3. Заповніть пропуски:

Для мікрохірургічного ділення відбирають ембріони _____ якості.

Мікроінструменти виготовляють за допомогою _____.

Для зменшення пошкодження бластомерів використовують _____ мікроголки та мікроножі.

Кращою стадією для кріоконсервації є _____ віком 7-8 днів.

Основними кріопротекторами є _____ та _____.

ТЕМА 10: КЛОНУВАННЯ ТВАРИН

Мета заняття: ознайомити здобувачів освіти з основними методами клонування тварин, принципами перенесення ядер соматичних клітин і розщеплення ембріонів, а також перспективами та обмеженнями застосування клонування у тваринництві й біотехнології.

Клонування – це сукупність біотехнологічних методів, спрямованих на отримання генетично однорідних копій клітин, тканин, ембріонів або організмів. Термін «клон» уперше використав Г. Вебер у 1903 р. для позначення генетично однорідного потомства рослин, отриманого вегетативним шляхом. У сучасній біотехнології поняття клонування охоплює різні процеси – від копіювання окремих генів і клітин до отримання генетично подібних багатоклітинних організмів.

У природних умовах генетично ідентичні організми можуть виникати внаслідок безстатевого розмноження або формування монозиготних близнюків. Штучне клонування дає змогу цілеспрямовано отримувати генетично подібних тварин, що має особливе значення у селекції та розведенні сільськогосподарських тварин.

Статеве розмноження забезпечує генетичну різноманітність потомства завдяки кросинговеру, незалежному розходженню хромосом під час мейозу, випадковому поєднанню гамет та рекомбінації генетичного матеріалу під час запліднення. Така мінливість є необхідною умовою розвитку й адаптації популяцій, однак водночас вона перешкоджає точному відтворенню у потомстві цінних генетичних комбінацій окремої тварини. Тому в селекції виникла потреба в методах, які дозволяють отримувати генетично подібних нащадків від особливо цінних тварин.

Клонування тварин здійснюють двома основними способами: ***розщепленням ембріона та перенесенням ядра соматичної клітини.***

Розщеплення ембріонів. Розщеплення ембріона є штучним відтворенням природного процесу утворення монозиготних близнюків. На ранній стадії розвитку ембріон за допомогою мікрохірургічних методів розділяють на дві або більше частин. Кожна частина за сприятливих умов може продовжити самостійний розвиток. У результаті отримують генетично подібних ембріонів, які після трансплантації самкам-реципієнтам можуть розвинутися в генетично подібних тварин.

Метод розщеплення ембріонів особливо перспективний у тваринництві для збільшення кількості потомків від генетично цінних самок. Для цього відбирають ембріони високої якості на стадії морули або ранньої бластоцисти, після чого проводять їх мікрохірургічний поділ. Отримані половинки ембріона культивують і трансплантують самкам-реципієнтам.

Дослідження з поділу ембріонів великої рогатої худоби показали, що цей метод може бути використаний для отримання генетично подібних телят. У практичних умовах ембріони можуть бути відібрані, оцінені за якістю,

розділені та після короткочасного культивування трансплантовані коровам-реципієнтам.

Перенесення ядер соматичних клітин. Більш складним методом є перенесення ядра соматичної клітини (somatic cell nuclear transfer, SCNT). Соматичні клітини містять повний набір хромосом і генетичну інформацію організму. Тому теоретично ядро диференційованої клітини може бути використане для відтворення генетично подібного організму за умови його відповідного перепрограмування.

Основні етапи перенесення ядра полягають у видаленні власного ядерного матеріалу з незапліднені яйцеклітини, перенесенні до неї ядра соматичної клітини донора, активації реконструйованої яйцеклітини та подальшому культивуванні ембріона. Після досягнення відповідної стадії розвитку ембріон переносять у репродуктивний тракт самки-реципієнта, де він може продовжити внутрішньоутробний розвиток.

У процесі клонування розрізняють донора ядра, донора яйцеклітини та самку-реципієнта. Донор ядра визначає основну ядерну генетичну інформацію майбутнього клону. Яйцеклітина забезпечує цитоплазму, органели та мітохондріальну ДНК, а самка-реципієнт створює умови для імплантації та розвитку ембріона.

Перші фундаментальні дослідження з трансплантації ядер були проведені на амфібіях. У 1952 р. Р. Бріггс і Т. Кінг розробили метод пересадження ядер ембріональних клітин у яйцеклітини жаби з видаленим ядром. За допомогою мікропіпетки з яйцеклітини видаляли ядро, після чого переносили ядро клітини ембріона. Результати показали, що ядра клітин ранніх ембріонів зберігають здатність керувати розвитком нового організму.

Подальші дослідження Дж. Гердона продемонстрували можливість використання ядер диференційованих клітин. У його експериментах із жабами ядра соматичних клітин дорослих тварин переносили в енуклейовані яйцеклітини. Частина реконструйованих яйцеклітин продовжувала розвиток, що стало важливим доказом збереження генетичної інформації в ядрі диференційованої клітини.

Перенесення ядер у ссавців виявилося значно складнішим через малі розміри яйцеклітин, особливості раннього ембріонального розвитку та необхідність точного перепрограмування ядра. У 1980-х роках були отримані перші клони ссавців із використанням ядер ембріональних клітин. Для перенесення ядер застосовували мікрохірургічні методи, електричну активацію та злиття клітин.

Одним із важливих етапів розвитку цієї технології стали дослідження з

клонування овець. Загальна схема клонування на основі перенесення ядра ембріональної клітини передбачала отримання бластомерів із раннього ембріона, енуклеацію яйцеклітини-реципієнта, злиття без'ядерної яйцеклітини з клітиною-донором за допомогою електричного імпульсу або іншого способу активації, культивування реконструйованого ембріона та його подальшу трансплантацію самці-реципієнту.

Особливо важливим результатом стала поява у 1996 р. вівці Доллі, отриманої вченими Рослінського інституту в Шотландії під керівництвом Яна Вілмута. Для її створення використали ядро соматичної клітини молочної залози дорослої вівці. Ядро перенесли в яйцеклітину іншої вівці після видалення її власного ядра. Реконструйовану яйцеклітину активували та після початкового розвитку ембріона перенесли в матку самки-реципієнта.

Отримання Доллі мало принципове значення для біології, оскільки продемонструвало, що ядро диференційованої клітини дорослого організму за відповідного перепрограмування може забезпечити розвиток нового організму. Водночас ефективність технології залишалася низькою: значна частина реконструйованих яйцеклітин і ембріонів не завершувала розвиток.

Після отримання Доллі технологію перенесення ядер застосували до різних видів ссавців. Клонованих тварин отримували серед мишей, великої рогатої худоби, кіз, свиней, котів, кролів, собак та інших видів. Розвиток цих досліджень сприяв удосконаленню репродуктивної біотехнології, ембріології та клітинної інженерії.

Клонування сільськогосподарських тварин

У тваринництві клонування розглядають насамперед як спосіб розмноження генетично цінних тварин. Особливо важливим є збереження та відтворення цінних генотипів, сформованих у результаті тривалої селекційної роботи.

Клонування може бути корисним для отримання кількох генетично подібних тварин від особливо цінного донора, проведення наукових досліджень, збереження генетичного матеріалу та створення стандартизованих експериментальних моделей. Генетична подібність тварин зменшує вплив генетичної мінливості на результати дослідів і дає змогу точніше оцінювати вплив годівлі, утримання, лікарських засобів або інших факторів.

Окремим напрямом є використання клонування для збереження генетичних ресурсів. Кріоконсервація соматичних клітин або інших біологічних матеріалів дає можливість тривалого зберігання генетичної інформації цінних особин. У подальшому ці клітини можуть бути використані для отримання клонованих тварин. Однак клонування не відновлює

генетичного різноманіття популяції, тому його не можна розглядати як самостійний універсальний метод збереження видів.

Перспективним є поєднання технології перенесення ядер із генетичною модифікацією. Це дає можливість створювати тварин із заданими генетичними ознаками, які можуть використовуватися в наукових дослідженнях, біомедицині та сільському господарстві.

Обмеження та проблеми клонування

Незважаючи на значні перспективи, клонування тварин має низку обмежень. Основною проблемою є низька ефективність перенесення ядер. Значна частина реконструйованих яйцеклітин не розвивається до стадії життєздатного ембріона. Навіть після успішної імплантації можливі порушення ембріонального розвитку, викидні, загибель новонароджених та фізіологічні відхилення.

Однією з основних причин низької ефективності є неповне або неправильне епігенетичне перепрограмування ядра соматичної клітини. Ядро диференційованої клітини містить повний набір генів, однак частина з них у процесі диференціації вимикається або регулюється специфічним чином. Для нормального розвитку ембріона необхідно відновити відповідний стан експресії генів.

Клонований організм також не є абсолютно ідентичною копією донора в усіх аспектах. Ядерна ДНК переважно походить від донора ядра, тоді як мітохондріальна ДНК – від яйцеклітини. Крім того, фенотип тварини формується під впливом генотипу, внутрішньоутробного середовища, годівлі, умов утримання та інших факторів. Тому генетична подібність не означає повної ідентичності фізіологічних, поведінкових або продуктивних характеристик.

Важливим є також питання добробуту тварин та біоетики. Використання великої кількості яйцеклітин, ембріонів і тварин-реципієнтів при низькій ефективності технології потребує обґрунтування доцільності таких досліджень та дотримання принципів гуманного поводження з тваринами.

Клонування людини є окремою етичною та правовою проблемою. Репродуктивне клонування людини заборонене або суттєво обмежене законодавством багатьох держав, зокрема України.

Таким чином, клонування тварин є складним напрямом клітинної та репродуктивної біотехнології, що ґрунтується на використанні потенціалу ранніх ембріональних клітин або перепрограмуванні ядер соматичних клітин. Основними методами є розщеплення ембріонів і перенесення ядер соматичних клітин в енуклейовані яйцеклітини. Для тваринництва ці технології мають

значення насамперед для розмноження генетично цінних тварин, збереження генетичних ресурсів, проведення наукових досліджень та створення стандартизованих біологічних моделей. Водночас низька ефективність, ембріональні втрати, складність перепрограмування ядер, висока вартість та етичні питання обмежують широке практичне застосування клонування. Подальший розвиток цього напряму пов’язаний із підвищенням ефективності перенесення ядер, удосконаленням культивування ембріонів, кріоконсервації та контролю епігенетичного перепрограмування.

Завдання 1. Встановіть відповідність:

Поняття	Характеристика
1. Клон	А. Клітина, ядро якої використовують для клонування
2. Донор ядра	Б. Генетично однорідний організм
3. Енуклеована яйцеклітина	В. Яйцеклітина, позбавлена власного ядра
4. Соматична клітина	Г. Клітина організму, що не є статевою
5. Сурогатна мати	Д. Самка, у матку якої переносять ембріон

Завдання 2. Заповніть пропуски:

Клонування – це отримання генетично _____ організмів.

Для перенесення ядра використовують _____ клітину.

Перед перенесенням ядра яйцеклітину _____ власного ядра.

Донором ядра може бути _____ клітина.

Першою широко відомою клонованою твариною з ядра дорослої соматичної клітини була вівця _____.

Завдання 3. Встановіть, якому етапу відповідає кожна характеристика:

1. Видалення ядра з яйцеклітини.
2. Отримання клітини від тварини з бажаними генетичними ознаками.
3. Об’єднання ядра донора з енуклеованою яйцеклітиною.
4. Перенесення ембріона в організм реципієнта.

Варіанти:

А – підготовка яйцеклітини;

Б – вибір донора ядра;

В – реконструкція ембріона;

Г – трансплантація.

ТЕМА 11: ОДЕРЖАННЯ ХИМЕРНИХ ТВАРИН

Мета заняття: ознайомити здобувачів освіти з поняттям химеризму, основними способами створення химерних тварин, особливостями агрегаційного та ін'єкційного методів.

Термін **«химера»,** або генетичний мозаїк, використовують для позначення організму, який складається з генетично різних клітинних популяцій, що походять більш ніж від однієї заплідненої яйцеклітини. У генетичному розумінні химери виникають унаслідок об'єднання двох або більше ранніх ембріонів, тому їхній організм містить клітини з різним генотипом.

За класифікацією К. Форда виділяють ***первинний і вторинний*** химеризм.

При **первинному химеризмі** генетично різні клітинні популяції поєднуються на ранніх етапах розвитку – від моменту запліднення або на початку ембріогенезу. У природних умовах такі випадки трапляються дуже рідко. Первинні химери можуть також бути створені експериментально шляхом штучного об'єднання генетично різних ембріонів.

Вторинний химеризм характеризується поєднанням клітин або тканин, які походять від двох чи більше зародків, уже після початку їхньої диференціації. Такий тип химеризму більш характерний для химер, що виникають природним шляхом.

У сучасній біотехнології основну увагу приділяють створенню химер на основі первинного химеризму. Суть цього підходу полягає у штучному поєднанні двох або більше генетично різних ранніх ембріонів або у введенні клітин внутрішньої клітинної маси бластоцисти донора в бластоцель ембріона-реципієнта. У результаті формується організм, клітини якого можуть походити від різних генотипів.

Химерні тварини мають важливе значення для біологічних і генетичних досліджень. На них можна вивчати процеси диференціювання клітин і формування тканин, закономірності розвитку організму від ранніх ембріональних стадій, особливості експресії генів на клітинному рівні, міжклітинні взаємодії та прояв плейотропної дії генів.

Химери розглядають як своєрідні вегетативні гібриди, що виникають у результаті об'єднання генетично різних клітин без проходження мейозу. Особливістю таких організмів є те, що характерна для них генетична мозаїчність не передається потомству як єдина ознака всього організму. Тому властивості, сформовані внаслідок химеризму, проявляються переважно в

конкретному поколінні.

Створення химер становить інтерес і для тваринництва, оскільки теоретично дає можливість поєднувати в одному організмі цінні господарські ознаки, які зазвичай властиві різним генотипам або слабко проявляються у звичайних тварин. Особливо цікавим є поєднання таких ознак, як молочна та м'ясна продуктивність великої рогатої худоби, якість вовни та м'ясна продуктивність овець. Ін'єкційне створення химер із використанням певних клітинних ліній також розглядається як перспективний напрям досліджень щодо підвищення резистентності тварин до захворювань та особливостей функціонування їхньої імунної системи.

Існують два основні методи одержання химер – **агрегаційний та ін'єкційний.** Обидва методи спочатку були розроблені та досліджені на лабораторних мишах, а згодом їх почали застосовувати під час роботи з іншими видами тварин.

Агрегаційний метод ґрунтується на об'єднанні ранніх ембріонів, що перебувають на стадії дроблення. Цей підхід був розроблений В. Тарковським і Б. Мінц у 1961-1962 роках для одержання химерних мишей. Якщо для створення химери використовують ембріони двох різних ліній, її позначають символом А ↔ В, де А і В відповідають вихідним генетично різним лініям.

Для проведення агрегації отримують ембріони з різними генотипами, які перебувають на ранній стадії дроблення. З ембріонів видаляють зону пеллюцида, після чого морули різного походження зближують між собою та створюють умови для їхнього об'єднання. У результаті контакту клітинних поверхонь відбувається агрегація ембріонів і формується єдиний химерний зародок.

Після агрегації такі ембріони культивують у відповідному поживному середовищі. У процесі подальшого розвитку вони можуть досягати стадії бластоцисти. Сформовані бластоцисти використовують для подальшого перенесення в організм самки-реципієнта, де за сприятливих умов продовжується їхній розвиток.

Химери, отримані агрегаційним методом, можуть формуватися не лише внаслідок об'єднання двох ембріонів. У дослідженнях описано випадки створення химер шляхом об'єднання більшої кількості ембріонів.

Однією з проблем агрегаційного методу є недостатньо ефективна імплантація химерних бластоцист у стінку матки реципієнта. Значна частина таких ембріонів може загинути ще в пренатальний період. У дослідженнях на мишах частота народження химер становила приблизно 3-6 % від кількості трансплантованих агрегаційних бластоцист.

Ін'єкційний метод є складнішим і потребує використання мікроманіпуляційної та мікрохірургічної техніки. Водночас він дає змогу вирішувати завдання, для яких агрегаційний метод є недостатньо ефективним. Метод був запропонований Р. Гарднером.

Основою ін'єкційного способу є перенесення клітин внутрішньої клітинної маси бластоцисти донора в бластоцель ембріона-реципієнта. Таким чином клітини донора включаються до структури ембріона реципієнта і в подальшому можуть брати участь у формуванні різних тканин організму.

Застосування мікроманіпуляторів дає можливість виконувати необхідні маніпуляції з бластоцистою та забезпечувати введення донорських клітин у відповідну ділянку ембріона. Після завершення маніпуляції ембріон продовжує розвиток, а клітини двох генетично різних джерел можуть спільно брати участь у формуванні його тканин.

Ін'єкційний метод особливо важливий у тих випадках, коли використання агрегаційного способу не дає бажаного результату. Зокрема, для деяких видів тварин видалення зони пеллюцида може негативно впливати на подальший розвиток ембріона, що обмежує можливість застосування агрегаційної технології.

Важливим напрямом досліджень є створення **міжпорідних і міжвидових химер.** Перші генетично ідентифіковані химерні організми були отримані на лабораторних мишах різних ліній, зокрема з відмінним забарвленням шерсті. Химерні миші могли мати плямисте забарвлення, яке поєднувало ознаки обох вихідних ліній і не було характерним для жодної з них окремо.

Химеризм може проявлятися не тільки у загальному забарвленні тварини, а й на рівні окремих волосин. У химер, отриманих від пігментованої та непігментованої ліній, одні волосини могли бути повністю пігментованими, інші – позбавленими пігменту, а частина мала змішаний, плямистий характер забарвлення.

У химер агуті ↔ неагуті також спостерігали різний ступінь прояву ознак забарвлення шерсті. Це пов'язують із різним співвідношенням клітин, що походять від вихідних генотипів, у структурі волосяних фолікулів.

Якщо химеризм охоплює кілька генетичних локусів, які контролюють пігментацію, можуть виникати складні взаємодії між клітинними популяціями. При цьому утворення пігменту визначається генотипом меланоцитів, тоді як особливості його розподілу у волоссі залежать від клітин, що формують волосяний фолікул.

Завдання 1. Заповніть таблицю:

Ознака	Агрегаційний метод	Ін'єкційний метод
Основний принцип		
Вихідний матеріал		
Стадія розвитку ембріона		
Необхідність мікроманіпуляцій		
Основна особливість		
Переваги		
Обмеження		

Завдання 2. Складіть послідовність етапів одержання химерної тварини агрегаційним методом:

Отримання генетично різних ембріонів → _____ → _____ → культивування → формування бластоцисти → _____ → розвиток химерного організму.

Завдання 3. Складіть схему ін'єкційного методу, використовуючи такі поняття:

бластоциста-реципієнт, клітини внутрішньої клітинної маси, донорська бластоциста, мікроманіпуляція, бластоцель, культивування, перенесення ембріона.

ТЕМА 12: ОДЕРЖАННЯ ТРАНСГЕННИХ ТВАРИН

Мета заняття: ознайомити здобувачів вищої освіти з принципами трансгенезу, основними методами перенесення генів та особливостями одержання і використання трансгенних тварин.

Трансгенез – це сукупність методів, за допомогою яких у геном організму вводять чужорідну (екзогенну) ДНК для надання йому певних генетично зумовлених ознак. Тварину, геном якої містить введений чужорідний ген або генетичну конструкцію, називають трансгенною, а введений ген – трансгеном. Розвиток генної інженерії, технологій рекомбінантної ДНК та перенесення ядер клітин створив можливості для цілеспрямованої зміни генотипу сільськогосподарських тварин.

Основою одержання трансгенних тварин є введення необхідної

генетичної конструкції в ембріональний матеріал із подальшим розвитком ембріона та отриманням потомства. Для формування стабільної трансгенної лінії важливо, щоб введений ген був присутній не лише в окремих клітинах організму, а й у клітинах зародкової лінії, завдяки чому він може передаватися наступним поколінням.

Одним із класичних способів перенесення генів є мікроін'єкція рекомбінантної ДНК у пронуклеус зиготи. Для цього необхідно отримати запліднені яйцеклітини на відповідній стадії розвитку, коли в них сформовані пронуклеуси. Паралельно готують генетичну конструкцію, яка містить структурну частину необхідного гена та регуляторні елементи, що забезпечують його функціонування. Підготовлена ДНК повинна бути очищеною від сторонніх частинок і домішок, які можуть перешкоджати проведенню мікроманіпуляцій.

Безпосереднє введення генетичної конструкції здійснюють за допомогою інверсійного мікроскопа, мікроманіпуляторів, фіксуючої та ін'єкційної мікропіпеток. Зиготу фіксують, після чого ін'єкційну піпетку спрямовують до пронуклеуса та вводять генетичну конструкцію. Після проведення маніпуляції ембріон продовжує розвиток, а надалі його можуть переносити реципієнту відповідно до технології відтворення тварин.

Крім мікроін'єкції, для перенесення генів можуть використовуватися вірусні вектори, зокрема ретровірусні системи, а також генетично модифіковані ембріональні клітини, які вводять у ембріон. Вибір методу залежить від виду тварини, особливостей генетичної конструкції та мети дослідження.

Важливе значення під час створення трансгенних тварин має генетична конструкція. Типовий ген складається зі структурної частини, яка визначає синтез відповідного продукту, та регуляторних ділянок, що контролюють його експресію. Тому для отримання необхідної ознаки важливо забезпечити не тільки інтеграцію чужорідної ДНК у геном, а й можливість її нормального функціонування в клітинах організму.

Трансгенні технології мають значні перспективи у сільському господарстві, ветеринарії та біотехнології. Одним із напрямів є створення тварин із підвищеною стійкістю до захворювань. ***Резистентність*** – це спадково зумовлена несприйнятливість або підвищена стійкість організму до певних мікроорганізмів, вірусів, паразитів чи токсичних факторів. Генетичне підвищення резистентності може сприяти зменшенню захворюваності та виробничих втрат у тваринництві.

Іншим перспективним напрямом є зміна складу та властивостей молока. За допомогою трансгенезу дослідники намагаються отримувати тварин із

певними змінами молочної продуктивності та складу молока, що може мати значення для харчової та біотехнологічної промисловості.

Трансгенних сільськогосподарських тварин також розглядають як продуцентів біологічно активних речовин і медичних препаратів. Введення відповідного гена дає можливість досліджувати синтез необхідних білків у клітинах тварин. Зокрема, експериментально було показано, що ген людського інсуліну може функціонувати в організмі миші, що підтвердило можливість експресії чужорідного гена в клітинах тварини.

Дослідження трансгенезу проводили на різних видах сільськогосподарських тварин.

Одержання трансгенних кролів. Під час досліджень з одержання трансгенних кролів використовували генетичну конструкцію, яка містила промотор металотіонеїну миші та структурну частину гена гормону росту людини. У результаті проведених експериментів чужорідний ген інтегрувався в геном приблизно у 12,8% випадків. Цей показник був більш ніж удвічі нижчим порівняно з мишами, у яких частота інтеграції гена гормону росту людини становила близько 27%.

Одержання трансгенних овець. У 1986 році австралійськими дослідниками було отримано трансгенну вівцю. У генетичній конструкції використовували ген гормону росту вівці, функціонування якого регулювалося промотором металотіонеїну. Через п'ять тижнів після народження ягняті додавали до раціону невелику кількість цинку. Передбачалося, що цинк активуватиме регуляторну послідовність рекомбінантної ДНК, унаслідок чого посилюватиметься експресія гена гормону росту та його синтез.

У подальшому було відзначено збільшення маси трансгенної вівці. Через три роки після народження її маса приблизно у 1,5 рази перевищувала масу ровесників тієї самої породи. Подібні дослідження були спрямовані на вивчення можливості створення трансгенних овець із підвищеними темпами росту та продуктивністю вовни.

Одержання трансгенних свиней. Під час роботи із зиготами свиней важливим етапом є виявлення пронуклеусів, які використовують як мішень для введення генетичного матеріалу. Для полегшення їх візуалізації застосовували центрифугування зигот, після чого проводили мікроін'єкцію рекомбінантної ДНК у пронуклеуси.

За наведеними в дослідженнях даними, після мікроін'єкції приблизно 10-20% зигот продовжували розвиток до стадії бластоцисти. Після перенесення ембріонів реципієнтам близько 6-11% випадків завершувалися народженням

трансгенних свиней. Середня частота інтеграції чужорідного гена у свиней становила близько 10%.

Одержання трансгенної великої рогатої худоби. У зигот великої рогатої худоби міститься значна кількість цитоплазматичних включень, що ускладнює візуалізацію пронуклеусів. Застосування центрифугування дає змогу краще виявити структури, пов'язані з розташуванням пронуклеусів, і полегшує проведення подальших мікроманіпуляцій.

У ранніх дослідженнях у чоловічий пронуклеус зиготи корови вводили рекомбінантну ДНК, яка містила ген металотіонеїну МТ-1 миші та ген тимідинкінази вірусу герпесу. Через 24 години після введення генетичної конструкції у частині ранніх ембріонів було виявлено підвищену активність вірусного гена. Ці результати продемонстрували принципову можливість експресії введеної генетичної конструкції в ембріонах великої рогатої худоби.

Незважаючи на значні перспективи, одержання трансгенних тварин залишається складним біотехнологічним процесом. Ефективність інтеграції чужорідної ДНК є відносно низькою, а введення трансгену не завжди забезпечує його стабільну експресію. Крім того, можливе виникнення небажаних генетичних ефектів і порушень розвитку. Тому використання трансгенних технологій потребує ретельного контролю, оцінювання біологічних наслідків та дотримання вимог біобезпеки й етичних норм.

Завдання 1. Складіть послідовність основних етапів одержання трансгенної тварини методом мікроін’єкції:

отримання зиготи → _____ → _____ → введення генетичної конструкції → _____ → перенесення ембріона реципієнту → розвиток трансгенної тварини.

Завдання 2. Заповніть таблицю:

Метод перенесення генів	Суть методу	Основний об’єкт/матеріал
Мікроін’єкція		
Вірусні вектори		
Використання генетично модифікованих ембріональних клітин		

Завдання 3. Встановіть відповідність:

1. Трансген
2. Промотор
3. Пронуклеус
4. Реципієнт

5. Трансгенна тварина

А. Тварина, яка містить у геномі введену генетичну конструкцію.

Б. Регуляторна ділянка ДНК, яка бере участь у контролі експресії гена.

В. Введена чужорідна генетична послідовність.

Г. Ядро гаплоїдного походження у заплідненій яйцеклітині до їх злиття.

Д. Самка, якій переносять ембріон для подальшого розвитку.

РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Біоетика, біобезпека і благополуччя в тваринництві : навчальний посібник / Р. А. Санжара, О. В. Лесновська, Р. В. Милостивий та ін. Київ-Дніпро : НУБіП України-ДДАЕУ, 2025. 203 с.

2. Біотехнологія. Словник термінів: навч. посіб. для студентів спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» / Л. В. Капрельянц, Т. О. Велічко, О. О. Килименчук, Л. Г. Пожіткова ; під ред. Л. В. Капрельянца. Харків : Факт, 2021. 248 с.

3. Біотехнологічні методи у ветеринарній репродуктології : навчальний посібник / В. В. Ковпак та ін. Київ : Видавничий центр НУБіП України, 2020. 102 с.

4. Вирішення проблем з відтворення сільськогосподарських тварин із застосуванням біотехнологічних методів : монографія / М. В. Себа та ін. Київ : ТОВ ЦП Компринт, 2021. 143 с.

5. Генетичні дослідження в біотехнології : конспект лекцій / уклад. І. Р. Клечак та ін. Київ : КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2025. 66 с.

6. Люта І. М. Ембріологічна характеристика результатів трансплантації ембріонів великої рогатої худоби. *Вісник аграрної науки Причорномор'я.* 2016. Вип. 2(2). С. 16-22.

7. Нормативне забезпечення біотехнологічних виробництв : курс лекцій для здобувачів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти ОПП «Біотехнології та біоінженерія» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» денної форми здобуття вищої освіти / уклад. О. І. Юлевич, І. М. Люта. Миколаїв : МНАУ, 2025. 108 с.

8. Основи біотехнології тварин : метод. реком. для виконання лабор.-практ. робіт для здобувачів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти ОПП «Біотехнології та біоінженерія» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» денної форми здобуття вищої освіти / уклад. : С. І. Луговий, І. М. Люта. Миколаїв : МНАУ, 2023. 41 с.

9. Оцінка життєздатності сперматозоїдів кнурів за різних режимів розморожування / О. В. Щербак та ін. Фактори експериментальної еволюції організмів : зб. наук. пр. / НААН України. Київ : Логос, 2020. Т. 27. С. 287-292. URL: https://doi.org/10.7124/FEEO.v27.1341.

10. Trotskyi P. A., Shcherbak O. V., Lyuta I. M. Biotechnological approaches to the preservation and use of bovine ovarian cumulus-oocyte complexes in the system of reproductive technologies. *Agricultural Science and Practice*. 2020. Vol. 7, no. 3. P. 54-61. URL: https://doi.org/10.15407/agrisp7.03.054.

Навчальне видання

ОСНОВИ БІОТЕХНОЛОГІЇ ТВАРИН

методичні рекомендації для виконання лабораторно-практичних та самостійних робіт для здобувачів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти ОПП «Біотехнології та біоінженерія»
спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»
денної форми здобуття вищої освіти

Укладачі:
Каратєєва Олена Іванівна
Люта Ірина Миколаївна

Підписано до друку 21.11.2023 р. Формат 60×84/16. Папір офсетн.
Гарнітура Times New Roman.
Друк офс. Умовн. друк. арк. 4,0. Облік видавн. арк. 4,0
Умов. фарбовід. 0,9. Зам. № 528, тир. 20.

Надруковано у видавничому відділі
Миколаївського національного аграрного університету
54008, м. Миколаїв, вул. Георгія Гонгадзе, 9

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 4490 від 20.02.2013 р.