

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
МИКОЛАЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ

**Факультет технології виробництва і переробки
продукції тваринництва, стандартизації та біотехнології**

Кафедра зоогігієни та ветеринарії

БІОТЕХНОЛОГІЯ РЕПРОДУКЦІЇ
ОРГАНІЗМІВ

**Методичні рекомендації до лабораторних занять та
самостійної роботи для здобувачів ступеня вищої
освіти «бакалавр» освітньої спеціальності
162 «Біотехнологія та біоінженерія»**

Миколаїв
2016

УДК 636.082(038)

ББК 45.337

Б 63

Друкується за рішенням науково-методичної комісії факультету ТВПШТСБ Миколаївського національного аграрного університету від 25 лютого 2016 р., протокол № 6.

Укладачі:

В.О. Мельник – канд. біол. наук, доцент кафедри зоогієни та ветеринарії, Миколаївський національний аграрний університет;

О. О. Кравченко – канд. с.-г. наук, доцент кафедри генетики, годівлі тварин та біотехнології, Миколаївський національний аграрний університет.

Рецензенти:

І. М. Рожков – доктор біологічних наук, професор, професор кафедри ТМФВ та здоров'я людини, Миколаївський національний університет ім. В.О. Сухомлинського;

Г. А. Коцюбенко – доктор с.-г. наук, доцент кафедри птахівництва, якості та безпечності продукції, Миколаївський національний аграрний університет.

ЗМІСТ

Вступ	4
Тема 1. Фізіологічні основи трансплантації ембріонів	5
Тема 2. Методи викликання суперовуляції у тварин-донорів	8
Тема 3. Синхронізація статевої охоти донорів та реципієнтів	
Штучне осіменіння донорів	14
Тема 4. Методи видобування ембріонів	18
Тема 5. Технологія роботи з ембріонами	21
Тема 6. Прижиттєва оцінка життєздатності ембріонів	27
Тема 7. Мікрохірургічне ділення, кріоконсервація ембріонів	
та пересадка реципієнтам	30
Тема 8. Облік та звітність при трансплантації ембріонів	37
Контрольні питання для перевірки знань здобувачів ступеня вищої освіти	50
Список рекомендованої літератури	54

ВСТУП

На сучасному етапі в тваринництві широко застосовуються досягнення в області ембріогенетики – від розробки технології і трансплантації ембріонів до використання методів клітинної та генної інженерії.

Основні прийоми селекційно-племінної роботи довготривалі та важкі у виконанні. Але такі прийоми, як штучне осіменіння, дає можливість покращити генотип тварин за рахунок одержання великої кількості нащадків від цінного плідника, а трансплантація ембріонів – від найкращих самиць-рекордисток. Тому перспективним методом є проведення селекційної роботи на ембріональному рівні, бо в яйцеклітинах та ембріонах зосереджена вся спадкова інформація майбутньої тварини. Генетичні зміни можуть бути викликаними завдяки наслідкам операцій, як з цілими яйцеклітинами так і ембріонами, а також з їх клітинами, ядрами і окремими генами. Ці напрямки робіт визначаються як ембріогенетична інженерія тварин. Використання цих методів в сільськогосподарському виробництві дозволить більш ефективно використовувати репродуктивний потенціал тварин та прискорити розмноження високопродуктивних тварин та стад.

Але необхідно відмітити, що цей метод ефективний лише при використанні генетично цінних високопродуктивних самиць і видатних плідників, перевірених за якістю нащадків і визнаних поліпшувачами.

Сьогодні центри зі штучного осіменіння США, Канади, Англії, Франції, Німеччини на 50% комплектуються бугайцями, одержаними за допомогою трансплантації ембріонів від видатних батьків. Не дивлячись на те, що вартість теляти, одержаного способом пересадки, набагато більша, ніж при звичайному осіменінні, але метод знаходить все більш широкого практичного застосування.

ТЕМА 1. Фізіологічні основи трансплантації ембріонів

Мета заняття: Оволодіти методами добору донорів та реципієнтів, а також знати вимоги до них.

Методика виконання роботи

Завдання 1. Провести діагностику феноменів статевого циклу самок

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

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

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

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

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

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

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

Завдання 2. Добір тварин-донорів та вимоги до них

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Завдання 3. Ознайомитись з процесом відбору тварин-реципієнтів

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

При відборі реципієнтів виходять з таких вимог до них:

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

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

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

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

ТЕМА 2. Методи викликання суперовуляції у тварин-донорів

Мета заняття: визначити особливості застосування для викликання суперовуляції у донорів препаратів СЖК та ФСГ

Методика виконання роботи

Завдання 1. Викликання суперовуляції у донорів за допомогою СЖК

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

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

Кров у жеребних кобил беруть на 50–100 день жеребності один раз на тиждень з розрахунку 10 мл на 1 кг живої маси тварини, т.п. 4–5 літри від кожного донора. Завадовський М.М. встановив, що гонадотропний гормон СЖК виробляється клітинами ендометрію кобил з 40 по 130 жеребності, максимальна його концентрація буває

на 50–100 день. Він не проходить через нирочні фільтри і тому не виявляється в сечі. Сироваточний гонадотропін володіє фолікулостимулюючою і лютеїнізуючою дією, причому перша в 2–3 рази сильніша за другу.

Гормональний титр сироватки визначений за вмістом гонадотропінів, коливається від 60 до 300 І.О. в 1 мл нативної сироватки, що в середньому складає 120–180 І.О. в 1 мл. Оптимальною дозою СЖК для викликання суперовуляції вважається 5–6 тис. І.О. нативного або 2,5–3 тис. І.О. очищеного препарату. Збільшення дози СЖК викликає імунні реакції з утворенням антитіл проти гонадотропінів і навіть анафілактичні явища – шок. Тому спочатку необхідно вводити 2 мл препарату і лише при відсутності побічних явищ вводити залишкову кількість. При застосуванні очищених препаратів СЖК, таких як фолігон, немає потреби робити пробу.

При викликанні суперовуляції застосовують різні схеми гормональної обробки корів-донорів (таблиця 1).

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

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

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

Схеми викликання поліовуляції з застосуванням ГСЖК, при вірному і обережному використанні досить ефективні. Так, кількість дозрілих фолікулів на момент овуляції при введенні ГСЖК становить 9–12 і більше на один яєчник. Однак в багатьох випадках фолікули дозрівають несинхронно, час їх дозрівання розтягується, це пов’язано з великим періодом піврозпаду ГСЖК – 5-6 діб.

Таблиця 1

Схеми підготовки корів-донорів за допомогою СЖК

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

Тому на час вимивання (7-8 день) в яєчнику виявляється разом з жовтими тілами значна кількість овульованих або неовульованих фолікулів. Крім того, часто важко підібрати оптимальну дозу ГСЖК, а при передозуванні викликається кістозне переродження яєчників. Багаторазова обробка донорів ГСЖК викликає імунний ефект, в результаті на ньому утворюються імунні тіла, які призводять до зменшення овуляції, асинхронної функції яєчників і матки. У зв'язку з цим виникає необхідність обробки донорів СЖК-антисироваткою, яка нейтралізує небажану довгострокову дію ГСЖК.

Завдання 2. Викликання суперовуляції у донорів за допомогою ФСГ

Фолікулостимулюючий гормон (ФСГ) – гормон передньої долі гіпофізу, він сприяє росту фолікула і дозріванню яйцеклітини. ФСГ при викликанні суперовуляції дає більш високі і стабільні результати в порівнянні з ГСЖК. Так ФСГ забезпечує значно більший вихід якісних і нормальних ембріонів на одного донора. Якщо при введенні ГСЖК вихід нормальних ембріонів складає в середньому 3–5 за одну обробку, то ФСГ забезпечує значно більший вихід ембріонів – 7-10. При введенні ФСГ зустрічається менше випадків залишкових патологічних явищ в яєчниках. Реакція яєчників на ФСГ менш бурхлива, ніж при введенні ГСЖК. Яєчники хоча і вміщують більше розвинутих фолікулів, але не так сильно збільшуються в об'ємі і не такі чутливі при пальпації. Єдиним недоліком схем застосування ФСГ є багаторазовість його введення, що може викликати небажані стресові явища та потребує значних затрат праці.

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

Але у багатьох центрах по трансплантації використовують інші схеми обробки донорів на ФСГ (таблиця 2). Як видно з таблиці, разом зі схемою, яка передбачає щоденні введення однакових доз ФСГ, застосовується схема і з пониженням кількості введеного препарату, а також схема 2 з наростанням дози препарату. Схема 4, яка розроблена нами, розрахована на зменшення загальної дози введення ФСГ до 34 мг на донора. Ця схема включає 4 дні обробки корів-донорів. Починають введення препарату на 10-й день статевого циклу і

вводять ФСГ вранці і ввечері зменшуючи дозу з 12 мг у 1-й день обробки до 6 мг на 4-й.

Таблиця 2

Схеми підготовки корів-донорів за допомогою ФСГ

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

На 3-й день обробки коровам вводять синтетичний аналог простагландину F_{2α}. Вимивали 5-6 якісних ембріонів, придатних до пересадки та заморожування.

Завдання 3. Складання гормонограми підготовки донорів і реципієнтів

Для проведення планомірної підготовки до трансплантації груп донорів і реципієнтів складається гормонограма, яка дозволяє контролювати хід робіт на протязі всього періоду роботи з тваринами. Приведена гормонограма розроблена при застосуванні фолітропіну, аналогічно складається гормонограма для всіх препаратів при трансплантації ембріонів.

ГОРМОНОГРАМА

підготовки корів-донорів і телиць-реципієнтів

Господарство _____ району _____ області
 _____ (при використанні фолітропіну) 20__ рік

№ п/п	Назва заходів	Група донорів				
		Приклад	I	II	III	IV
1	2	3	4	5	6	7
1.	Відбір корів після отелу до осіменіння	10.01				
2.	Перше гінекологічне обстеження (наявність жовтих тіл яєчників)	22.01				
3.	Друге гінекологічне обстеження (контроль наявності жовтих тіл яєчників)	12.02				
4.	Перше визначення прогестерону	12.02				
5.	Друге визначення прогестерону	19.02				
6.	Інв. номер корів-донорів					
7.	Перше введення естрофану (при наявності жовтих тіл яєчників) введення вітамінів А, Д, Е	25.02				
8.	Друге введення естрофану (при наявності жовтих тіл яєчників) введення вітамінів А, Д, Е	07.03				
9.	Виявлення статевої охоти	10.03				

1	2	3	4	5	6	7
10.	Визначення прогестерону	10.03				
11.	Контроль жовтого тіла яєчників і введення вітамінів А, Д, Е	19.03				
12.	Введення фолітропіну-I (8 – 20 год.)	20.03				
13.	Введення фолітропіну-II (8 – 20 год.)	21.03				
14.	Введення фолітропіну-III (8 – 20 год.)	22.03				
15.	Введення фолітропіну-IV (8 – 20 год.) Введення естрофану (8 – 20 год.)	23.03 23.03				
16.	Осіменіння (8 – 19 год.)	25.03				
17.	Повторне осіменіння через 12 год.	26.03				
18.	Вимивання ембріонів	01.04				
1.	Відбір реципієнтів	29.01				
2.	Гінекологічне обстеження	05.03				
3.	Інв. номер реципієнтів					
4.	Перше введення естрофану (8 год.) введення вітамінів А, Д, Е	11.03				
5.	Друге введення естрофану – 16 год. (при наявності жовтих тіл яєчників) введення вітамінів А, Д, Е	22.03				
6.	Виявлення статевої охоти	25.03				
7.	Контроль жовтого тіла	01.04				
8.	Пересадка ембріонів	01.04				

ТЕМА 3. Синхронізація статевої охоти донорів та реципієнтів. Штучне осіменіння донорів

Мета заняття: Застосування синтетичних аналогів простагландину $F_{2\alpha}$ для синхронізації статевої охоти донорів і реципієнтів.

Методика виконання роботи

Завдання 1. Застосування синтетичних аналогів простагландину $F_{2\alpha}$ для синхронізації статевої охоти донорів і реципієнтів

Успіх трансплантації та приживлення ембріонів залежить від синхронності статевого циклу донора і реципієнта, а при

використанні заморожено-відтаяних ембріонів їх стадії розвитку та дня статевого циклу реципієнта.

Для синхронізації статевої охоти найбільш широко застосовуються синтетичні аналоги простагландину $F_{2\alpha}$ – простин (США), клопстенол, еструмат (Англія), естрофан, ремофан (Чехія), ензапрост (Угорщина), естуфалан, клатрапростин (Росія), овоген (Україна) та інші. Встановлено, що ПГ $F_{2\alpha}$ є єдиним синтезуємим в матці лютеолітичним фактором, який викликає морфологічну і функціональну регресію жовтого тіла і впливає таким чином на термін статевого циклу. При фронтальному введенні ПГ $F_{2\alpha}$ без врахування дня статевого циклу приходять в охоту через 48-96 годин лише 55-65% телиць парувального віку. Це пов'язано з стадією розвитку жовтого тіла, в період якого простагландин не проявляє лютеолітичної дії. Для подолання цього використовують дворазове введення препарату з інтервалом в 10-12 днів між ін'єкціями, що викликає статеву охоту у 90% телиць-реципієнтів, решта телиць не приходять в охоту, бо не мають на яєчниках функціонуючих жовтих тіл взагалі.

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

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

Найкращі результати одержані при синхронізації статевої охоти телиць-реципієнтів після ректального дослідження одноразовим введенням синтетичних аналогів простагландину $F_{2\alpha}$ - 500 мкг естрофану або 750 мкг клатрапростину в комплексі з 10% суспензією

АСД-Ф2 (асептичний стимулятор Дорогова 2 фракція) на тетравіті (7-10 мл внутрішньом'язево). На протязі 56 годин після введення препаратів проявили статеву охоту 95-98% телиць-реципієнтів.

Завдання 2. Осіменіння та запліднення корів-донорів

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

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

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

Яйцеклітини після овуляції попадають на бахромку яйцепроводу і просуваються разом з течією рідини в яйцепроводі, рухаючись в напрямку матки. Життєздатність яйцеклітин в

яйцепроводах зберігається протягом 10-12 годин, тому що вони виходять з фолікулів недозрілими, в стані овоциту 2 порядку. Яйцеклітини складаються з ядра і протоплазми, оточені жовтковою та прозорою (блискучою) оболонкою. Ззовні яйцеклітина оточена фолікулярними клітинами променевого вінця.

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

Накопичені в області перешийка яйцепроводів спермії набувають здатності до просування в сторону яєчника тільки після овуляції фолікула, з надходженням фолікулярної рідини у яйцепроводи. Проникнути через шари фолікулярних клітин і прозору оболонку можуть тільки капацітовані, високоактивні спермії, для цього їм необхідно від 2 до 6 годин перебування в статевих шляхах самки.

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

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

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

ТЕМА 4. Методи видобування ембріонів

Мета заняття: Ознайомитись з хірургічним та не хірургічним способом видобування ембріонів у тварин-донорів

Методика виконання роботи

Завдання 1. Провести нехірургічне та хірургічне видобування ембріонів у тварин-донорів

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

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

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

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

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

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

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

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

Перед роботою складові частини катетеру стерилізують кип'ятінням в дистильованій воді протягом 30 хв. Гумові і пластикові катетери стерилізують холодним способом, заливаючи в стерильні ємкості 70° спиртом за 1,5 – 2 години до початку роботи. Перед вимиванням внутрішній канал катетера промивають стерильним розчином Дюльбекко. Катетер в зібраному стані зовні обробляють селіконом або кероланом і поміщають в захисний поліетиленовий чохол.

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

хребцями. Донорам можна вводити внутрішньом'язево міорелаксанти – рампуноль 0,5 – 0,7 мл або комбілен 0,7 – 1,0 мл.

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

Посуд для збору рідини з ембріонами розміщують в термоізолюючий матеріал, а флакон з промивною рідиною закріплюють вище висоти донора – 190 – 200 см. Промивну рідину вводять в верхівку рога за допомогою шприця ємкістю 60 і більше мл, або самопливом і перекривають зажимом трубку. Рукою, введеною в пряму кишку, легко масажують верхівку рогу матки, потім знімають зажим і випускають рідину з ембріонами в порожній посуд. Наповнення рогу матки промивною рідиною та її відток контролюють ректально. Для більш повного видалення промивної рідини проводять обережно масаж і підняття верхівки рогу. Суворо контролюють кількість введеної і зібраної промивної рідини. Через ріг пропускають порціями по 50–100 мл промивної рідини, загальної кількості 200–500 мл на один ріг матки.

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

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

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

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

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

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

ТЕМА 5. Технологія роботи з ембріонами

Мета заняття: Оволодіти методикою пошуку ембріонів після вимивання, вивчити показники розвитку ембріонів та провести оцінку якості ембріонів

Методика виконання роботи

Завдання 1. Провести пошук ембріонів після видобування

Вся робота по пошуку і оцінці ембріонів повинна проводитись в спеціальному стерильному боксі при температурі 25 – 26° С. В боксі проводять вологе прибирання, а за 1 – 2 години до роботи з

ембріонами протирають 70% спиртом робочі поверхні приладів і включають бактерицидну лампу. Персонал повинний працювати в халатах, шапочках або косинках, користуватись стерильним посудом і інструментом. Руки перед роботою обробляють тампоном, зволженим 70% спиртом. По 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 корів-донорів ємкості з промивною рідиною переносять в термостат при температурі 37° С, де відбувається відстоювання та осадження ембріонів. Після відстоювання верхню частину промивної рідини відсмоктують за допомогою сифону або шприця з довгою голкою, залишаючи 50 – 100 мл рідини. Залишок промивної рідини розливають в 2 – 3 чашки Петрі (з пластику), дно котрих для зручності пошуку розчерчено на квадрати 1x1 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 підвищують на штатив на 20 хвилин для осідання (седиментації) ембріонів. По закінченню осідання нижню частину ембріоприймача перепаюють термозажимом і ножицями відрізають від приймальної ємкості.

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

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

Завдання 2. Провести оцінку ембріонів візуально-морфологічними методами

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 повноціні 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 3.

Таблиця 3

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	17	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;

- 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.

Таблиця 4

Показники розвитку ембріонів

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

Таблиця 5

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

ТЕМА 6. Прижиттєва оцінка життєздатності ембріонів

Мета заняття: Оволодіти методикою прижиттєвої оцінки ембріонів за допомогою барвників та при культивуванні в поживних середовищах

Методика виконання роботи

Завдання 1. Провести оцінку ембріонів з використанням барвників

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

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

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

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

ДАП. Це дуже чутливий реагент на ДНК. Для забарвлення ембріонів 0,1 мг ДАП розчиняють в 1 мл фізіологічного розчину і далі розбавляють розчином Дюльбекко для одержання концентрації 1 : 100000. Інкубація проходить за 10 хвилин при температурі 22° С. ембріони оцінюють в відбитому світлі люмінісцентного мікроскопу. Ембріони, в яких ядра проявляють жовту флюоресценцію –

нежиттєздатні, в живих ембріонів ядра не забарвлюються, тому вони не флюоресцюють.

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

Завдання 2. Провести оцінку життєздатності ембріонів методом культивування

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

В стерильні годинникові скельця переносять піпеткою 25 крапель стерильного вазелінового масла, після цього шприцем і тонкою голкою підпускають під вазелинове масло 0,1 мл поживного середовища. Годинникове скельце розміщають в чашки Петрі і встановлюють в ексікатор, який ставлять в термостат при температурі 37° С. Протягом 10 – 20 хвилин через ексікатор пропускають газову суміш, яка має 90 % азоту, 5 % вуглекислого газу і 5 % кисню.

Після цього з годинникових скелець, що знаходяться в ексікаторі, шприцем видаляють поживне середовище і в свіжій порції поживного середовища поміщають ембріон під вазелинове масло. Чашки Петрі з годинниковими скельцями знову переносять в ексікатор при 37° С і знов пропускають газову суміш, попередньо

фільтруючи і зволожнюючи її. Ексикатор щільно закривають, шланги для вводу газової суміші герметично перекривають зажимами і залишають в термостаті на період інкубації. Для контролю за рН в ексикатор ставлять бюкс з поживним середовищем, в яке додають індикатор феноловий червоний. При рН 7,2 – 7,3 феноловий червоний в розчині має оранжево-червоний колір. При залужуванні колір контрольного середовища буде малиновим, при закисленні - оранжевим.

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

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

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

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

Використовують також культивацію ембріонів в репродуктивних шляхах проміжного реципієнта (in vivo) для транспортування і після реконструкції ембріона. Проміжним реципієнтом може бути вівця або лабораторна тварина (кролі, миші),

тому що преімплатаційний ембріон толерантний до чужерідного середовища гетерогенного реципієнта. Кращим місцем репродуктивного тракту проміжного реципієнта для культивування ембріона є яйцепровід. Зберігати ембріони в яйцепровадах реципієнта можна на протязі такого часу, який вони знаходяться в природних умовах, не пізніше денудації. Знаходячись в яйцепровадах реципієнта, ембріони продовжують розвиток, але він може бути повільнішим у порівнянні з нормою. Ці обставини необхідно враховувати при виборі ступеня синхронізації кінцевого реципієнта.

Техніка підготовки проміжного реципієнта не складна. Перед введенням в яйцепровід ембріонів, його перев'язують поблизу матково-трубного з'єднання таким чином, щоб великі судини не попали під лігатуру, тому що перев'яз яйцепроводу разом з судинами веде до загибелі ембріонів. В кожний яйцепровід можна пересадити звичайним способом до 25 ембріонів в невеликій кількості поживного середовища.

ТЕМА 7. Мікрохірургічне ділення, кріоконсервація ембріонів та пересадка реципієнтам

Мета заняття: Оволодіти методикою мікрохірургічного ділення ембріонів, кріоконсервацією їх та проведення пересадки половинок і цілих ембріонів реципієнтам

Методика виконання роботи

Завдання 1. Провести 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 заготовок. 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 відхилитись від ділячого інструмента.

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

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

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

1. Ембріон присмоктують до фіксуючої мікропіпетки. З протилежного боку мікроножем або мікроголкою надрізають

прозору оболонку і вводять в розріз мікропіпетку для маніпуляцій. Шляхом ін'єкції невеликого об'єму розчину виштовхують зародок з оболонки. На дні камери мікроножем або голкою ембріон ділять по вертикалі на дві рівні частини.

2. Ембріон фіксують мікропіпеткою. З протилежної сторони горизонтальним рухом мікроножа розрізають частину прозорої оболонки і ділять ембріон на дві групи клітин. Після цього в розріз вводять мікропіпетку для маніпуляцій, присмоктують і видаляють одну половинку.
3. Нефіксовану морулу або бластоцисту ділять по вертикалі на дні камери або у чашці Петрі разом з прозорою оболонкою на дві половинки.

Для розділення пізньої морули на 4 частини зародок спочатку ділять на дві половинки, після чого кожний напівембріон поза прозорою оболонкою ділять по вертикалі на дві частини. При проведенні маніпуляцій кут нахилу мікропіпеток і мікроголок відносно основи камери повинен бути 6 – 12°. Процес вертикального ділення зародка з прозорою оболонкою і без неї здійснюють шляхом повільного, з паузами по часу опускання мікроголки або мікроножа. При цьому не слід допускати рух ділячого інструмента вперед–назад, тому що це призводить до скручення половинок і пошкодження бластомерів. При діленні ембріона мікроголкою її краще розміщати так, щоб ділення проходило в тонкому участку, а кінчик голки повинен виступати за ембріон.

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

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

Прозору оболонку одержують від дегенерованих зародків, не запліднених яйцеклітин або ооцитів, виділених з антральних фолікулів яєчників корів. Щоб одержати порожню оболонку –

ембріон або яйцеклітину присмоктують до фіксуєної мікропіпетки, а з протилежної сторони мікроножем або мікроголкою надрізають прозору оболонку і звільняють від вмісту. Далі присмоктують до мікропіпетки напівембріон та через розріз в прозорій оболонці вводять його в середину.

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

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

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

Завдання 2. Провести кріоконсервацію ембріонів

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

Краща стадія для заморожування ембріонів є бластоциста 60-150 бластомерів т.п. віком 7-8 днів. Для заморожування використовують тільки свіжоодержані ембріони тому що зберігання негативно

впливає на їх життєздатність при холодкових обробках. Максимальне скорочення часу підготовки ембріонів до заморожування - одне з найголовніших вимог успішного заморожування.

Заморожування і відтаювання ембріонів супроводжується кристалізацією води в бластомерах і концентруванням розчинних речовин в рідкій фазі, що приводить до загибелі ембріона. Ці два процеси відбуваються одночасно, хоча кристалізація більш помітна при швидкому заморожуванні, тоді як осмотичні зміни - при уповільненому. Під час заморожування спочатку знижується температура в навколклітинному середовищі, тут поступово збільшується кількість льоду і збільшується концентрація солей в останній частині розчину. Виникає різниця осмотичного тиску між позаклітинною і внутрішньоклітинною фазами, яка зрівноважується осмотичною реакцією ембріона шляхом віддачі води в навколклітинне середовище. Щоб запобігти кристалізації води в склад середовища вводять кріопротектори гліцерин або диметилсульфоксид (ДМСО), а щоб запобігти осмотичному впливу штучно стимулюють кристалізацію (сидінг). Введення в склад середовища кріопротектора та його видалення також створює можливість пошкодження ембріона. Тому технології заморожування передбачають поступове введення ембріонів в 0,25; 0,5; 1,0; 1,5 М розчині кріопротектору і витримку в кожному розчині 5 - 10 хвилин, а в останньому 15 - 20 хвилин. При відтаюванні ембріонів їх поступово переносять в розчин з зменшенням вмісту кріопротектору.

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

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

і 6,6% беруть відповідно 10 мл ФСБ і додають 5 мл 10% розчину гліцерину і 5 мл ФСБ та 10 мл 10% розчину гліцерину.

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

При повільному заморожуванні спочатку охолоджують ембріон від 20°C до 7°C з швидкістю 1°C за хвилину, викликають штучну кристалізацію і тоді охолоджують з швидкістю 0,3°C за хвилину до –36°C, а далі з швидкістю 0,1°C за хвилину до –60°C і переносять в рідкий азот, температура –196°C. Відтаюють ембріон в спиртовій бані з температурою –50°C з швидкістю 4°C за хвилину до –10°C, після чого переносять на 5 хв. в водяну баню з температурою +20°C. Після переносять ембріон в середовище для видалення кріопротектору.

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

Завдання 3. Провести пересадку ембріонів реципієнтам

До середини 70-х років пересадку ембріонів проводили хірургічним методом, але тепер добре розроблені і впроваджені у виробництво нехірургічні методи пересадки ембріонів телицям-реципієнтам, 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 дослідження по нехірургічній 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, порожнина матки стерильна, слизові оболонки дуже чутливі, легкокоранімі і бактерицидні властивості маткового секрету знижені. Все це необхідно враховувати при роботі, звертаючи особливу увагу на асептику та майстерність техніки.

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

Підготовку реципієнта проводять таким чином: - їх фіксують в станку або на місті в 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 реципієнтам вводять внутрішньом'язево міорелаксант комбелен 0,5 або ханегіф 10 мл, рампун.

Розроблено багато пристроїв та катеторів для нехірургічної пересадки ембріонів. Найбільш широке застосування знайшли катетери, які складаються з металевого тіла – трубки і поршня, за допомогою якого ембріон витискають з пайєти, а також захисних кожухів та чохлів – французька фірма ІМВ, німецька мінітюб та ін. Перед початком роботи інструменти стерилізують кип'ятінням, висушують і зберігають в настільному боксі під бактерицидною лампою, яку вмикають перед початком роботи. Перед введенням катетера в статеві шляхи його 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 іпсилатеральний 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 перегру-повувати, вакцинувати та піддавати іншим стресовим факторам реципієнтів. Годівля реципієнтів повинна бути повноцінною, тому що низький рівень, незбалансованість раціону викликає порушення обміну речовин, репродуктивної функції і знижує приживлення ембріонів.

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

ТЕМА 8. Облік та звітність при трансплантації ембріонів

Мета заняття: Оволодіти веденням первинного зоотехнічного та ветеринарного обліку про донорів та реципієнтів, складання інформації та рознесення даних у картки та журнали про виконані роботи. Складання звітів з аналізом роботи лабораторії за основними елементами технології трансплантації у виробництві.

Методика виконання роботи

Завдання 1. Заповнення карток, журналів та звіту по трансплантації ембріонів

Впровадження методу трансплантації ембріонів у виробництво потребує добре налагодженого первинного зоотехнічного та ветеринарного обліку на всіх етапах технологічного процесу. Чіткий облік на першому етапі трансплантації – підготовці донорів та реципієнтів необхідний для аналізу результатів застосування різних схем, режимів і методів обробки тварин, а також одержання, зберігання і пересадки ембріонів.

На кожну тварину донора і реципієнта заповнюється картка племінної матки (ф. 2 МОЛ, ф.2 СВ, ф. 2 ОКЗ). До цього додається

ветеринарне свідоцтво (форма №1) і довідка про стан здоров'я, відтворної здатності та інших показників згідно вимог до донорів.

На плідників, сім'я яких використовувалось для осіменіння донорів, заповнюється картка (ф. 1 МОЛ, ф. 1 СВ, ф. 1 ОКЗ) або племсвідоцтво.

Для генетичного контролю походження потомства у картках племобліку відмічають групи крові тварин. Оперативний облік робіт, безпосередньо зв'язаний з технологією трансплантації ембріонів, здійснюється за допомогою спеціальних карток донорів, реципієнтів та трансплантантів. Картка донора і реципієнта заповнюється при відборі тварин на основі даних первинного зоотехнічного племінного обліку, клінічної і гінекологічної диспансеризації, а також при огляді і ректальному контролю статевих органів.

У картці відмічається використання кожного елементу технології трансплантації ембріонів.

Статева охота, осіменіння донора

Виявляють донора в охоті і осіменяють. Записують дату, час початку і закінчення охоти, інтенсивність її прояву у балах: прихована – 0, слабо виражена – 1, добре – 2, бурна – 3, наявність тички або її відсутність, стан слизу (прозорість, присутність домішок) і дату осіменіння.

Видобування ембріонів. У графу “Реакція яєчників” заносять дані ректального дослідження на 6 – 7 день після першого осіменіння до початку вимивання ембріонів, розмір яєчника, кількість функціонуючих жовтих тіл і фолікулів.

Якісну характеристику жовтих тіл (ЖТ) позначають хрестиками:

- ЖТ +++ - при пальпації виявляється розмір більше 1 см;

- ЖТ ++ - середніх розмірів від 0,5 до 1 см;
- ЖТ + - слабовиявляються менше 0,5 см.

Всі виявлені відхилення статевих органів від норми відмічають у примітках. У характеристиці ембріонів відмічають, який ембріон пересаджують (свіжий, після культивування чи заморожування).

За результатами морфологічної оцінки відмічають стадію розвитку ембріона і позначають символами МоІ, МоІІ, БлІ, БлІІ. Якість ембріонів додатково позначають хрестиками:

- МоІ++ - рання морула відмінної якості;
- МоІ+ - рання морула доброї якості;
- МоІ+ - рання морула середньої якості.

Також ведеться облік і реєстрація робіт у робочих журналах, які наведені нижче:

- обліку використання донорів;
- гормонального викликання поліовуляції у донорів;
- видобування, оцінки якості і використання ембріонів;
- кріоконсервація і використання ембріона;
- облік (реєстрація) результатів пересадки ембріонів.

Вся інформація у процесі роботи заноситься у карту та журналах з відміткою дати та прізвища виконавця роботи. За наслідками роботи за кожний місяць та рік складається звіт з аналізом роботи лабораторії, пункту по основним елементам технології та економічній ефективності застосування метода трансплантації у виробництво.

КАРТКА ДОНОРА

Господарство _____
(кому належить)

Донор: корова (телиця), вівця, свиноматка, конематка

Кличка _____

Інв. № _____ **Дата народження** _____

Порода _____

Жива маса _____

Група крові _____

Продуктивність: (молочна кг, % жиру, м'ясна) _____

Середньодобовий удій, кг
(цей показник дозволяє врахувати ступінь впливу гормональної обробки і вимивання на молочну продуктивність)

Су-I – до початку
гормональної
обробки

Су-II – за 1 добу до
вимивання
ембріонів

Су-III – 5–7 день після
вимивання
ембріонів

Дата останніх родів _____

Післяродові порушення _____

Характеристика естрального циклу _____
(регулярний, нерегулярний)

Середня тривалість циклу, дн. _____

Дослідження вагінальні, ректальні, дата _____

Результат _____
(стан органів відтворення)

Підпис спеціаліста

Дата

КАРТКА РЕЦИПІЄНТА

Господарство _____
(кому належить)

Реципієнт _____

Кличка _____

Інв. № _____ **Дата народження** _____

Порода _____

Жива маса _____

Група крові _____

Дата останніх родів _____

Післяродові порушення _____

Остання охота _____

Результати ректального дослідження _____
(яєчники – лівий і правий, розміри,

_____ кількість і стан жовтих тіл, фолікулів)

Підпис спеціаліста

Дата

З В І Т**про трансплантацію ембріонів по лабораторії (пункту)****за _____ 20__ рік**

№	Виконана робота	За місяць	Всього з початку року
1.	Відібрано тварин для використання у якості донорів, голів		
2.	Вибуло тварин з числа донорів, голів		
3.	Наявність донорів на звітну дату, голів		
4.	Оброблено донорів для викликання суперовуляції		
5.	Використано донорів для видобування ембріонів, голів		
6.	Одержано ембріонів всього, у т.ч. нормальних дегенерованих незапліднених яйцеклітин		
7.	Заморожено ембріонів		
8.	Відібрано та підготовлено реципієнтів		
9.	Проведено ембріопересадок, всього у т.ч. заморожено-відтаяними		
10	Перевірено реципієнтів на тільність ректально, у т.ч. умовно тільні, голів		
11	Одержано телят від ембріопересадок, у т.ч. мертвонароджених		
12	Абортувало реципієнтів		

Підпис спеціаліста

Дата

КАРТКА ТЕЛЯТИ – ТРАНСПЛАНТА

Инв. № _____ Стать _____ Порода _____ Дата народження _____ Ж.м., кг _____

Господарство _____ Ембріопересадка (дата) _____ Використ.ембріон _____
(свіжий, культив., замор.-відтаяний)

Мати-донор № _____	Батько _____ № _____	Реципієнт № _____
Дата народж. _____	Дата народж. _____	Дата народж. _____
Порода _____	Порода _____	Порода _____
Жива маса, кг _____	Жива маса, кг _____	Жива маса, кг _____
Удій за 305 дн. лактації:	Пр. М. _____ кг, ж. % _____	Пр. М. _____
1. _____ кг, ж. % _____	Категорія _____	Лактація _____
2. _____ кг, ж. % _____	Оцінка за якістю	Удій _____ кг, ж. % _____
3. _____ кг, ж. % _____	нащадків _____	Власна продуктивність
4. _____ кг, ж. % _____	_____	Лактація _____
5. _____ кг, ж. % _____	_____	Удій _____ кг, ж. % _____
Господарство _____	Господарство _____	Господарство _____
Ферма _____		Ферма _____

**Контрольні питання для перевірки знань
здобувачів ступеня вищої освіти з дисципліни
„Біотехнологія репродукції організмів”**

1. Зміст дисципліни. Методи біотехнології.
2. Історія розвитку біотехнології. Біологічні аспекти біотехнології.
3. Стан, напрямки та перспективи розвитку біотехнології в тваринництві.
4. Практичні результати використання біотехнології в тваринництві.
5. Значення дисципліни та її місце серед інших зооветеринарних наук.
6. Статевий цикл. Регуляція статевого циклу.
7. Стадії та фази (жовтого тіла та фолікулів) статевого циклу.
8. Феномени статевого циклу та методи їх визначення .
9. Повноцінні (синхронний і асинхронний) та неповноцінні статеві цикли.
10. Видові особливості статевого циклу у с.-г. самок.
11. Нейрогуморальна регуляція статевого циклу.
12. Гонадотропні, стероїдні гормони та методи їх визначення.
13. Морфофункціональні зміни в організмі самок під впливом гормонів.
14. Науково-теоретичний аспект і прикладне значення трансплантації ембріонів.
15. Біологічні основи трансплантації ембріонів.
16. Селекційні критерії відбору донорів.
17. Зооветеринарні вимоги до донорів та реципієнтів.
18. Синхронізація статевої охоти у донорів і реципієнтів.
19. Біологічні основи синхронізації статевої охоти.
20. Стимуляція відтворної функції самок (статевої охоти, овуляції).
21. Гормональні препарати, що використовуються для стимуляції суперовуляції.
22. Морфологічна оцінка жовтого тіла яєчників донорів та реципієнтів.
23. Гормональні схеми обробки донорів для суперовуляції за допомогою препаратів СЖК.

24. Гормональні схеми обробки донорів для суперовуляції за допомогою препаратів ФСГ.
25. Особливості осіменіння донорів ембріонів.
26. Контроль реакції яєчників на гормональні обробки самок донорів.
27. Методи та способи вимивання ембріонів у корів.
28. Методи та способи вимивання ембріонів у кобил.
29. Методи та способи вимивання ембріонів у вівцематок.
30. Методи та способи вимивання ембріонів у свиноматок.
31. Не хірургічні методи видобування ембріонів.
32. Хірургічні методи видобування ембріонів (трансвагінальний, лапаратомія).
33. Техніка вимивання ембріонів при хірургічному методі видобування ембріонів.
34. Техніка вимивання ембріонів при нехірургічному методі видобування ембріонів.
35. Послідовність і порядок роботи по пошуку ембріонів в промивній рідині.
36. Дати характеристику стадії розвитку ембріонів – зигота.
37. Дати характеристику стадії розвитку ембріонів - 2-8 бластомерний ембріон.
38. Дати характеристику стадії розвитку ембріонів – морула.
39. Дати характеристику стадії розвитку ембріонів - бластоциста.
40. Критичні періоди розвитку доїмплантаційних ембріонів.
41. Значення яйцепроводу для розвитку ембріонів.
42. Денудація. Імплантація ембріонів.
43. Пошук, оцінка та маніпуляції з ембріонами.
44. Оцінка ембріонів за стадіями розвитку.
45. Мікрохірургічне ділення ембріонів.
46. Методи оцінки визначення придатності ембріонів до пересадження.
47. Методи короткочасного зберігання та культивування ембріонів.
48. Методи оцінки біологічної повноцінності ембріонів.
49. Відбір реципієнтів для пересадження ембріонів.
50. Підготовка реципієнтів до трансплантації ембріонів.
51. Хірургічна трансплантація ембріонів.
52. Не хірургічна трансплантація ембріонів.
53. Техніка і методи трансплантації ембріонів у корів, телиць.

54. Техніка і методи трансплантації ембріонів у кобил.
55. Техніка і методи трансплантації ембріонів у свиноматок.
56. Техніка і методи трансплантації ембріонів у вівцематок.
57. Ембріональна смертність, причини та способи її подолання.
58. Контроль результатів трансплантації ембріонів.
59. Методи отримання ооцитів та їх короткочасне зберігання.
60. Культивування ооцит - кумулюсних комплексів до стадії мейозу *in vitro*.
61. Отримання, оцінка і культивування фолікулів.
62. Контроль та регуляція мейотичного дозрівання ооцитів.
63. Підготовка сперми до запліднення *in vitro*. Капацітація сперміїв.
64. Запліднення яйцеклітини, фактори, що сприяють заплідненню. Роль блискучої оболонки.
65. Біологічні процеси, що відбуваються при заплідненні.
66. Культивування *in vitro* овоцитів, зигот та ранніх ембріонів до передімплатаційних стадій.
67. Науково-теоретичний аспект та прикладне значення зберігання статевих клітин.
68. Зберігання ембріонів при біля нульових температурах.
69. Довготривале зберігання статевих клітин і ембріонів.
70. Кріопротектори. Теорія кріоконсервування гамет.
71. Методи кріоконсервування ембріонів, обладнання.
72. Розморожування ембріонів.
73. Оцінка життєздатності статевих клітин та ембріонів після деконсервування.
74. Теоретичне і практичне значення ембріонального клонування.
75. Отримання клонів на основі яйцеклітин та зигот. Тотипотентність ембріонів.
76. Хімічні та мікрохірургічні методи отримання ядер бластомерів.
77. Методика пересадження ядер.
78. Отримання енуклеюваних яйцеклітин та зигот без пронуклеусів.
79. Компактизація та декомпактизація ембріонів.
80. Методи пересадження ядер соматичних та ембріональних клітин.
81. Отримання монозиготних диплоїдних нащадків.
82. Отримання партеногенетичних ембріонів.

83. Природний партеногенез.
84. Штучний партеногенез.
85. Близнята. Природа двійнят.
86. Отримання монозиготних та гетерозиготних двійнят методом мікрохірургічного поділу.
87. Молекулярно-біологічні основи визначення і регуляції статі тварин.
88. Цитогенетичний метод визначення статі.
89. Імунологічний метод визначення статі шляхом використання моноклональних антитіл.
90. Визначення статі за допомогою ДНК - зондів.
91. Регуляція співвідношення статей шляхом розділення X -Y-спермій: центрифугування, електрофорезом, фільтрацією, флюорисцентним фарбуванням.
92. Імуногенетичний метод регуляції статі.
93. Теоретичне і практичне значення химер.
94. Одержання химерних ембріонів (генетичних мозаїк).
95. Агрегаційні та ін'єкційні химери.
96. Міжпородні та міжвидові химери.
97. Химери сільськогосподарських тварин.
98. Генна інженерія в тваринництві. Значення.
99. Теоретичне і практичне значення трансгенних тварин. Молекулярно-біологічні основи.
100. Технологія виділення, перенесення та клонування генів.
101. Техніка трансгенезу.
102. Ін'єктування ДНК в сферу чоловічого пронуклеуса в період злиття з жіночим.
103. Методи одержання трансгенних тварин.
104. Методи отримання генів. Отримання рекомбінаційних ДНК.
105. Клонування генів. Банк генів.
106. Генетична інженерія у птахівництві.
107. Облік та звітність при трансплантації ембріонів сільськогосподарських тварин.

СПИСОК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Генетика, селекція і біотехнологія в скотіводстві / [М. В. Зубец, В. П. Буркат, Ю. Ф. Мельник і др.]. – К.: БМТ, 1997. – 722 с.
2. Герасименко В. Г. Біотехнологія / В. Г. Герасименко. – К. : Вища школа, 1989. – 343 с.
3. Завертяев Б. П. Біотехнологія в виробництві і селекції великого рогатого скоту / Б. П. Завертяев. – Л. : Агропромиздат, 1989. – 255 с.
4. Квасницький А. В. Трансплантація ембріонів і генетична інженерія в твариніводстві / А. В. Квасницький, Н. А. Мартиненко, А. Г. Близнюченко. – К. : Урожай, 1988. – 260 с.
5. Коваленко В. П. Біотехнологія у тваринництві й генетиці / В. П. Коваленко, І. Ю. Горбатенко. – К. : Урожай, 1992. – 150 с.
6. Осташко Ф. І. Біотехнологія виробництва великого рогатого скоту / Ф. І. Осташко. – К. : Аграрна наука, 1995. – 183 с.
7. Яблонський В. А. Трансплантація ембріонів у сільськогосподарських тварин / В. А. Яблонський. – Кишинів, 1988. – 96 с.
8. Яблонський В. А. Практичне акушерство, гінекологія та біотехнологія відтворення тварин з основами андрології / В. А. Яблонський. – К. : Мета, 2002. – 317 с.
9. Яблонський В. А. Біотехнологія відтворення тварин / В. А. Яблонський. – К. : Арістей, 2005. – 293 с.
10. Яблонський В. А. Біотехнологічні і молекулярно-генетичні основи відтворення тварин / В. А. Яблонський. – Львів : Афіша, 2009. – 217с.

Навчальне видання

БІОТЕХНОЛОГІЯ РЕПРОДУКЦІЇ ОРГАНІЗМІВ

Методичні рекомендації

Укладачі: **Мельник** Володимир Олександрович
Кравченко Олена Олександрівна

Формат 60×84.1/16. Ум. друк. арк. 3,5
Тираж ___ прим. Зам № _____

Надруковано у видавничому відділі
Миколаївського національного аграрного університету.
54020, м. Миколаїв, вул. Паризької комуни, 9

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 4490 від 20.02.2013

