

ЧАСТЬ 1.

БИОТЕХНИКА РАЗМНОЖЕНИЯ ЖИВОТНЫХ

ПОЛОВЫЕ ОРГАНЫ САМОК И ИХ ФУНКЦИЯ

Цель занятий: приобретение студентами глубоких знаний морфо-функциональных качеств и топографии половых органов небеременных самок сельскохозяйственных животных.

Объекты исследований, материалы и оборудование: животные - корова, кобыла, коза (овца), свинья; случная шлея (повал), носовые щипцы, веревки для фиксации животных; половые органы убитых самок; муляжи, рисунки, диаграммы, слайды, гистопрепараты; перчатки резиновые и одноразовые полиэтиленовые; анатомические и хирургические пинцеты, анатомические ножи; скальпели брюшистые, острокопечные и глазные; ножницы прямые и Купера, хирургические зонды; микроскопы МБР и МБС-9(10), предметные и покровные, часовые стекла, чашки Петри (маркированные), стеклянные палочки и трубочки диаметром 2-3 мм; влагалищные зеркала и осветители к ним; красители (Романовского-Гимза), физиологический раствор, среда Дюльбекко, спирт метиловый (этиловый 96%-ный); шприцы и иглы, пипетки глазные, весы, измерительные линейки и ленты, штангенциркули, лупы, кюветы, тазы.

Методические указания.

Занятия проводят в акушерской (ветеринарной) клинике. Сначала преподаватель объясняет студентам функцию и демонстрирует на муляжах, рисунках и слайдах, диаграммах и гистопрепаратах топографию, внешние свойства и гистологическое строение половых органов коров, овец, свиней и кобыл. Затем студенты, разделившись на небольшие группы (по 3-4 человека), под контролем преподавателя осматривают подготовленные на отдельных столиках половые органы убитых самок и препарируют их в такой последовательности:

наружные половые органы;
влагалище;
матка (шейка, тело, рога), слои стенки матки;
яйцепроводы (истмическая и ампулярная часть, воронка);
яичники (форма, величина, наличие желтых тел и фолликулов), оболочки и слои яичника; из полостных крупных фолликулов извлекают фолликулярную жидкость и исследуют под микроскопом для обнаружения ооцита; при обнаружении в яичниках овуляции промывают яйцепровод и матку физиологическим раствором (средой Дюльбекко) и промывную жидкость также исследуют под микроскопом;

После изучения свежих препаратов половых органов (убитых животных) в манеж заводят поочередно небеременных корову, кобылу, свинью и овцу и осматривают сначала наружные половые органы, а затем с помощью влагалищного зеркала - влагалище и шейку матки (у свиньи осматривают только наружные половые органы). Готовят мазок-отпечаток с слизистой оболочки преддверия влагалища коровы, окрашивают и рассматривают под микроскопом.

Для контроля за освоением изучаемого материала в конце занятия (3-4 часа) преподаватель задает студентам несколько **вопросов:**

1. *Какую функцию выполняют яичники, яйцепроводы, матка, влагалище, клитор, преддверие влагалища?*
2. *Какие имеются особенности в строении яичников коровы, свиньи, кобылы?*
3. *Какие половые гормоны выделяют яичники? Их биологическое действие на организм самки?*
4. *Как происходит созревание фолликулов в яичниках, какие изменения претерпевает половая клетка и на какой стадии развития находится она перед овуляцией?*
5. *Какие эпителиальные клетки различают в покровном эпителии влагалища и какова характерная картина вестибулярного мазка-отпечатка коровы в различные фазы полового цикла?*
6. *В каких участках половых путей эпителиальные клетки (или железы) продуцируют слизь?*
7. *К какому типу относят матку коровы и овцы, свиньи, кобылы?*
8. *Каков мочеполовой клапан у интактных телок, свинок, кобылок?*

Половые органы самок: наружные и внутренние. К **наружным** органам (*genitalia externa*) относят половые губы, преддверие влагалища и клитор; к **внутренним** (*genitalia interna*) - яичники, яйцепроводы, матку и влагалище. В зависимости от вида животных и физиологического состояния

внутренние половые органы расположены в тазовой или брюшной полости (рис. 1). Удерживаются они с помощью *широких маточных связок* (ligamenta lata uteri). Связки представляют собой удвоение брюшины, идущее от поясничной области. В связках проходят сосуды и нервы.

Яичники, яйцепроводы и матка снабжаются кровью парных артерий: семенной внутренней и маточных средней и задней артерий. *Внутренняя семенная артерия* (a. spermatica interna) отходит от аорты в области 4-го поясничного позвонка, разделяется на *яичниковую ветвь* (ramus ovaricus) и *переднюю маточную* (a. uterina cranialis), сильно извилистую в области вершины маточного рога. Артерия тесно прилегает к маточной вене и это обуславливает попадание ряда веществ (простагландины) из матки непосредственно в кровь артерии и затем в яичник. *Средняя маточная артерия* (a. uterina media) отходит - от *наружной тазовой* (a. iliaca externa) у кобыл и от *пупочной* (a. umbilicalis) у коров. Эта артерия хорошо развита и ее ветви образуют анастомозы между собой и с ветвями передней и задней маточных артерий. *Задняя маточная артерия* (a. uterina caudalis) отходит от *геморроидальной* (a. haemorrhoidalis) у кобыл и от *мочеполовой* (a. urogenitalis) у коров; снабжает кровью заднюю часть матки и влагалище. Преддверие влагалища и частично влагалище снабжаются кровью из *внутренней срамной* (a. pudenda interna) и *запирательной* (a. obturatoria) артерий. Отток крови из половых органов осуществляется по одноименным венам. У овец средние маточные вены отсутствуют, а кровь оттекает по передним пузырьным и задним маточным венам.

Иннервируются половые органы симпатическими и парасимпатическими нервными стволами. У кобыл, коров, свиней и сук источником симпатических нервных стволов, идущих к половым органам, является *каудальный брыжеечный узел*. Он соединен с спинномозговыми нервами белыми соединительными ветвями и, следовательно, через спинной мозг поясничной области и через нервные сплетения брюшной полости проводящими путями с центральными отделами нервной системы. Парасимпатические нервные ветви отходят от крестцовых нервов.

Лимфатическая система гениталиев представлена: капиллярами, которые залегают во всех оболочках половых органов, интраорганными и афферентными экстра органными сосудами, крупно-петлистыми сосудистыми сплетениями, расположенными в маточных связках, крупными магистральными афферентными экстра органными сосудами, впадающими в региональные лимфатические узлы, а также эфферентными лимфатическими сосудами и протоками, которые соединяются и впадают в поясничный проток.

Половые органы коров и телок

Половые губы (labium pudenda, vulva) — представляют собой два валиковидных выпячивания, расположенных над седалищными буграми. Со-

единяясь, половые губы образуют верхний и нижний углы половой щели (*commissura labiorum superior et inferior*). Верхний угол закругленный, нижний - острый, имеет пучок длинных волос (рис. 2а, в). У нормальных животных пучок волос клиновидный, а у телок фримартинов - веерообразный. Наружная поверхность половых губ покрыта нежной пигментированной или непигментированной кожей, в которой находятся потовые и сальные железы; внутренняя поверхность покрыта плоским многослойным эпителием. В толще губ содержатся мышечные волокна *сжимателя вульвы* (*m. constrictor vulvae*) и соединительная ткань. В верхней части мышечные волокна переходят в промежность и сливаются со сфинктером ануса, внизу окружают клитор, а впереди переходят в стенку преддверия влагалища.

Клитор (*clitor*) - гомолог полового члена, расположен внизу преддверия влагалища (рис. 2в). Начинается в виде двух пещеристых тел на седалищных буграх. Вместе они образуют тело клитора, которое покрыто плотной оболочкой. Заканчивается клитор заостренной головкой в нижнем углу половой щели.

Между анусом и половой щелью находится *промежность* (*perineum*), представленная в основном рыхлой соединительной тканью. Она простирается вглубь между прямой кишкой и половым каналом и сходит на клин. От анального отверстия до верхнего угла половой щели кожа промежности образует небольшое валиковидное возвышение - шов промежности.

Преддверие влагалища (*vestibulum vaginae*) - представляет собой узкий участок вагинальной трубки длиной 4-8 см. В норме оно сжато с боков и на разрезе представляет вертикальную щель. От половой щели по направлению к влагалищу канал преддверия направлен снизу вверх и вперед. На границе с влагалищем открывается отверстие мочеиспускательного канала, нижняя стенка которого имеет *слепой мешок* (*diverticulum suburethrale*) глубиной 2 см. По бокам от отверстия и кзади от него находятся выводные протоки *Бартолиниевых* желез (больших преддверных, *gl. vestibulares major*). У коров эти железы величиной с крупный боб.

В процессе препаровки половых органов ножницами и скальпелем отделяют конечную часть прямой кишки от влагалища и преддверия влагалища и полностью разрезают промежность. Затем прямыми ножницами разрезают верхнюю спайку половых губ и продолжают продольный разрез преддверия влагалища и влагалища. Находят выводные протоки Бартолиниевых желез и вставляют в них тонкий мандрен (спичку), а затем отделяют полностью со стороны наружной оболочки половых путей. Бартолиниевы железы содержат муциноподобный секрет, который выделяется в период течки.

Стенка преддверия влагалища состоит из слизистой, мышечной и соединительно-тканной оболочек. *Слизистая* оболочка толстая, образует продольные складки; покрыта многослойным плоским эпителием. В течение цикла эпителиальные клетки этой оболочки, как и клетки влагалища, подвергаются изменениям. В мазке-отпечатке с задней боковой стенки преддверия

рия влагалища в фазу *про-эструс* обнаруживаются малые и большие промежуточные эпителиальные клетки, эритроциты, иногда лейкоциты. В фазу *эструс* преимущественно большие промежуточные эпителиальные клетки, безъядерные клетки или клетки вакуолизированные с небольшим пикнотическим ядром и эритроциты. Лейкоциты встречаются редко, только в начале эструса, а в конце этой стадии доминируют безъядерные эпителиальные клетки. В фазу *мет-эструс* в мазке обнаруживается много полиморфонуклеарных лейкоцитов, исчезают безъядерные клетки, уменьшается число больших промежуточных клеток, появляются парабазальные клетки и малые промежуточные эпителиальные клетки, которые в последующем становятся вакуолизированными. При анэструсе в мазке преобладают парабазальные и малые промежуточные эпителиальные клетки (рис. 3).

В период охоты и несколько дней спустя слизь образует рисунок в виде листка папоротника. В середине цикла в мазке в основном находятся малые эпителиальные клетки с крупным ядром, а также лейкоциты. На нижней стенке преддверия влагалища возле клитора в глубине слизистой оболочки расположены отверстия слабо развитых *малых преддверных* (gl. vestibulares minores) желез. *Мышечная* оболочка содержит гладкие волокна, но в заднем участке ее имеется значительное количество пучков поперечно-полосатых мышц. В боковой стенке преддверия, ближе к половой щели, расположено венозное сплетение (bulbus vestibuli), напоминающее пещеристое тело уретры самцов. *Наружная* оболочка преддверия состоит из рыхлой соединительной ткани, которая переходит в ткань промежности и прямой кишки.

Влагалище (vaginae, colpos) — дистальная часть внутренних половых органов, представляет собой широкую трубку длиной до 22 см; является органом совокупления. Расположено влагалище в тазу. Начинается от шейки матки и сзади переходит в более узкое преддверие влагалища. В норме влагалище сжато сверху вниз и на разрезе представляет собой горизонтальную щель. Передняя часть влагалища снаружи покрыта *серозной* оболочкой. Простирается она по верхней стенке на 7-12 см и затем с влагалища переходит на прямую кишку. Внизу влагалище почти по всей длине прочно сращено с мочеиспускательным каналом. С боков между стенками влагалища и каналом таза находится соединительно-тканная адвентиция. *Мышечная* оболочка влагалища состоит из двух слоев гладких мышц: наружного слоя продольных волокон и внутреннего слоя, представленного поперечными волокнами. *Слизистая* оболочка покрыта плоским многослойным эпителием и не имеет желез. Она образует большое количество глубоких продольных и слабо выраженных поперечных складок. Возле шейки матки слизистая влагалища состоит из многослойных, вырабатывающих слизь клеток и тонких эпителиальных клеток. По направлению к преддверию влагалища число слизеобразующих клеток резко уменьшается. В этом участке слизистая оболочка утолщена, и ее поверхностный эпителий может ороговеть. У телок в

месте перехода влагалища в преддверие влагалища отмечается сужение полового канала. Впереди отверстия мочеиспускательного канала находится перегородка - *мочеполовой клапан* (hymen). Перегородка имеет вид связки различной ширины и толщины (рис. 2в). У взрослых телок толщина перегородки варьирует от 1 до 2,5 мм, ширина - от 2 до 4-6 мм. В месте прикрепления перегородки к верхней и нижней стенкам влагалища ширина ее значительно увеличивается. Здесь она плавно переходит в продольные складки влагалища. Высота перегородки не превышает 8-10 мм. При препаровке половых органов интактных телок разрез верхней стенки в этом месте делают осторожно, чтобы не повредить целостность клапана и затем исследовать его.

Впереди влагалище ампуловидно расширяется и обхватывает со всех сторон влагалищную часть шейки матки. Здесь между шейкой матки и стенками влагалища образуются боковые, верхний и нижний карманы. Наиболее хорошо выражен верхний карман - *свод влагалища* (fornix vaginae). В стенке влагалища по бокам от отверстия мочеиспускательного канала в краиниальном направлении у многих животных идут два слепо заканчивающихся канала - остатки Вольфовых протоков - *Гартнеровы ходы* (ductus Gartneri). Длина их составляет 4-7 см. Нередко трудно обнаружить выводные отверстия каналов или же обнаруживается отверстие только с одной стороны.

Матка (uterus, hystera, metra) служитместилищем для плода, обеспечивает рост и развитие его, а затем и выведение через родовые пути. У телок и небеременных молодых коров матка находится в тазовой полости, в ложбине лонного сращения. У много рожавших коров в расслабленном состоянии она смещается в брюшную полость. *Шейка матки* (cervix) длиной 5-10 см, толщиной 3-4,5 см расположена в тазу и лишь в середине беременности перемещается в брюшную полость. Она плотная, с толстыми стенками, четко ограничена и хорошо прощупывается рукой через прямую кишку. Задняя часть шейки матки на 2-3 см выдается во влагалище, образуя ясно выраженную влагалищную часть, в которой находится *наружное устье* (orificium externum). *Тело матки* (corpus uteri) сравнительно мягкое, длиной 2-5 см, впереди разделяется на два *рога* (cornua uteri). На протяжении 10-15 см рога сращены между собой (рис. 2а, б). В этом месте между ними снаружи хорошо заметна межроговая борозда (*желоб*). После раздвоения (*бифуркации*) рога расходятся в стороны, затем загибаются вниз и назад, а конечная часть их приподнимается вверх к яичникам и переходит в яйцепроводы. В месте расхождения рога имеют диаметр 2-3,5 см, но по направлению к верхушке сильно истончаются. В среднем длина рогов небеременных телок составляет 28 см, ширина 2,4 см, а у взрослых коров соответственно 32,5 и 3,4 см. Толщина стенок тела и рогов матки у коров 8-12 мм.

Стенка матки состоит из трех оболочек: серозной, мышечной и слизистой. *Серозная оболочка* (perimetrium) покрывает матку снаружи. С боков

тела и шейки и по малой кривизне рогов матки серозная оболочка переходит в широкие маточные связки (*ligamenta lata uteri*), на которых она и подвешена. *Мышечная оболочка* (*myometrium*) состоит из трех слоев гладких мышц. Слой наружных продольных волокон отделен сосудистым слоем от двух других слоев циркулярных и продольных волокон. В области шейки матки мышечные слои толще, особенно циркулярный слой. *Слизистая оболочка* матки (*endometrium*) имеет трубчатые железы, которых насчитывается около 1 млн., изнутри покрыта псевдомногорядным призматическим мерцательным эпителием. В области тела и рогов матки в эндометрии имеются особые образования - *карункулы* (*carunculae uteri*). В каждом роге 4 ряда карункулов, по 10-14 в ряду, всего 80-112.

Слизистая оболочка шейки матки образует многочисленные мелкие продольные и толстые поперечные складки или кольца. Противоположные складки заходят одна за другую, образуя извилистый *цервикальный канал* (*canalis cervicis*), который открывается *внутренним отверстием* (*orificium internum*) в тело матки. В области влагалищной части шейки мощно развитые поперечные складки слизистой оболочки (верхняя и нижняя) образуют отчетливо выраженную розетку. Поверхностный эпителий слизистой оболочки шейки матки имеет многочисленные слизеобразующие (бокаловидные) клетки. Они постоянно выделяют слизь, закупоривающую цервикальный канал.

Яйцепроводы (*oviductus, tuba uterina, salpinx*) - две извитые трубочки, служат местом оплодотворения яйцеклеток и обеспечивают проведение их в рога матки. Располагаются яйцепроводы в складках брюшины (*mesosalpinx*), простирающихся от верхушки рогов матки до яичника. Канал яйцепровода начинается от верхушки соответствующего рога матки узким маточным отверстием. В зависимости от возраста животных длина яйцепроводов колеблется от 20 до 35 см. Наименьший диаметр (1-3 мм) яйцепроводы имеют в области *перешейка* (*istmus*), который примыкает к рогу матки и составляет около половины всей длины. Средняя часть - *ампула*, имеет диаметр 3-5 мм, а конечная часть - *воронка* - 5-7 мм. Воронка открывается отверстием в брюшную полость. Свободный длинный край воронки называют *бахромкой* (*fimbriae tubae*). Бахромка тесно прилегает к поверхности яичника и это обеспечивает попадание овулировавших яиц в отверстие яйцепровода. Стенка яйцепровода состоит из трех оболочек: серозной, мышечной и слизистой. *Серозная оболочка* представлена в основном эпителиальным слоем брюшины и частично двумя слоями широкой маточной связки. *Мышечная оболочка* состоит из трех слоев гладких мышц: мощного внутреннего кольцевого и двух более тонких продольных поверхностных слоев. Наиболее толстая мышечная оболочка в месте соединения яйцепровода с маткой. *Слизистая оболочка* покрыта псевдомногорядным мерцательным эпителием, который в узкой части яйцепровода образует 4-8 низких продольных скла-

док, а в воронке - до 20-40 более высоких складок. Движение ресничек эпителия направлено в сторону матки.

Яичники (ovaria, oophoron) - половые железы, вырабатывают яйцеклетки и половые гормоны. Расположены на границе тазовой и брюшной полости. У небеременных коров они чаще находятся у края подвздошной ямки на границе с лонным сращением, реже между подвздошной ямкой и концом маточного рога. К верхушкам рогов матки яичники прикреплены с помощью яичниковой связки, которая является частью широкой маточной связки. Яичниковая связка образует две складки: *яйцепроводную* (mesosalpinx), в которую заключен яйцепровод, и *яичниковую* (lig. ovarii proprium), более толстую и содержащую пучки гладких мышечных волокон; последняя соединяет яичник с боковой поверхностью рога матки. Складки, соединяясь, образуют открытый *яичниковый карман*. В нем располагается яичник.

Типичная форма яичников яйцевидная или округлая, но иногда они могут быть плоскими или иметь неправильную форму, что зависит от наличия в них фолликулов или желтых тел (рис. 4б). Длина яичника - 32-42 мм, ширина - 19-32 мм и толщина - 13-19 мм. Масса каждого яичника составляет 10-19 г. Вся поверхность яичника, за исключением прикрепленного края, покрыта однослойным кубическим эпителием. Под ним располагается *собственная белочная оболочка*. Она придает яичнику соответствующую форму. Вся остальная масса яичника состоит из двух слоев: периферического коркового и центрального мозгового. На разрезе они не четко разделены между собой. *Мозговой* слой содержит кровеносные сосуды, нервы и рыхлую соединительную ткань. *Корковый* (паренхиматозный) слой занимает большую часть яичника и состоит из клеток соединительной ткани, желтых тел и фолликулов на различных стадиях развития.

Половые органы овцы

Половой аппарат овцы аналогичен половому аппарату коров и отличается лишь размерами (рис. 5). Длина *преддверия влагалища* составляет 4-5 см, *влагалища* - 8-12 см, *шейки матки* - 5-7 см, *тела* - 3-5 см, *рогов матки* - 10-20 см, *яйцепроводов* - 10-15 см. **Яичники** имеют овальную или яйцевидную форму, относительно крупные (в период ди-эструса 1,3·1,1·0,8 см) массой от 0,6 до 3 г.

Половые органы свиньи

Половые губы выделяются в виде треугольника, нижний угол которого образован их заостренной спайкой. **Клитор** тонкий, длинный, оканчивается продолговатой головкой. **Преддверие влагалища** длиной 5-8 см, имеет хорошо выраженные продольные складки слизистой оболочки. В толще ее рядами заложены малые вестибулярные железы. В нижней части боковых стенок преддверия имеются пещеристые образования. Преддверие влагалища и влагалище имеют длину 15-23 см, при соотношении их 2:1 (рис. 6б). **Влагалище** узкое, длиной 10-15 см. На границе с преддверием у интактных

свинок заметно сужение полового канала, а впереди отверстия мочеиспускательного канала обнаруживается такая же перегородка, как и у телок.

Матка двурогая двураздельная. *Шейка матки* длиной 10-15 см без резких границ переходит сзади во влагалище, а впереди в короткое (2-3 см) *тело матки*. *Рога матки* в правой половине брюшной полости расходятся на обе стороны от тела матки и образуют большое число петель, которые у молодых свинок располагаются недалеко от тазовой полости, а у рожавших - глубоко в брюшной полости. Длина их составляет соответственно 50-75 см и 90-200 см. Левый рог на 3- 8 см длиннее правого. Задние участки рогов срастаются своими стенками на протяжении 4-6 см. Диаметр рогов достигает 6 см, толщина стенок 2-4 мм. Слизистая оболочка матки темно-красного цвета, сильно складчатая. В области шейки складки в виде многочисленных (15-20) треугольных выступов расположены с боков. Верхушки их не совпадают, в результате чего канал шейки матки образует кривую штопорообразную линию. По направлению к телу матки и, особенно, влагалищу складки сглаживаются.

Яйцепроводы у свиньи выделяются отчетливо; длина их 15-28 см. Истмическая часть узкая, диаметром до 2-3 мм, составляет четвертую часть длины яйцепровода, средняя часть - ампула, толщиной 3-5 мм и воронка 5-6 мм. Конечная часть воронки очень расширена.

Яичники у половозрелых животных похожи на ягоду малины, имеют неправильную форму и размеры 4х3х3 см. У взрослых свиноматок яичники округлой формы, диаметром около 5 см. Поверхность их бугристая, что связано с наличием большого количества крупных фолликулов и желтых тел. Расположены в брюшной полости на уровне 4-5-го поясничного позвонка в хорошо выраженных яичниковых карманах и тесно прилегают к мощно развитой бахромке яйцепровода.

Половые органы кобылы

Половые губы вверху образуют заостренный край, переходящий в шов промежности; нижний край их закругленный, прикрывает головку клитора полушаровидной формы. По бокам головки имеются хорошо выраженные складки слизистой оболочки преддверия влагалища (рис. 6а).

Преддверие влагалища длиной 8-16 см. По бокам его под слизистой оболочкой и отчасти под сжимателем вульвы имеются два пещеристых тела. В верхней части преддверия на 1,5-2,5 см впереди половой щели расположены выводные протоки Бартолиновых желез, а по бокам его в толще слизистой оболочки расположены два ряда трубчатых желез, открывающихся в просвет преддверия несколькими выводными протоками. **Влагалище** длиной 15-30 см. У молодых кобылок в задней части по всей окружности влагалища имеется хорошо выраженная поперечная складка (мочеполовой клапан) толщиной 2-3 мм с центральным отверстием.

Матка кобылы типично двурогая. *Шейка матки* длиной 4-8 см, диаметром 3-5 см, сзади выдается в полость влагалища. Эта часть ее имеет форму втулки; в центре ее расположено устье шейки матки. *Тело матки* представляет собой большой полый орган длиной 8-15 см и шириной 7-12 см. Впереди разделяется на два *рога*, длина их 8-15 см и ширина 4-7 см. Рога расходятся в стороны, несколько вперед и вверх. Слизистая оболочка тела и рогов матки образует много продольных складок, сверху покрыта высоким цилиндрическим мерцательным эпителием; в толще ее расположены ветвящиеся трубчатые железы. В области шейки матки слизистая оболочка формирует большое количество продольных складок различной высоты.

Яйцепроводы имеют вид сильно извитых трубочек, длиной 15-30 см. Расширенный брюшной конец яйцепровода (воронка) имеет неровные края, тесно прилегает к яичнику в области *овуляционной ямки*. Широкий край ее - *бахромка* полностью прикрывает овуляционную ямку.

Яичники чаще бобовидной, иногда округлой или неправильной овальной формы, подвижные, находятся в поясничной части брюшной полости вблизи верхушек рогов матки, несколько выше их. Правый яичник расположен на уровне третьего поясничного позвонка, на ладонь ниже от почек и в сторону тазовой полости, а левый - на уровне четвертого поясничного позвонка. Величина яичников различная в течение года: поздней осенью и зимой они небольшие (длиной 6 см, толщиной 4 см и шириной 3 см), а в весенний период увеличиваются, что в основном зависит от наличия развивающихся фолликулов, диаметр которых достигает 4-7 см. Снаружи яичники покрыты *серозной оболочкой*. Под ней расположена плотная фиброзного типа *белочная оболочка*, покрывающая почти весь яичник, за исключением *овуляционной ямки* (ovulation fossa), свободной от серозной оболочки и выстланной зародышевым эпителием. Расположена овуляционная ямка по малой кривизне над *корковым слоем* и имеет бархатистый вид. *Мозговой слой* яичника расположен по большой кривизне. В этом месте прикрепляется яичниковая связка и здесь начинается серозный покров яичника.

Извлечение ооцитов из яйцепроводов и яичников

Для изучения ооцитов можно использовать яичники всех видов животных. В корковом слое яичников имеется большое количество *первичных* (primordial) фолликулов. Каждый фолликул состоит из оогония и слоя фолликулярных клеток. В процессе роста фолликул глубже погружается в корковый слой. Оогоний увеличивается в несколько раз и превращается в первичный ооцит. Вокруг него образуется прозрачная оболочка. В это же время происходит рост и увеличение количества плоских эпителиальных (фолликулярных) клеток вокруг ооцита. Количество слоев увеличивается до двух, а затем до трех и более.

После окончания роста ооцита фолликулярные клетки в нескольких местах расходятся и в образовавшихся полостях накапливается жидкость.

Постепенно полости объединяются в одну большую полость. Яйцо оттесняется к стенке фолликула. Оно располагается в скоплении эпителиальных клеток, в *яйцевом* бугорке (*cumulus oophorus*, рис. 4а). Те клетки, которые непосредственно окружают яйцо, образуют кольцо - *лучистый венец* (*corona radiata*). Ободок клеток, выстилающих полость фолликула, называют *гранулезой*. Содержащаяся в полости *фолликулярная* жидкость вязкая, богата эстрогенами. Она способствует увеличению и растяжению фолликула и выходу его из коркового слоя на поверхность яичника.

Гранулезные клетки окружены мембраной. Вокруг нее расположены два слоя клеток, которые образуют оболочку фолликула. Внутренний слой (*theca interna*) окружает фолликул с момента роста ооцита до овуляции. Клетки внутреннего слоя играют большую роль в продуцировании половых гормонов и в образовании желтого тела. Их ядра округлые, в отличие от удлиненных, расположенных концентрическими слоями вокруг фолликула, ядер клеток наружной оболочки (*theca externa*). Состоит наружная оболочка преимущественно из соединительной ткани и гладких мышечных волокон, обильно снабжена кровеносными сосудами.

Если при анатомическом исследовании в яичниках обнаруживаются крупные полостные фолликулы, то можно извлечь ооциты из них. Если установлено, что овуляция уже произошла, то следует попытаться извлечь яйцеклетки из яйцепроводов и матки. В зависимости от предполагаемых сроков овуляции промывают различные участки половых путей. У овец в первые трое суток промыванию подвергают яйцепроводы, а иногда и конечную часть рогов матки; на 5-7-й день делают смывы из большей части рогов матки, а после 9-го дня - промывают всю матку. У коров в первые 3-4 дня промывают яйцепроводы, а в последующем - яйцепроводы и матку. У свиней яйцепроводы промывают в течение первых 2-х дней после овуляции.

Для извлечения зародышей из яйцепроводов в воронку его вводят стеклянную трубочку (внутренний диаметр 2 мм) на глубину 3-5 см и свободный конец ее помещают в маркированную чашку Петри. Физиологический раствор (среду Дюльбекко) 2-3 мл вводят при помощи шприца с иглой в яйцепровод в месте соединения с маточным рогом и всю жидкость собирают. Если извлекают зародыши из рога матки (овца, корова), тогда тупой иглой прокалывают стенку на расстоянии 4-6 см от соединения его с яйцепроводом и через прокол вставляют стеклянную трубочку (канюлю) в рог матки, а свободный конец ее помещают в емкость (чашку Петри) для зародышей. В просвет матки в месте соединения с яйцепроводом шприцем с иглой вводят несколько мл раствора. Чтобы раствор не терялся, рог матки за канюлей пережимают хирургическим пинцетом. Если зародыши (овца) извлекают на 5-7 день от начала охоты, то используют 5-10 мл раствора и делают смывы из большей части рогов матки. А для получения бластоцист через 9 дней после начала охоты промывают всю матку. При этом шейку матки пережимают зажимом, раствор вводят в верхушку одного рога матки,

а собирают его через канюлю, вставленную в противоположный яйцепровод.

Собранный после промывания раствор исследуют под микроскопом МБС-9 или МБС-10.

Для получения ооцитов из зрелых фолликулов их осторожно вскрывают глазным скальпелем. Фолликулярную жидкость собирают в чашку Петри. Ооцит находится в прозрачной студенистой массе. Капельку этой массы наматывают на кончик глазного скальпеля и помещают на предметное (часовое) стекло, на которое предварительно наносят капельку физиологического раствора, и исследуют под микроскопом.

При наличии в яичниках незрелых крупных полостных фолликулов их также вскрывают и после удаления фолликулярной жидкости выскабливают стенку небольшой ложечкой Фолькмана. Собранный вязкую массу смывают тщательно несколькими каплями физиологического раствора на предметное (часовое) стекло и микроскопируют.

Исследование наружных половых органов и влагалища

Для клинического исследования коровы и кобылы их помещают в станок или надежно фиксируют. Корову коротко привязывают (в стойле, манеже, загоне) и дополнительно фиксируют одной рукой за складку кожи в области коленного сустава, а другой - за складку кожи на спине. Беспокойных животных фиксируют за рога и носовую перегородку. Кобылу удобнее исследовать в хорошо освещенном манеже; тазовые конечности ее фиксируют случной шлеей. Козу или овцу удерживают за поводок; свинью осматривают без фиксации в узком станке. Мелких животных помещают на стол и при необходимости фиксируют.

Сначала осматривают наружные половые органы и промежность, а также корень хвоста и седалищные бугры. Затем левой рукой, обращенной ладонью к животному и повернутой пальцами вниз, приоткрывают половую щель. Обращают внимание на величину вульвы и клитора, пучок волос в нижней спайке половых губ, цвет и состояние слизистой оболочки преддверия влагалища, целостность кожи и шерсти на крестце и седалищных буграх; определяют наличие и внешние свойства слизи или воспалительного экссудата.

У здоровых животных в зависимости от физиологического состояния и фазы полового цикла отсутствуют повреждения вульвы и промежности, слизистая оболочка бледно-розового или желтоватого цвета, покрыта небольшим слоем слизи. В период течки половые губы отекают, увеличены, кожа гладкая, складки расправлены, слизистая оболочка ярко красного цвета, блестящая, обильно покрыта прозрачным секретом. Слизь можно обнаружить и на ягодицах, седалищных буграх. Волос на крестце и седалищных буграх вследствие садок других животных может быть стерт, а эти места болезненны.

При осмотре могут выявляться аномалии наружных половых органов (недоразвитая вульва, увеличенный клитор, наличие повреждений и рубцов), признаки воспаления, полосчатые или точечные кровоизлияния на слизистой оболочке, а также узелки красноватого или желтоватого цвета или пузырьки прозрачные или мутноватые, различного характера воспалительный экссудат.

Влагалище исследуют рукой или путем осмотра с помощью влагалищных зеркал (расширителей) (рис. 7). Перед исследованием наружные половые органы самки тщательно обмывают теплой водой (при сильном загрязнении с мылом) и дезинфицируют раствором фурацилина. На руку с коротко остриженными ногтями надевают мягкую полиэтиленовую перчатку и смачивают ее физиологическим раствором. Перед введением влагалищное зеркало увлажняют теплым физиологическим раствором или раствором натрия гидрокарбоната и к нему прикрепляют специальный осветитель. При использовании трубчатого стеклянного расширителя пользуются внутренним источником освещения или налобной лампой. Однако более эффективно вагинальное исследование при хорошем дневном освещении. Вводят зеркало в половые пути плавно и осторожно, при этом бранши его должны быть сомкнуты, а ручки направлены в сторону. После введения зеркала его поворачивают так, чтобы ручки были направлены вниз. Затем нажимают медленно на ручки и раздвигают бранши, добиваясь нужного расширения полового канала. Для осмотра должны быть доступны полость влагалища и шейка матки.

ПОЛОВЫЕ ОРГАНЫ САМЦОВ И ИХ ФУНКЦИЯ

Цель занятий: приобретение студентами знаний топографии, анатомических особенностей и функции органов размножения самцов сельскохозяйственных животных.

Объекты исследований, материалы и оборудование: животные - бык, баран, жеребец, хряк; половые органы убитых самцов; муляжи, рисунки, диаграммы, слайды, гистопрепараты; перчатки резиновые и полиэтиленовые одноразовые, анатомические и хирургические пинцеты, анатомические ножи, скальпели, ножницы прямые и Купера; микроскопы, предметные и покровные стекла, стеклянные палочки; шприцы и иглы, измерительные линейки и ленты, весы, штангенциркули, лупы, кюветы, тазы.

Методические указания.

Занятия проводят в акушерской (ветеринарной) клинике. Сначала преподаватель демонстрирует студентам на муляжах, рисунках и слайдах, диаграммах, гистопрепаратах топографию, внешние свойства и гистологическое строение половых органов быков, хряков и других животных, объясняет их функцию. Затем студенты, разделившись на небольшие группы (по 3-4 человека), под контролем преподавателя осматривают подготовленные на отдельных столиках половые органы убитых самцов и препарируют их в такой последовательности:

мошонка: форма, величина, оболочки;

семенники и придатки семенников: форма, величина (длина, толщина и ширина) и масса, консистенция, строение на разрезе, связь придатка с семенником; содержимое канала придатка рассматривают под микроскопом;

семенные канатики: место прикрепления к семеннику, составные части (спермиопроводы и их конечная часть - ампулы, кровеносные сосуды и нервы, внутренний подниматель семенника);

тазовая часть мочеполового канала и придаточные половые железы - пузырьковидные, предстательная (тело и рассеянная часть) и куперовы - расположение относительно тазовой части уретры, величина и форма, выводные протоки;

половой член и пенисовая часть мочеполового канала;

препуций (препуциальный мешок).

После изучения по наглядным пособиям и свежим препаратам половых органов убитых животных в манеж заводят быка (при содержании в клинике - используют самцов и других видов животных), осматривают и пальпируют его половые органы: семенниковый мешок с семенниками, тело и S-образный изгиб пениса, головку пениса и препуций. У быков определяют внешние промеры семенникового мешка.

В конце занятия (3-4 часа) преподаватель задает студентам несколько **вопросов**:

1. *Какую функцию выполняют семенники и придатки семенников, мошонка и наружный подниматель семенника, спермиопровод, пенис и уретра, придаточные половые железы?*
2. *Каковы особенности расположения семенников и мошонки у быка, жеребца, хряка?*
3. *Какие клетки имеются в стенке семенных канальцев и между канальцами?*
4. *Какие клетки семенника продуцируют половые гормоны, биологически активные вещества? Какова роль тестостерона, андроген связывающего протеина, ингибина, ГнРГ в регуляции сперматогенеза и функции самцов?*
5. *Какие факторы влияют на сперматогенез у самцов сельскохозяйственных животных?*

Половые органы самцов состоят из двух половых желез - *семенников с придатками* и *спермиопроводов; мошонки*, в которой находятся семенники; *полового члена* с наружным половым протоком - *мочеполовым каналом (уретрой)*; придаточных половых желез: *пузырьковидных, предстательной и куперовых (луковичных)*.

Мошонка (scrotum) представляет собой мешок, состоящий из двух полостей; расположена в паховой области между бедрами позади рудиментарных сосков. Снаружи мошонка разделена в медианной плоскости вертикальной бороздой (raphe scroti) на две половины. У быков, баранов и козлов она несколько сплюснута спереди назад и имеет отчетливо выраженную *шейку*. У жеребцов мошонка занимает почти горизонтальное положение, а шейка выражена слабо. У хряков мошонка находится позади бедер, имеет косое направление, шейка отсутствует. В каждой полости мошонки располагается семенник, к которому основанием прикреплен семенной канатик.

В процессе препаровки мошонку разрезают вдоль каждого семенника с краниальной стороны, чтобы не повредить придатки семенника. Стенка мошонки состоит из трех слоев: кожи, мускульно-эластической оболочки и общей влагалищной оболочки (рис. 8). *Кожа* (cutis scroti) покрыта нежными волосами и содержит потовые и сальные железы. Она тесно связана с *мускульно-эластической оболочкой* (tunica dartos). Эта оболочка, заворачиваясь внутрь, делит семенниковый мешок на две половины, а в верхней части разделяется на два листка, между которыми располагается половой член. На дне мошонки мускульно-эластическая оболочка рыхло соединяется с *общей влагалищной оболочкой* (tunica vaginalis communis), и их можно легко разъединить. Общая влагалищная оболочка является продолжением париетального листка и поперечной брюшной фасции. Сначала она образует узкие *паховые каналы*, затем расширяется и выстилает обе полости мошонки (cavum vaginale). Она выделяет смазывающую жидкость. К внешней стенке оболочки с задней и наружной стороны прикрепляется *наружный подниматель семенника* (m. cremaster externus). Этот поперечно-полосатый мускул берет начало от внутреннего отверстия пахового канала; он подтягивает семенники.

Мошонка с ее мышцами поддерживает семенники, защищает их от внешних воздействий и обеспечивает постоянную температуру, обычно ниже (на 4-5°C) температуры тела, что важно для сперматогенеза. Относительно постоянная температура семенников у самцов поддерживается благодаря сокращению или расслаблению наружного поднимателя семенника.

Мошонка снабжается кровью наружной семенной артерией (a. spermaticae externa). Иннервация осуществляется наружным семенным нервом (n. spermaticus externus), а также ветвями подвздошно-подчревного и подвздошно-пахового нервов (n. iliohypogastricus, n. ilioinguinalis).

Семенники (testis, orhis, didymis) вырабатывают мужские половые клетки и половые гормоны (тестостерон). Каждый семенник представляет собой овальное, вытянутое тело, подвешен в мошонке на семенном канатике. У жвачных продольная ось семенника расположена вертикально, хвост придатка обращен книзу назад. У жеребца семенники расположены почти горизонтально, хвост придатка находится вверху сзади. У хряка расположение семенников косое, вблизи анального отверстия, хвост придатка находится спереди, вверху (рис. 9).

У быка длина семенника варьирует от 10 до 13 см, ширина - 5-6,5 см, масса - 300-400 г; такой же величины семенники у хряка, а у барана и жеребца они меньше - соответственно - 9-11 x 6 см, масса - 200-300 г и 10-12 x 5-6 см, масса - 200-250 г.

Семенник и придаток семенника покрыты *собственно влагалищной оболочкой* (tunica vaginalis propria), являющейся висцеральным листком брюшины. Она тесно сращена с *белочной оболочкой* (tunica albuginea testis). Белочная оболочка заходит внутрь семенника со стороны головки придатка и образует средостение. От средостения отходят соединительно-тканые перегородки, которые делят семенник на дольки. Перегородки соединяются с поверхностной частью белочной оболочки (рис. 10).

К семеннику в составе *семенного канатика* (funiculus spermaticus) подходят кровеносные сосуды и нервы. Иннервация осуществляется *внутренним семенным* нервом (n. spermaticus internaе), отходящим от заднего брыжеечного узла. Кровоснабжение обеспечивается *внутренней семенной артерией* (a. spermaticae internaе). Этот сосуд в месте соприкосновения с верхним краем семенника немного расширяется, идет дальше по заднему краю и разветвляется под оболочками, образуя систему извилистых артерий, хорошо просматриваемых снаружи. Концевые артерии разветвляются, входят в семенник вдоль средостения и питают ткань семенника.

Паренхима семенника представляет собой мягкую массу желтоватого цвета у быка, беловатого - у козла и барана, темно-бурого - у жеребца и серовато-коричневого или коричневого у хряка и кобеля. Состоит из многочисленных долек (300-400). В каждой долке имеется один или несколько *семенных канальцев* (seminiferous tubule). Промежутки между канальцами

заполнены соединительной тканью, в которой имеются клетки Лейдига, продуцирующие андрогены, а также кровеносные сосуды и нервы.

Образование сперматозоидов происходит в семенных (извитых) канальцах. Диаметр канальцев 100-200 мкм, длина - свыше 1 м. Общая протяженность их у быка достигает 5 км, у хряка - 4-6 км, у кобеля - до 1,2 км. Снаружи канальцы покрыты тонкой мембраной. На ней располагаются эпителиальные клетки двух типов: опорные клетки Сертоли и первичные зародышевые клетки (рис. 11). *Клетки Сертоли* расположены радиально на равных расстояниях друг от друга. Ядра их находятся у основания клеток, а цитоплазма тянется до просвета канальцев. Промежутки между клетками заполнены зародышевыми клетками различной степени дифференциации: *сперматогониями, сперматоцитами и сперматидами*. Клетка Сертоли играют важную роль в питании сформированных, но еще незрелых спермиев. Семенные канальцы направляются к средостению семенника и впадают в *прямые канальцы*, а последние образуют *сеть семенника (rete testis)*.

Придаток семенника (appendix testis, epididymis) представляет собой трубку различной ширины, идущую по всей длине семенника. Состоит из головки, тела и хвоста (рис. 10). *Головка придатка* образована *семявыносящими канальцами (efferent ducts)* и начальной частью *канала придатка (canalis epididymidis)*. Всего семявыносящих канальцев 12-15 (возможно от 6 до 20); длина их 10-20 см. Отходят они от *сети семенника* в месте связи семенника с придатком и сильно извиваясь образуют сосудистый конус. Последний составляет значительную часть придатка и соединен с длинным каналом придатка. В области *головки (head epididymidis)* канал придатка зигзагообразно извивается. Извилины окружены белочной оболочкой и вместе с ней придают головке придатка вид большой плоской трубки. В области *тела придатка (body epididymidis)* амплитуда извилин канала уменьшается, суживается оболочка и это придает телу вид более узкой и прямой трубки. По направлению к нижней части семенника канал расширяется, размах его извилин увеличивается и вместе с окружающей оболочкой он образует массивный *хвост (tail epididymidis)*. Хвост придатка связан с семенником и фиксирован в нижней части мошонки направляющей связкой семенника.

Просвет канала придатка достигает 0,3-1 мм, при этом диаметр его увеличивается от головки к хвосту. Длина канала составляет у быка около 35 м, у хряка - 64 м и у жеребца - 80 м. Образовавшиеся в семеннике спермии продвигаются по каналу придатка, созревают, покрываются липидной оболочкой и накапливаются в нем.

Спермиопровод (ductus deferens) без ясной границы отходит от придатка и тянется вдоль семенника вверх. Вначале он извилист, затем становится более прямым. В составе семенного канатика проходит через паховый канал, а при попадании в брюшную полость отделяется от артерий, вен и нервов и направляется в тазовую полость, где располагается с соответствующей стороны над шейкой мочевого пузыря. В этом месте он ампулооб-

разно расширяется (*ампула спермиопровода*). Вместе с пузырьковидной железой ампула спермиопровода открывается общим протоком на семенном холмике, расположенном вверху начальной части мочеполового канала.

Ампулы спермиопроводов тесно связаны между собой складкой брюшины. У хряка и кобеля ампулы отсутствуют. Спермиопровод снаружи покрыт брюшиной, а в толще своей имеет продольный и кольцевой слои мышц; изнутри он выстлан многослойным цилиндрическим мерцательным эпителием с наличием клеток, обладающих секреторной функцией. В слизистой оболочке конечной части ампул спермиопроводов у жеребца, быка, барана и кобеля имеются трубчатые железы. Они выделяют фруктозу, лимонную кислоту и пигмент липохром, который придает сперме некоторых быков светло-желтый цвет. В ампулах спермиопроводов спермии скапливаются перед эякуляцией. У быков ампулы хорошо пальпируются при ректальном исследовании. Длина их достигает 10-15 см, толщина около 10 мм (с мизинец).

Семенной канатик (*funiculus spermaticus*) представляет собой сдавленный с боков конус, основание которого прикреплено к семеннику и придатку семенника, а вершина доходит до внутреннего пахового кольца. Снаружи покрыт серозной оболочкой, в которую заключены спермиопровод, внутренняя семенная артерия и одноименные вена и нерв, лимфатические сосуды и слабо развитый внутренний подниматель семенника.

Мочеполовой канал (*urethra*) является общим протоком для секретов семенников и придаточных половых желез и для выделения мочи. Начинается от шейки мочевого пузыря, тянется вдоль тазовой полости (*тазовая часть*) и в области большой седалищной вырезки поворачивается вниз вперед и по желобу направляется к головке полового члена, где и заканчивается мочеполовым отверстием (*пенисовая часть*). Изнутри выстлана уретра в начальной части переходным эпителием, а в конечном участке - плоским многослойным эпителием. В толще эпителия имеется много мелких уретральных желез. Средний слой уретры - сосудистый, представлен густым сплетением сильно извитых вен и соединительной тканью с гладкими и эластическими волокнами, которые формируют пещеристое тело мочеполового канала. Располагается оно, главным образом, снизу. Вены в нем расширены, образуют каверны и при наполнении их кровью обеспечивается зияние канала. Снаружи уретра прикрыта мочеполовым (*m. urogenitalis*) и луковично-пещеристым (*m. bulbocavernosus*) мускулами, сокращения которых способствуют выведению спермы и мочи.

Придаточные половые железы - пузырьковидные, предстательная и куперовы - расположены по ходу тазовой части мочеполового канала. Секрет этих желез составляет жидкую часть спермы.

Пузырьковидные железы (*glandulae vesiculares*) у быка (рис. 12) имеют грушевидную форму и бугристую поверхность, расположены по одной с обеих сторон возле ампул спермиопроводов и открываются общими с спер-

миопроводами отверстиями в начальную часть мочеполового канала. Длина желез составляет 10 см или более, толщина - 2,5 см. Они разделены на дольки; выделяют секрет, содержащий фруктозу и лимонную кислоту. Эти железы легко пальпируются при ректальном исследовании половозрелых животных. У мелкого рогатого скота пузырьковидные железы также имеют бугристую поверхность. У барана длина их 5 см, ширина - 2,5 см и толщина - 1,3 см. Величина желез у козла несколько меньше. У жеребца пузырьковидные железы мешковидные, с ровной поверхностью и центральной полостью, в длину достигают 13-15 см. Самые крупные пузырьковидные железы у хряка: длина до 12 см, ширина - 7 см и толщина - 3 см; поверхность их гладкая (рис. 12). У кобеля этих желез нет.

Предстательная железа (gl. prostata) состоит из тела и рассеянной части. Расположена в месте соединения шейки мочевого пузыря с мочеполовым каналом. У быка тело железы состоит из двух слитых воедино частей, имеет вид узкой полоски длиной 4 см, лежащей поперек уретры (рис. 12). Рассеянная часть железы окружает мочеполовой канал сверху и снизу и открывается в него несколькими отверстиями. Эта часть железы прикрыта мочеполовым мускулом и труднее обнаруживается. У барана и козла имеется только рассеянная часть. У жеребца и кобеля тело предстательной железы наиболее хорошо развито, а рассеянная часть выражена слабо или совсем отсутствует. У хряка тело железы крупное, имеет бугристую поверхность; рассеянная часть хорошо выражена. Выделяет предстательная железа жидкий секрет, который богат минеральными веществами и антаглютинином.

Куперовы железы (gl. bulbourethralis) расположены по одной с каждой стороны мочеполового канала. У быков они находятся на расстоянии 10-12 см сзади от предстательной железы и частично прикрыты луковично-пещеристым мускулом. Снаружи они окружены толстым слоем волокнистой ткани и имеют вид небольших эллипсоидных тел беловатого цвета; длина их составляет 2,3 см, толщина 1 см. Протоки открываются одним отверстием в мочеполовой канал. Вырабатывают вязкое слизеподобное вещество. У барана и козла куперовы железы в 2-2,5 раза меньше, у кобеля они отсутствуют. У хряка железы сильно развиты, имеют вид толстых (2-3 см) продолговатых (до 15 см) пластинок шириной 3-4 см. У жеребца они величиной с грецкий орех.

Половой член (penis) - орган совокупления. Имеет прикрепленную часть - *корень*, основную часть - *тело* и свободный конец - *головку*. Основу полового члена составляет пещеристое тело. Оно берет начало от седалищных бугров двумя ножками, которые вскоре сходятся и образуют тело пениса. Пещеристое тело представляет собой трубчатую систему несимметричных кровеносных сосудов, которые при половом возбуждении наполняются кровью при высоком давлении. Этому способствует задержка оттока крови по глубоко расположенным венам вследствие сдавливания их набухающей эректильной тканью. Питание половой член получает от внутрен-

ней срамной (a. pudenda interna) и наружной семенной (a. spermatica externa) артерий.

Снизу пещеристое тело имеет углубление (*желобок*). В нем располагается мочеполовой канал. Снаружи половой член покрыт соединительно-тканной (белочной) оболочкой.

У быка пенис цилиндрической формы длиной около 90 см и 2,5-3 см в диаметре. По направлению к свободному концу он несколько суживается. Пещеристая ткань слабо развита, за исключением корня. В расслабленном состоянии пенис образует S-образный изгиб, который расположен непосредственно сзади мошонки (рис. 9). Выпрямляющий мускул вытягивает пенис вперед, сжимает вены полового члена, тем самым способствует эрекции. За счет выпрямления изгиба длина полового члена увеличивается. Втягивающие (отводящие) мускулы прикреплены к передней части S-образного изгиба и при сокращении придают пенису изогнутое положение. Тело пениса полностью скрыто в области промежности и двухслойной мускульно-эластической оболочке; удерживается подвешивающей связкой пениса.

Головка пениса быка (рис.13) имеет 7 см или более в длину, приплюснута и снабжена острым концом. На головке различают: шейку, отросток мочеполового канала и чехол (колпачок). На *шейке* головки имеется шов, закрученный по ходу головки в левую сторону. Во время эякуляции шов натягивается и конечная часть полового члена заворачивается в сторону, описывая почти полный круг. *Отросток мочеполового канала* не доходит до конца полового члена. В головке пещеристой ткани немного и во время эрекции увеличивается она не сильно, но становится более твердой. Однако и при расслаблении консистенция головка твердая. Покрыта головка пениса тонким многослойным плоским эпителием, образующим много впячиваний в соединительно-тканый слой. Обильно снабжена чувствительными нервными окончаниями из симпатической и парасимпатической нервной системы (концевые части n. pudenda interna, n. spermaticus externus). Рецепторы, воспринимающие холод (*тельца Краузе, генитальные*) и осязательные (*Мейснеровы тельца*), расположены поверхностно. Более глубоко в эпителии находятся чувствительные к давлению нервные окончания - *Фатер-Пачиниевы тельца*.

У хряка, барана и козла половой член, как и у быка, имеет S-образный изгиб. В выпрямленном состоянии пенис достигает длины у хряка 50-70 см, у барана и козла - 40-50 см. У этих животных головка пениса слабо выражена, заострена, причем у хряка она штопорообразно закручена. Мочеполовой отросток у козла и барана продолжается за пределы пениса на 3-4 см; у барана он изогнут, а у козла прямой (рис. 13). У кобеля в передней части пениса заложена кость длиной 8-10 см; головка утолщена, а в задней части ее имеется пещеристое образование (луковица), которая набухает во время эрекции. У жеребца пенис прямой и в состоянии напряжения достигает дли-

ны 90 см или более; головка хорошо развита и содержит много эректильной ткани, которая сильно набухает в процессе совокупительных движений и придает головке грибовидную форму. Отросток мочеполового канала находится в ямке головки.

Головка полового члена располагается в *препуциальном мешке* (praeputium). У быка препуций длиной около 38 см. Внутренняя оболочка препуция имеет два листка: *париетальный*, выстилающий полость препуция, и *висцеральный*, переходящий на половой член; покрыта она плоским многослойным эпителием, сильно складчатая, при выдвигении полового члена складки расправляются и прикрывают тело пениса. В толще своей слизистая оболочка имеет особые сальные железы, которые выделяют препуциальную смегму, способствующую скольжению пениса. Снаружи препуций покрыт кожей; заканчивается отверстием, расположенным позади пупка. Отверстие снабжено пучком длинных волос. У хряка полость препуция разделена кольцевой складкой на широкую переднюю и узкую заднюю части. В верхней стенке передней части находится небольшое отверстие, которое ведет в дивертикул препуция (diverticulum praeputii). У жеребца препуций сложный, образует двойной кожный мешок. В нем различают наружный и внутренний препуции, состоящие, в свою очередь, из наружного и внутреннего листков.

Клиническое исследование половых органов самцов. Животное размещают в хорошо освещенном манеже (или на открытой площадке), фиксируют, затем осматривают половые органы и тщательно пальпируют их. При осмотре обращают внимание на величину и симметричность обеих половин мошонки, целостность кожи ее и препуция. При пальпации семенников (сзади или сбоку) определяют степень подвижности их в полости мошонки, величину и консистенцию. У здоровых самцов семенники эластичные, имеют гладкую поверхность, легко смещаются по направлению к паховому каналу. Головка придатка у быка прощупывается на верхнем конце семенника в виде широкого, изогнутого плоского возвышения; хвост придатка внизу семенника эластичной консистенции, округлый, массивный. У козлов, реже у баранов встречаются случаи закупорки канала придатка семенника (“застой спермы”), связанные с отсутствием протоков в семявыносящих канальцах или с нарушением продвижения сперматозоидов в них. У таких животных в области головки придатка пальпируются утолщения в виде узелков различной величины (до небольшого грецкого ореха); семенники имеют более плотную консистенцию. Изменяется консистенция семенников и с возрастом животных - они становятся более плотными.

Величина семенников прямо коррелирует с основными показателями спермопродукции производителя. У быков и хряков о морфологическом развитии их половых желез можно судить по промерам семенникового меш-

ка. Снимают промеры при помощи мягкой сантиметровой ленты. У быков рекомендуется (Г.Ф. Медведев, С.О. Турчанов) определять:

- окружность мошонки по горизонтали (во фронтальной плоскости) в наиболее широком месте семенникового мешка;

- поперечный обхват мошонки начиная с верхней, латеральной границы правого семенника, по наружной стенке семенникового мешка (в сегментальной плоскости), заканчивая у верхней, латеральной границы левого семенника;

- обхват мошонки по сагиттальной линии начиная с верхней, краниальной границы семенников по медианной линии семенникового мешка (в сагиттальной плоскости), заканчивая у верхней, каудальной границы семенников.

Взятие промеров (*in vivo*) должно производиться при полном опускании обоих семенников в полость мошонки.

Для быков черно-пестрой и голштинской пород разработаны критерии оценки морфологического развития половых желез (табл. 1).

Препуций и половой член осматривают сначала в спокойном состоянии, а затем в момент садки самца на самку (чучело, другого самца). Обращают внимание на состояние слизистой оболочки препуция и полового члена, величину отверстия препуция, полноту выдвижения пениса и отсутствие или наличие уздечки, повреждений и новообразований на головке пениса.

Таблица 1

Минимальные требования к морфологическому развитию половых желез у быков-производителей в различном возрасте (по Г.Ф. Медведеву, С.О. Турчанову)

Промеры семенного мешка	Возраст производителей, лет					
	1	1.5	2	3	4	6
Окружность, мм	315	330	350	360	360	370
Поперечный обхват, мм	325	345	365	385	385	410
Обхват по сагиттальной линии, мм	235	260	260	260	275	300

Придаточные половые железы у быков исследуют рукой через прямую кишку. У них легко пальпируются возле шейки мочевого пузыря ампулы спермиопроводов и пузырьковидные железы.

ОРГАНИЗАЦИЯ И ТЕХНОЛОГИЯ ИСКУССТВЕННОГО ОСЕМЕНЕНИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

Для изучения организации и технологии искусственного осеменения сельскохозяйственных животных проводится ряд лабораторных и практических занятий в аудиториях и лабораториях кафедры, в учебном (или производственном) пункте искусственного осеменения, на фермах и комплексах, в государственном предприятии по племенной работе и искусственному осеменению. При этом целенаправленно и последовательно осуществляется практическое освоение всех элементов метода ИО и знакомство с организацией воспроизводства животных в сельскохозяйственных предприятиях, постановкой селекционной работы в регионе.

Методические указания. Целесообразна такая последовательность занятий.

Сначала студенты изучают методы подготовки и обеззараживания инструмента, посуды и материалов, используемых для искусственного осеменения, а на нескольких последующих занятиях - методы получения и оценки качества спермы производителей различных видов животных. На первом из таких занятий они рассматривают устройство искусственных вагин, способы их подготовки и обеззараживания, знакомятся с правилами обращения с производителями и получают сперму от быка; после получения определяют внешние свойства эякулята. На следующих занятиях преподаватель знакомит студентов с получением спермы от производителей других видов животных и методами оценки качества ее. Если на кафедре содержатся баран или козел, то получают от них сперму и осваивают обязательные методы оценки качества. При отсутствии производителей мелкого рогатого скота, снова получают сперму от быка. Для демонстрации получения спермы от жеребца можно использовать производителя учебного хозяйства или другого сельхозпредприятия (конноспортивной школы). Такое занятие легче спланировать и провести, если кафедра содержит кобылу. Проводится занятие ранней весной (март-апрель), когда у небеременных животных начинается регулярная половая цикличность и первая половая охота длится дольше обычного. После получения спермы от жеребца студенты применяют освоенные обязательные методы и знакомятся с дополнительными методами оценки качества спермы. Методы оценки можно осваивать последовательно на всех занятиях, на которых получают сперму от производителей, или спланировать отдельные занятия. При получении спермы от жеребца студентов следует познакомить и с методами диагностики половой охоты, а также техникой осеменения кобыл.

Освоив методы получения и оценки качества спермы студенты затем изучают влияние на сперматозоидов физических и химических факторов; знакомятся с правилами приготовления синтетических сред для разбавления спермы, технологией разбавления, замораживания и хранения спермы при комнатной температуре, при 0-4°C и в жидком азоте; осваивают методы оценки качества сохраняемой спермы. Желательно на этих занятиях использовать сперму быка, а при возможности - и других видов животных.

Получение спермы от хряка, оценку качества ее, разбавление и хранение можно изучить одновременно с освоением методов осеменения свиноматок. Если содержание хряка в ветеринарной клинике технологически затруднено, то кафедра должна иметь свой филиал на близлежащем свиноводческом комплексе, где имеется пункт (станция) искусственного осеменения. Там организуется и проводится такое занятие. Студенты знакомятся с размещением и устройством пункта осеменения свиней, содержанием хряков-производителей, наблюдают за подготовкой их для получения спермы и процессом получения, оценкой качества спермы, разбавлением и хранением. Затем знакомятся с организацией и технологией выявления самок в охоте, осваивают методы осеменения.

После цикла таких лабораторно-практических занятий целесообразно посещение государственного предприятия по племенной работе и искусственному осеменению (ГПП). В ГПП студентов знакомят с размещением на его территории объектов различного назначения, лабораторно-технологическим корпусом, помещениями для содержания производителей. Студенты наблюдают за всеми технологическими процессами: подготовкой быков для получения спермы, технологией получения ее, оценкой качества и разбавлением спермы, охлаждением и замораживанием в гранулах и соломинах, оценкой качества оттаянной спермы; знакомятся с требованиями к сохраняемой сперме и условиями ее хранения, правилами заказа и отпуска потребителям. В бактериологической лаборатории студенты могут познакомиться с санитарной оценкой технологических процессов и получаемой продукции (спермы). В заключение, специалисты ГПП рассказы-

вают об основных производственных и экономических показателях племпредприятия и об организации племенной работы в зоне его деятельности.

Изучение технологии искусственного осеменения коров и организации его на фермах проводится на нескольких занятиях. Сначала в клинике кафедры преподаватель знакомит студентов со способами осеменения коров и телок, инструментом и правилами использования и утилизации его, подготовкой спермы для осеменения и оценкой качества, техникой безопасности при работе с животными. На последующих занятиях в учебном пункте, на фермах или комплексах студенты последовательно осваивают способы осеменения: ректо-цервикальный, визо-цервикальный и mano-цервикальный. На заключительном занятии студенты осматривают пункт искусственного осеменения коров и телок, знакомятся с организацией работы по воспроизводству животных в хозяйстве, учетом результатов осеменения, отчетностью.

В регионах с развитым овцеводством на пункте искусственного осеменения овец студенты знакомятся с оборудованием пункта и организацией его работы, содержанием баранов-производителей, подготовкой их для получения спермы, технологией получения, оценкой качества, разбавлением и хранением спермы, использованием замороженной спермы; наблюдают за организацией выявления охоты с помощью баранов-пробников, осваивают способы осеменения самок.

При наличии в регионе пункта искусственного осеменения кобыл при посещении его студенты осматривают помещения пункта, наблюдают за процессом получения спермы, диагностикой половой охоты у кобыл с помощью жеребца-пробника и осеменением кобыл.

ПОДГОТОВКА И ОБЕЗЗАРАЖИВАНИЕ ИНСТРУМЕНТОВ, ПОСУДЫ И МАТЕРИАЛОВ

Подготовка инструментов и посуды

Искусственное осеменение - это ряд организационных мероприятий и технологических процессов. Для осуществления их на государственных предприятиях и пунктах искусственного осеменения необходимы специальное оборудование, материалы, растворы, инструмент. Перед использованием они должны быть соответствующим образом подготовлены: быть чистыми, сухими и стерильными. Это необходимо для предотвращения повреждений или гибели сперматозоидов при контакте спермы с ними. Подготовка проводится в специально оборудованных помещениях.

Предприятия по ИО имеют отдельные комнаты для мытья и стерилизации инструмента, приборов и посуды, которые используются при получении, обработке и хранении спермы. Стены в этих комнатах облицованы глазурованной керамической плиткой, полы выстланы метлахской плиткой. В моечной комнате должен быть водопровод (холодная и горячая вода) с трапами для стока воды. При отсутствии магистрального водопровода в ней устанавливают газовую колонку или электронагреватель для подогревания воды. В этой комнате необходимо иметь ванну для мытья искусственных вагин, столы для использованной и подготовленной посуды, шкафы стеклянные для запасных искусственных вагин, спермоприемников и другого инструмента, а также шкаф для спецодежды. В ней размещают также и стиральную машину для стирки халатов, фартуков, полотенец и т.д.

В стерилизационной комнате устанавливаются сушильные шкафы, автоклавы, стерилизаторы, газовая или электрическая плита, дистилляторы воды, термостат для подготовленных вагин.

Для обеззараживания воздуха и предметов в стерилизационной и во всех помещениях лаборатории, в которых ведется работа со спермой, а также в манеже устанавливаются бактерицидные лампы - источники ультрафиолетовых лучей.

Использованная или новая посуда, инструмент и материалы должны быть соответствующим образом вымыты и обеззаражены. Новую стеклянную посуду моют теплым раствором соды или специальным моющим средством (типа "Чистоль"), удаляя наклеенные этикетки, жировые пятна и другие механические загрязнения. Моют с помощью ерша, поролона или куска ваты или марли, накрученных на деревянную палочку. После мытья посуду выдерживают в течение суток или более в растворе соляной кислоты (одна столовая ложка дымящейся кислоты на 3 л дистиллированной воды); посуда должна быть полностью погружена в раствор кислоты. После этого посуду тщательно моют проточной водой и затем ополаскивают несколько раз дистиллированной водой и высушивают на специальной доске с колышками. Посуда считается хорошо подготовленной, если на ее наружной и внутренней поверхности после сушки не остается пятен.

Использованную стеклянную посуду моют также в содовом растворе или теплой водой, тщательно ополаскивают проточной водой и затем несколько раз дистиллированной. При сильном загрязнении посуды синтетическими средами для разбавления спермы, которые содержат желток или молоко, ее погружают в хромовую смесь на 24 часа (иногда достаточно обработать смесью внутреннюю поверхность в течении нескольких минут) и многократно промывают проточной водопроводной водой, затем споласкивают дистиллированной водой и высушивают.

Новые пипетки и стеклянные трубки моют проточной водой и помещают на сутки в раствор соляной кислоты. Использованные пипетки достаточно вымыть водой и только сильно загрязненные моют хромовой смесью. Кислоту или хромовую смесь наливают в высокий цилиндр и в него помещают пипетки. Жидкость постепенно заполняет просвет их. После выдержки пипетки тщательно промывают проточной водой, а затем дистиллированной. Во время мытья следят, чтобы вода полностью заполняла просвет пипетки. Удобно пользоваться специальными цилиндрами с сифоном (пипеткой-камерами) или же дистиллированную воду помещать в бутылку с патрубком внизу, к которому присоединяют эластичную (резиновую или из полимерного материала) трубку с зажимом. После промывания пипеток проточной водой их поочередно присоединяют к трубке и промывают дистиллированной водой.

Новые изделия из резины (цилиндры и камеры искусственных вагин, катетеры для осеменения кобыл, трубки и пробки) моют в теплом 2-3%-ном растворе соды, затем тщательно ополаскивают проточной водой и высушивают.

Загрязненные цилиндры мерные и мензурки, которые используются для отмеривания жидкостей, моют теплой проточной водой и ополаскивают несколько раз дистиллированной водой.

Термоса для хранения спермы - сосуды Дьюара два раза в год подвергают мойке и дезинфекции. После освобождения их от жидкого азота и выравнивания температуры внутренних стенок с температурой воздуха (отопления) их моют 2%-ным раствором натрия гидрокарбоната, затем ополаскивают теплой водой. Остатки воды удаляют марлевыми салфетками.

Подготовленную чистую высушенную посуду перед использованием стерилизуют сухим жаром или другим общепринятым способом.

Приготовление растворов, марлевых салфеток, ватных тампонов, фильтров

Цель занятий: Приобрести навыки приготовления растворов и материалов, необходимых для работы по искусственному осеменению и трансплантации зародышей.

Объекты исследований, материалы и оборудование: натрия хлорид (NaCl), калия хлорид (KCl), натрия гидрокарбонат (Na_2HCO_3), натрий лимоннокислый трехзамещенный пятиводный ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), натрий лимоннокислый трехзамещенный двухводный ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$); натрий фосфорнокислый двузамещенный 12-водный ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$), высушенный до постоянной массы; калий фосфорнокислый однозамещенный (KH_2PO_4); кальций хлористый безводный, высушенный до постоянной массы (CaCl_2); магний хлористый 6-водный, высушенный до постоянной массы ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$); спирт-ректификат, фурацилин, калий двуххромовокислый, серная кислота, дистиллированная вода; стеклянная посуда (флаконы емкостью 100 мл, мерные цилиндры на 100, 250 и 500 мл, мерные колбы на 250, 500 и 1000 мл, колбы стеклянные на 50, 100, 250, 500 и 1000 мл); тампонницы с притертыми крышками, баночки на 100 мл с притертыми пробками, стеклянные воронки, стеклянные палочки; марля, гигроскопическая вата, бумага фильтровальная и пергаментная; ножницы прямые; весы аналитические или лабораторные, весы аптечные с разновесом, спиртометры; магнитная мешалка; автоклав, мембранные фильтры 0,45 мкм; газовая или электрическая плита.

Методические указания. Занятия проводят в лаборатории кафедры или учебном пункте искусственного осеменения. Сначала преподаватель объясняет студентам правила приготовления растворов, тампонов, марлевых салфеток. Затем поручает им самостоятельно приготовить один из растворов или салфетки, тампоны, фильтры. Целесообразно, чтобы студенты работали по парам. На каждом рабочем столе устанавливают весы, размещают соли и посуду, материалы и инструмент, необходимые для выполнения задания. Если в лаборатории установлены одни или двое весов, то студенты по очереди отвешивают соли, а затем на свое столе продолжают работу. Стерилизацию проводят в стерилизационной или на месте, если имеется в лаборатории соответствующее оборудование для стерилизации. После завершения занятия (2 часа) студенты показывают преподавателю приготовленный раствор или материал. Преподаватель уточняет у них правила приготовления, назначение, оценивает их действия.

Приготовление физиологического раствора. Нужно количество дистиллированной (очищенной) воды отмеривают цилиндром и переливают в коническую колбу. На весах отвешивают химически чистый натрий хлорид из расчета 0,9 г на 100 мл воды и помещают в колбу с водой. Если натрия хлорид расфасован в таблетках по 0,9 г, то на каждые 100 мл воды берут одну таблетку. Колбу закрывают бумагой пергаментной, помешивают до полного растворения навески и подогревают до кипения. Вместо дистиллированной воды можно использовать воду очищенную, приготовленную путем двукратного кипячения и фильтрования питьевой воды. Готовят раствор ежедневно.

Применяют физиологический раствор для промывания внутренней поверхности инструмента для осеменения, обеззараженного 70%-ным спиртом (стеклянные шприцы-катетеры и микро шприцы), резинового катетера для осеменения кобыл после стерилизации кипячением, увлажнения влажного зеркала или стеклянного расширителя, а также при оценке качества спермы.

Приготовление 70%-ного спирта. Для приготовления 100 мл 70%-ного спирта в мерный цилиндр наливают дистиллированной воды 73 мл и добавляют до метки (27 мл) 96%-ного спирта этилового (спирта-ректификата). Расчет для приготовления спирта проводят по формуле:

$$\begin{array}{rcl} 96\% & - & 100 \\ 70\% & - & x \end{array} \qquad x = \frac{70 \cdot 100}{96} = 72,8$$

Крепость приготовленного спирта контролируют спиртометром (рис. 14). Для этого размешивают стеклянной палочкой спирт с водой и медленно опускают в цилиндр спиртометр. После стабилизации положения прибора по шкале его определяют крепость спирта. Хранят спирт в баночке с притертой пробкой. Используют для обеззараживания внутренней поверхности стеклянного инструмента (шприцы-катетеры, микро шприцы), а также трубок из полимерных материалов, используемых при извлечении зародышей. После обеззараживания остатки спирта удаляют тщательным промыванием инструмента 0,95-ным раствором NaCl или средой Дюльбекко.

Приготовление 2,9%-ного раствора натрия цитрата. На аналитических или других точных весах отвешивают 29 г натрия цитрата ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ХЧ или ЧДА. Навеску вносят в мерную колбу на 1 л и добавляют приблизительно 500 мл дистиллированной воды. Помешиванием раствора добиваются растворения кристаллов натрия цитрата. Затем добавляют необходимое количество воды, постоянно помешивая с помощью магнитной мешалки. Приготовленный раствор (буфер) разливают во флаконы или колбы для хранения и стерилизуют автоклавированием. Можно стерилизовать раствор вакуумной фильтрацией через мембранный фильтр 0,45 мкм в стерильную химическую колбу. Допускается стерилизация в кипящей водяной бане в течение 10 мин. После стерилизации раствор должен иметь осмотическое давление 285-300 милли осмомолей (mOsm) и pH 6,8-6,9. Хранят в прохладном месте или бытовом холодильнике до момента использования (одна-две недели). Применяют раствор для оттаивания спермы, замороженной в гранулах, при оценке качества свежеполученной и сохраняемой спермы и в качестве компонента желточно-цитратной среды для разбавления спермы быка.

Приготовление раствора фурацилина. Готовят 0,02%-ный раствор фурацилина на физрастворе. Дистиллированную (очищенную) воду подогревают до кипения, затем помещают навеску натрия хлорида (на 100 мл воды 0,9 г соли) и фурацилина из расчета 0,2 г на 1 л (20 мг на каждые 100 мл).

Тщательно размешивают и переливают в стерильную бутылку из темного стекла. Хранят в течение двух-трех дней в затемненном месте.

Применяют раствор для обработки искусственных вагин после использования, подмывания препуция у производителей перед получением спермы и наружных половых органов у коров и свиней перед осеменением.

Приготовление фосфатно-солевого буфера (среды Дюльбекко). ФСБ готовят путем смешивания трех различных стерильных растворов.

Раствор ФСБ-А

В мерную колбу на 2 л наливают 1,5 л бидистиллированной воды и помещают в нее навески: натрия хлорида 20 г, калия хлорида 0,5 г, калия фосфорнокислого однозамещенного 0,5 г и натрия фосфорнокислого двузамещенного 12-водного, высушенного до постоянной массы - 2,88 г. Помешиванием раствора добиваются растворения внесенных солей. Затем добавляют воды до метки и тщательно перемешивают с помощью магнитной мешалки. Буфер разливают по 400 мл в бутылки объемом 500 мл. Для стерилизации автоклавируют при давлении 1 атм. в течение 15 минут. Хранят при комнатной температуре.

Раствор ФСБ-Б

В мерную колбу на 250 мл вносят навеску кальция хлорида безводного, высушенного до постоянной массы - 0,25 г и добавляют до метки бидистиллированной воды при постоянном помешивании. Приготовленный раствор разливают по 50 мл во флаконы или колбы соответствующей емкости, закрывают пергаментной бумагой и стерилизуют автоклавированием при давлении 1 атм. в течение 15 минут. Хранят при комнатной температуре.

Раствор ФСБ-В

В мерную колбу на 250 мл вносят навеску магния хлорида 6-водного, высушенный до постоянной массы - 0,25 г и добавляют до метки бидистиллированной воды при постоянном помешивании. Приготовленный раствор разливают по 50 мл во флаконы или колбы соответствующей емкости, закрывают пергаментной бумагой и стерилизуют автоклавированием при давлении 1 атм. в течение 15 минут. Хранят при комнатной температуре.

Для получения полного ФСБ смешивают 400 мл ФСБ-А с 50 мл ФСБ-Б и 50 мл ФСБ-В. В таком виде буфер можно хранить при 4°C до 2-х недель.

Используют фосфатно-солевой буфер в качестве среды для промывания матки при извлечении зародышей у коров-доноров.

Приготовление 1%-ного раствора гидрокарбоната натрия. В коническую колбу на 500 мл наливают дистиллированную воду и стерилизуют в течение 0,5-1 мин. кипячением. Охлаждают проточной водой или дают остыть при комнатной температуре до 40-45°C. Затем отвешивают необходимое количество гидрокарбоната натрия из расчета 1 г на 100 мл воды. Навеску помещают в стерильную стеклянную колбу. Отмеривают стерильным цилиндром (мензуркой) необходимое количество простерилизованной дис-

тиллированной воды и переливают ее в колбу с навеской. Колбу закрывают стерильной пергаментной бумагой. Помешиванием добиваются растворения натрия гидрокарбоната. Нельзя нагревать раствор свыше 60°C, так как натрия гидрокарбонат разлагается и становится токсичным для сперматозоидов.

Готовят раствор ежедневно. Используют при оценке качества спермы, для увлажнения влагалищного зеркала и промывания инструмента, обработанного 70%-ным спиртом.

Приготовление хромовой смеси. В коническую колбу отмеривают 1 л дистиллированной воды и растворяют в ней 60 г калия двуххромовокислого, а затем осторожно добавляют малыми порциями 100 мл концентрированной серной кислоты. Приготовленной хромовой смесью обрабатывают сильно загрязненную стеклянную посуду. После тщательно промывают проточной водой, споласкивают дистиллированной водой и высушивают.

Приготовление раствора перекиси водорода. Раствор перекиси водорода с моющими средствами используют для мытья полов, стен и мебели в боксах для работы с зародышами. Можно использовать этот раствор и при уборке манежа и чучел для получения спермы от производителей, а также помещения пункта искусственного осеменения.

Для приготовления 10 л раствора в стеклянную бутылку, в кастрюлю или ведро наливают 8750 мл питьевой воды, добавляют 1200 мл перигидроли и 50 г моющего средства типа "Прогресс", "Сульфанол" или др. Раствор готовят непосредственно перед употреблением. Норма расхода дезинфицирующего раствора 70-100 мл на 1 м².

Приготовление фильтров. Фильтры бумажные используются для приготовления очищенной воды, фильтрования раствора натрия цитрата перед стерилизацией (а при необходимости - и растворов А, Б и В, используемых для приготовления ФСБ), а также красителей, применяемых при оценке качества спермы. При наличии стандартных стерильных фильтров используют их.

В лаборатории фильтры можно приготовить из фильтровальной бумаги. Для этого ножницами разрезают бумагу на квадратные листы соответствующего воронке размера. Складывают лист по диагонали и разглаживают основание образовавшегося треугольника. Затем его еще раз складывают пополам и разглаживают сторону уже четырехслойного малого треугольника. Раздвигают один слой бумаги и вкладывают фильтр в стеклянную воронку так, чтобы после обрезания ножницами выступающих краев бумаги он полностью помещался в воронку, а края его на несколько мм были ниже края ее.

Воронку с фильтром помещают в горловину колбы и осторожно порциями выливают на фильтр раствор или прокипяченную воду. При этом не следует переливать жидкость выше края фильтра. Фильтрование позволяет

удалить механические примеси и обеспечивает чистоту и прозрачность раствора.

Приготовление ватных тампонов. Пласты гигроскопической ваты расслаивают и отделяют тонкие кусочки. Края кусочков заворачивают так, чтобы они приобрели форму дисков диаметром 4-6 см. По мере приготовления тампоны складывают стопочкой и помещают в банку-тампонницу с притертой крышкой. Надавливая пинцетом в различных местах хорошо пропитывают 96%-ным спиртом и закрывают банку. Можно тампоны сначала положить в чашку Петри, пропитать спиртом, отжать руками и затем пинцетом разделить их и поместить в тампонницу.

Применяют спиртовые тампоны для дезинфекции искусственных вагин, стеклянных палочек и инструментов для осеменения самок, пинцетов и корнцангов, ножниц, термометров, подставок для инструментов, поверхности стола и рук, др.

Сухие ватные тампоны помещают в бумажные пакеты или в стеклянные банки, которые закрывают бумагой, и стерилизуют в сушильном шкафу при температуре 130°C в течение 1,5 ч. Такие тампоны необходимы для смазывания вазелином стилета катетера для извлечения зародышей, удаления с приборов и инструментов остатков вазелина, слизи, спирта, физиологического раствора и др.

Приготовление марлевых салфеток. Марлю складывают в несколько слоев и разрезают прямыми ножницами так, чтобы получить куски величиной от 20x20 до 40x40 см. Проглаживают утюгом и складывают вчетверо. Затем упаковывают в стерильную пергаментную бумагу. Салфетки используют для протирания оптики, предметных и покровных стекол, удаления капель воды с приборов и инструментов. Для протирания половых губ самки перед осеменением после подмывания можно использовать одноразовые стерильные бумажные салфетки. Стерилизуют их в сушильном шкафу при температуре 130°C в течение 1 часа.

Подготовка и обеззараживание посуды и инструментов

Цель занятий: Изучить методы стерилизации посуды и инструментов.

Объекты исследований, материалы и оборудование: стеклянная посуда (цилиндры мерные и мензурки емкостью 100, 200, 250 и 500 мл; мерные колбы емкостью 200, 250, 500 и 1000 мл; флаконы емкостью 100 мл; колбы для растворов емкостью от 50 до 1000 мл); баночки на 100 мл с притертыми пробками; стеклянные и одноразовые полиэтиленовые спермоприемники; инструмент для осеменения самок сельскохозяйственных животных; тазы эмалированные, кастрюля эмалированная на 3-5 л, ерши и щетки для рук; Раствор натрия гидрокарбоната 1%-ный и 2-3%-ный, раствор хромовой смеси, соляная кислота; резиновые или поролоновые губки для рук; полотенца, вата, марлевые салфетки, бумага фильтровальная, фильтры; перчатки резиновые и полиэтиленовые одноразовые; анатомические и хирургические пинцеты, анатомические ножи, скальпели, ножницы прямые и Купера; предметные и покровные стекла, чашки Петри, часовые стекла, стеклянные палочки; шприцы и иглы, кюветы; автоклав, сушильный шкаф, простой или электрический стерилизатор, бактерицидная лампа; газовая или электрическая плита, примус; спиртовые тампоны, дистиллированная вода; доска с колышками.

Методические указания.

Занятия проводят в лаборатории кафедры, акушерской (ветеринарной) клинике или учебном пункте. Сначала преподаватель объясняет студентам порядок подготовки инструмента и посуды, предметных и покровных стекол и выдает соответствующие задания для каждого студента (или пары). Далее студенты

самостоятельно выполняют эту работу. Затем преподаватель знакомит их с методами стерилизации, а также назначением, устройством и правилами работы с автоклавом, стерилизаторами, сушильным шкафом, бактерицидной лампой. При этом обращает внимание на соблюдение техники безопасности при работе с газовыми и электрическими приборами. После этого студенты стерилизуют подготовленные ими инструмент, посуду, материалы и после выполнения задания отчитываются перед преподавателем. Преподаватель в конце занятия (2 часа) уточняет прочность усвоенных студентами знаний приготовления растворов, обработки и подготовки посуды и материалов, правил стерилизации.

Вопросы:

1. Как моют новую и использованную или загрязненную стеклянную посуду, стеклянный инструмент, новые и использованные резиновые изделия?
2. Как моют пипетки и микропипетки, предметные стекла, полиэтиленовые наконечники для дозаторов пипеточных? Какими способами их можно стерилизовать?
3. Как моют и дезинфицируют сосуды Дьюара?
4. Как приготовить 2,9%-ный раствор натрия цитрата, физиологический и другие изотонические растворы, 70%-ный спирт, спиртовые тампоны? Для каких целей их применяют?
5. Какими способами стерилизуют стеклянную посуду и инструмент, металлический инструмент, изделия из резины, пластмассы и полимерных материалов, марлю и изделия из ткани?

Стерилизация кипячением. Кипячением обеззараживают: металлический инструмент; искусственные вагины и влагалищные зеркала; резиновые трубки, пробки и катетеры для осеменения кобыл; иглы и шприцы для многократного пользования; стеклянные банки и склянки, расширители влагалища и шприцы-катетеры. Стерилизация проводится в хирургических электрических, а также простых стерилизаторах и специальных стерилизаторах для искусственных вагин.

Обычный стерилизатор представляет собой продолговатую металлическую коробку различной величины с крышкой (рис. 15). Внутрь его вставляется сетка с ручками (выступами), за которые ее удерживают крючками при погружении или извлечении из кипящей воды. Также устроен и электрический стерилизатор, однако он имеет автономный электронагреватель. Большой хирургический стерилизатор размещается на специальной подставке и снабжен ножным рычагом для поднятия крышки и сетки, а также устройством для включения электронагревателя и переключения мощности. Для нагревания воды в обычном стерилизаторе используют любой источник тепла: газовую или электрическую плиту, примус и т.д.

Металлический инструмент (ножницы, пинцеты и корнцанги, шприцы для осеменения ШО-3 и ШО-4 и трансплантации зародышей, расширитель шейки матки, подставки для инструментов и др.) и влагалищные зеркала кипятят в дистиллированной или очищенной воде в течение 15-20 минут. Чтобы они не покрывались ржавчиной их нужно опускать сразу в кипящую воду, а режущий и колющий инструмент (скальпели, ножницы, иглы и пр.), кроме того, обертывают марлей для предохранения от затупления. Добавление к воде 1-2% соды усиливает стерилизующий эффект и также предохраняет инструмент от ржавчины.

Шприцы для инъекций, различного типа переходники для соединения полимерных трубок, шприцы-катетеры и другие стеклянные предметы (банки, склянки и мелкая посуда) кипятят 30 минут в дистиллированной или

очищенной воде без добавления щелочей. Их кладут в воду до начала подогревания, чтобы не лопались, причем шприцы разбирают и обертывают марлей. В шприцах-катетерах поршни индивидуально притерты к цилиндру и менять их нельзя. Поэтому при обертывании марлей к каждому шприцу прикрепляют и поршень. После этого их помещают на сетку стерилизатора, прикрытую марлей, и заливают теплой дистиллированной или очищенной водой. Стерилизатор накрывают крышкой, нагревают воду до кипения и кипятят 15-20 минут.

После кипячения инструмент и посуду вместе с сеткой извлекают из воды, кладут на крышку стерилизатора и высушивают; с горячей поверхности вода быстро испаряется. Инструмент, непосредственно контактирующий со спермой, необходимо сразу же встряхнуть, чтобы удалить из него воду, а оставшиеся капли удаляют обеззараженными марлевыми салфетками или сухими стерильными ватными тампонами. Из шприцев-катетеров воду удаляют вставленными поршнями, завертывают их в стерильную пергаментную бумагу, трехслойные марлевые салфетки или фольгу и хранят в шкафу. Собирая шприцы (для инъекций и шприцы-катетеры), поршень вставляют в цилиндр лишь после остывания. Пользуются при этом стерильным пинцетом.

Резиновые пробки помещают в чистые марлевые мешочки и кипятят в течение 20-25 минут отдельно от металлического инструмента. Затем мешочки с пробками извлекают из воды и сушат в сушильном шкафу при температуре не выше 60°C.

На искусственные вагины перед кипячением (а также автоклавированием) с обоих концов закрепляют чехлы (колпаки) из холста или плотной белой ткани. После этого вагину помещают в специальный или большой хирургический стерилизатор и кипятят в течение 20 минут. После кипячения быстро извлекают из воды и некоторое время удерживают в вертикальном положении, чтобы полностью удалить воду, и кладут на подставку. Чехлы снимают непосредственно перед подготовкой к получению спермы. Если обнаружены на стенке камеры остатки воды, ее удаляют спиртовыми тампонами.

Стерилизация сухим жаром. Этим способом наиболее удобно стерилизовать стеклянную посуду, приборы и инструмент. Стерилизация проводится в электрических сушильных шкафах различных типов. Эксплуатация их осуществляется в соответствии с инструкцией по использованию. В рабочей камере сушильного шкафа температура может достигать 250-350°C. Контролируется температура ртутными термометрами, а в современных моделях приборов - электронными цифровыми термометрами (рис. 15).

Перед стерилизацией стеклянные спермоприемники и разобранные шприцы-катетеры, мерные и пастеровские пипетки, часовые стекла и чашки Петри, а также мелкую посуду заворачивают в фильтровальную (пергаментную) бумагу или пищевую алюминиевую фольгу. При этом с банок снимают

ют притертые крышки. Мензурки и мерные цилиндры большого объема закрывают колпаками из пергаментной бумаги или пищевой алюминиевой фольги, а колбы - ватно-марлевыми пробками. Подготовленные предметы размещают на полках сушильного шкафа, нагревают его до температуры 160-180°C и выдерживают в течение 45-60 минут. Затем шкаф выключают и после охлаждения по мере необходимости берут инструмент и посуду для использования.

Стерилизация в автоклавах. Надежным способом стерилизации искусственных вагин, белья и спецодежды (полотенца, халаты, шапочки и косынки, фартуки, марлевые салфетки, вата), растворов, лабораторной посуды и инструмента является стерилизация паром под давлением - автоклавирование. Этот метод основан на том, что при кипении воды в герметически замкнутом приборе (автоклаве) повышается давление и температура пара. При этом температура кипения воды и давление находятся в определенной зависимости: при давлении 1, 1.2, 1.4 и 1.6 атм. температура кипения воды соответственно равна 99.1°C, 104.2°C, 108.7°C и 112.7°C. Высокая температура губительно действует на вегетативные и споровые формы микроорганизмов.

Автоклав представляет собой двустенный котел с герметически закрывающейся массивной крышкой. Между стенками котла находится паровая камера, предназначенная для получения водяного пара определенной температуры и давления. В нее через воронку заливают воду. Уровень воды контролируют посредством водомерного стекла. Снаружи автоклав покрыт металлическим кожухом, который предохраняет паровую камеру от механических повреждений и защищает обслуживающий персонал от ожогов. Внутри паровой камеры (котла) находится стерилизационная камера, в которую помещают биксы (стерилизационные коробки, барабаны) с стерилизуемым материалом; в днище стерилизационной камеры имеется отверстие для выхода пара. Между паровой и стерилизационной камерой остается свободное пространство, куда поступает пар из парообразователя через патрубок с вентилем. В нижней части автоклава расположен выпускной кран, через который удаляется конденсационная вода, воздух и пар. Когда выпускной кран закрыт, пар поступает в замкнутое пространство и это приводит к повышению давления и температуры. Давление контролируют по показанию манометра. Шкала его градуирована в атмосферах.

В автоклавах котел, как и стерилизационная камера, расположен горизонтально или вертикально. Поэтому различают автоклавы горизонтальные и вертикальные (рис. 15). Выпускаются и переносные (лабораторные) мини-автоклавы.

Перед включением автоклава проверяют исправность манометра и кранов, целостность водомерного стекла. Автоклав заправляют в строгой последовательности: через воронку наливают воду до $\frac{2}{3}$ высоты водомерного стекла, помещают стерилизуемый материал, плотно завинчивают

крышку, открывают выпускной кран и включают нагревательное устройство. Доводят воду до кипения, после чего пар начинает переходить из паровой камеры в стерилизационную и затем выходит из нее через отверстие в днище, связанное с выпускным краном. Сначала выделяется пар, смешанный с воздухом. Как только пар становится сухим, выпускной кран закрывают и следят за давлением. После достижения необходимого уровня, ручку переключателя ставят в положение "стерилизация" и замечают время. Продолжительность стерилизации зависит от температуры и давления: при 0,5 атм. выдерживают 30 мин. По окончании стерилизации отключают нагреватель (ручка ставится в положение "0") и ожидают снижения давления до 0. Затем открывают выпускной кран и выпускают пар. После этого можно открывать крышку.

При автоклавировании искусственных вагин на концы их одевают чехлы или же их закрывают пергаментной бумагой, которую закрепляют резиновыми кольцами. Инструмент, спецодежду, марлевые салфетки, вату упаковывают в биксы. Растворы и лабораторную посуду можно размещать непосредственно в стерилизационной камере. Горловину колб закрывают пергаментной бумагой.

Обеззараживание спиртом. Шприцы-катетеры (микро шприцы) для осеменения коров и овец можно обеззараживать путем промывания внутренней поверхности 70%-ным спиртом с последующим тщательным (5-6 раз) промыванием физиологическим раствором, 1%-ным раствором натрия гидрокарбоната или 2,9%-ным раствором натрия цитрата. Катетеры для извлечения зародышей из латексной резины полностью погружают в 96%-ный или 70%-ный спирт, а затем промывают стерильной средой Дюльбекко.

Изделия из пластмассы и резины можно стерилизовать путем погружения их в 0,5%-ный раствор хлорамина на сутки. После этого их ополаскивают стерильной дистиллированной водой и физиологическим раствором или средой Дюльбекко.

Наружную поверхность стеклянного инструмента для осеменения самок, а также сухие стеклянные палочки, химические термометры, пластмассовые подставки, эбонитовые палочки для смазывания искусственных вагин вазелином, пинцеты, ножницы, скальпели и др. обеззараживают путем протирания тампонами, пропитанными 96%-ным спиртом. Отработанные спиртовые тампоны складывают в специальную баночку или тампонницу и используют затем для фламбирования инструментов.

Спиртом обеззараживают также отогретые вымытые сосуды Дьюара. Сухие внутренние стенки их протирают тампонами, пропитанными 96%-ным спиртом-ректификатом.

Стерилизация фламбированием (обжиганием). Этот способ применяется чаще в полевых условиях. Для стерилизации инструмент (влагалищные зеркала, ножницы, пинцеты, стеклянные палочки, подставки) проводят несколько раз над не коптящим пламенем горящего спиртового тампона,

спиртовки, паяльной лампы или газовой горелки. При этом стерилизуемые предметы постоянно поворачивают, медленно проводя через верхнюю часть языка пламени, где температура наиболее высокая, и обжигают (но не прокаливают) со всех сторон, чтобы была обеззаражена вся поверхность. Стеклянные предметы фламбируют осторожно: вначале обжигают над пламенем огня на расстоянии 15-20 см, а затем приближают к нему, равномерно обрабатывая со всех сторон.

Обеззараживание паром. Этот способ в практике искусственного осеменения используется крайне редко. Стерилизация проводится в аппарате Коха или при помощи парообразователя и только для обеззараживания внутренней поверхности стеклянных банок и колб, инструмента для искусственного осеменения свиней (вагины, спермоприемники, ампулы, зонды).

В парообразователь наливают на 3/4 воду, закрывают его крышкой и нагревают до кипения на электроплитке или газовой плите. Образующийся пар поступает в резиновую трубку, присоединенную к патрубку крышки. Струю пара, выходящего из трубки, направляют на обеззараживаемый инструмент. По мере выкипания воды, ее подливают в колбу через воронку, разжав зажим на резиновой трубке.

Продолжительность обеззараживания различных предметов (инструментов) неодинаково и зависит от их размеров, внешней температуры и силы струи пара. Обеззараживание проводят обычно в течение 3-5 минут с того момента, когда пар начинает выходить из обеззараживаемого прибора (пар вначале конденсируется на холодных стенках инструментов). Обработанные паром инструменты нужно промывать стерильным 1%-ным раствором бикарбоната натрия или 2,9%-ным раствором лимоннокислого натрия, чтобы удалить с них оставшиеся капельки воды, которые может неблагоприятно отразиться на качестве спермы.

Правила и техника подготовки и обеззараживания отдельных инструментов, используемых для получения и разбавления спермы а также для осеменения самок, подробнее будут описаны в соответствующих разделах.

Стерилизация вазелина. Белый или желтый вазелин используют для смазывания внутренней поверхности камер искусственных вагин, стилетов катетеров для извлечения зародышей, наружной поверхности ветвей влагалищного зеркала, рук или перчаток при вагинальном исследовании.

В стеклянную банку с притертой пробкой накладывают не слишком полно вазелин. Плотнo не закрывают пробкой, чтобы во время стерилизации она не прикипела к горловине или не лопнула банка; обычно пробку помещают в наклонном положении. На дно электрической водяной бани или кастрюли кладут сложенную в несколько слоев марлю (полотно, вату) и ставят на нее банку с вазелином. В баню (кастрюлю) наливают холодную или теплую воду так, чтобы уровень ее был несколько выше уровня вазелина в банке. Электрическую баню включают в сеть, а кастрюлю ставят на электриче-

скую или газовую плиту. После начала кипения воды и расплавления вазелина, обеззараживание его продолжают 20-30 минут. После этого банку извлекают из водяной бани и дают остыть, после чего плотно закрывают пробкой.

Если после расплавления вазелина на дне банки появляется осадок, верхний (чистый) слой вазелина переливают в другую банку и стерилизуют заново. Стерилизация вазелина должна проводиться ежедневно.

ПОЛУЧЕНИЕ СПЕРМЫ ОТ ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ

Цель занятий: познакомить студентов с методами получения спермы от самцов и правилами обращения с ними.

Объекты исследований, материалы и оборудование: разобранные искусственные вагины быка, барана, хряка, жеребца; подставки для спермоприемников и искусственных вагин; поролоновая (капроновая) протирка для вагин, кружка Эсмарха; дистиллированная вода, 2-3%-ный раствор натрия гидрокарбоната, 0,02%-ный раствор фурацилина, физиологический раствор, 70%-ный спирт этиловый; тампоны, пропитанные 96%-ным спиртом-ректификатом, марлевые салфетки, вата; стерильный вазелин; компрессор или шары Ричардсона, термометры, стеклянные воронки, пинцеты, корнцанг; бык, баран (козел), хряк, жеребец, чучело свиньи, животное-манекен для получения спермы от быка, овца (коза) и кобыла в охоте; станки для получения спермы от быка и барана, палка-водила для быка; стеклянная посуда (цилиндры мерные и мензурки емкостью 100, 200, 500 мл; тазы эмалированные, кастрюля эмалированная на 3-5 л, ерши и щетки для рук; резиновые или поролоновые губки для рук; полотенца, бумага фильтровальная, пищевая алюминиевая фольга; перчатки резиновые и полиэтиленовые одноразовые; электроэякуляторы для быка и барана; автоклав, сушильный шкаф, термостат для вагин, простой и электрический стерилизатор, бактерицидная лампа; газовая или электрическая плита.

Методические указания. Занятия проводят в лаборатории и ветеринарной клинике кафедры, в учебном или производственных пунктах искусственного осеменения свиней, овец и кобыл. На первом занятии студентов распределяют на группы по несколько человек, обеспечивают их деталями искусственных вагин, необходимыми материалами, растворами и оборудованием для подготовки вагин. Преподаватель демонстрирует студентам устройство искусственной вагины, объясняет правила сборки и подготовки. Студенты учатся самостоятельно собирать вагины для производителей сельскохозяйственных животных и готовят два-три прибора для получения спермы от быка. После этого преподаватель объясняет студентам правила обращения с быком, методы подготовки и технику получения спермы. Подготовив быка и манекена, один или два студента под контролем преподавателя получают сперму (1-2 эякулята) и определяют ее внешние свойства. На последующих занятиях сперму получают от барана, жеребца, хряка.

В конце каждого занятия (3-4 занятия по 2-4 часа) преподаватель оценивает действия студентов при подготовке искусственной вагины и получении спермы от самцов, обращает внимание на допущенные погрешности, задает несколько вопросов:

1. *Каковы принципы устройства искусственной вагины и какие условия необходимо создать в ней, чтобы обеспечить рефлекс эякуляции у самца?*
2. *Правила и последовательность подготовки искусственной вагины для получения спермы?*
3. *Какие животные (фантомы) используются при получении спермы от быков?*
4. *В чем заключается подготовка быков-производителей для получения спермы? Каковы основные мероприятия по стимуляции у них половой функции?*
5. *В каких случаях применяют методы массажа и электроэякуляции для получения спермы от быков?*
6. *Правила обращения со спермой после получения? Как проводится предварительная оценка спермы?*
7. *Какие методы применяют для получения спермы от хряков? Особенности эякуляции у них?*
8. *Какой основной метод получения спермы у жеребца?*
9. *Каких животных используют в качестве манекена при получении спермы от жеребца, хряка, барана?*
10. *Оптимальный режим получения спермы от быка, хряка, барана и жеребца?*
11. *Какие факторы влияют на объем и качество получаемой от самцов спермы?*

Устройство, подготовка и использование искусственной вагины

Искусственная вагина (влагалище) - прибор для получения спермы от самцов; состоит из следующих частей (рис. 16-19).

Цилиндра или корпуса, изготовляемого из толстой вулканизированной резины (для быка и хряка), эбонита (для барана), оцинкованного железа или алюминия (для жеребца, хряка).

Тонкостенной резиновой камеры, поверхность которой с одной стороны гладкая, с другой - несколько шероховатая; диаметр камеры для быка и хряка равен диаметру корпуса, для барана меньше диаметра корпуса, а для жеребца несколько шире диаметра узкой части корпуса (табл. 2).

Резиновых колец, которые используются для крепления камеры на корпусе искусственной вагины для быка, хряка и жеребца; для вагины барана кольца не предусмотрены.

Краника эбонитового или полиэтиленового - его вставляют в отверстие патрубка на корпусе для регулирования давления при подаче воздуха. В вагине для быка и хряка краник вставляется непосредственно в отверстие патрубка, а в вагину барана посредством резиновой пробки с отверстием или резиновой трубки.

Спермоприемника - емкости, в которую попадает сперма после эякуляции производителя. Для искусственной вагины быка образца 1942 г. применяется двустенный стеклянный спермоприемник с крышкой (рис. 16); в современной укороченной модели спермоприемник полиэтиленовый одностенный. В вагине для барана спермоприемник одностенный или двустенный стеклянный, а для жеребца - резиновый в виде широкого стакана (рис. 18). В приборах для хряка используется специальный пластмассовый спермоприемник или стеклянная банка емкостью 500-1000 мл (рис. 19).

Резинового держателя спермоприемника, используемого только в искусственной вагине для быка образца 1942 г.; он служит для крепления стеклянного спермоприемника.

Вкладыша полиэтиленового - имеется только в вагине для хряка; вставляется в вагину со стороны спермоприемника и предотвращает полное смыкание стенок резиновой камеры.

Для смазывания внутренней поверхности резиновой камеры вазелином предназначена *эбонитовая палочка*, а для мытья вагин - поролоновая или капроновая *протирка*. Для современной модели прибора с полиэтиленовым спермоприемником предусмотрены ватно-марлевые (или из другого материала) термоизоляционные чехлы, которые позволяют выдерживать необходимую температуру (38°C) в процессе получения спермы в манеже в холодное время года.

В Европейской модели вагины для быка (Minitub) корпус длиной от 30 до 41 см. Камера из латексной резины, коричневатого цвета; поверхность гладкая или шероховатая; патрубков в корпусе металлический, вместо краника - металлическая завинчивающаяся пробка с отверстием для нагнетания

воздуха и устройством для герметизации. В качестве спермоприемника используется градуированная пробирка емкостью 15 мл (нередко двустенная); присоединяется спермоприемник при помощи направляющего резинового конуса. Спермоприемник и резиновый конус прикрываются утеплительным чехлом (рис. 17).

Искусственная вагина для барана (рис. 18) конструктивно подобна вагине для быка образца 1942 г. и отличается лишь размерами и устройством патрубка. Для фиксации в отверстии патрубка эбонитового краника на него необходимо одеть кусочек сложенной вдвое толстой резиновой трубки или же подобрать по размеру отверстия патрубка резиновую пробку. Отверстие в пробке для краника легко сделать при помощи специального прибора. Он состоит из набора заточенных трубок различного диаметра. В верхней (укрепленной) части трубок имеется отверстие для металлического стержня, посредством которого вращают трубку и вырезают отверстие в пробке.

Для хряка чаще применяют искусственную вагину, предназначенную для быка, но в зависимости от размера полового члена производителя ее укорачивают на 10-25 см. В моделях приборов для хряков, предложенных в лаборатории А.В. Квасницкого (Полтавский институт свиноводства), цилиндр выполнен из жести; обогрев электрический или водяной; спермоприемник пластмассовый (рис. 19). Водоналивная искусственная вагина состоит из двустенного жестяного цилиндра с отверстием для наливания воды и патрубком (трубкой), через который нагнетается воздух; резиновой камеры, которая вставляется внутрь жестяного цилиндра и заворачивается на концах выступающей внутренней части его; прозрачного пластмассового спермоприемника. Вагина с электрическим обогревом имеет также двустенный металлический цилиндр - обогреватель, заполняемый водой, которая нагревается вмонтированной электросвечой, и конусную одностенную трубку с патрубком для нагнетания воздуха. В эту трубку заправляется резиновая камера, после чего такая вагина вставляется в обогреватель. Температура регулируется контактным термометром.

На корпусе искусственной вагины для жеребца (рис. 18) имеется суженная часть (горловина), а также скоба для фиксирования рукой при получении спермы; на патрубок для подачи воды навинчивают пробку с резиновой прокладкой (возможна с клапаном для выхода воздуха), что обеспечивает герметичность пространства между камерой и цилиндром.

Таблица 2

Размеры цилиндров и камер искусственных вагин (см)

Производитель	Цилиндр		Камера	
	длина	диаметр	длина	диаметр
Бык: образца 1942 г.	50	8	70	6,2
современная	30	8	55-65	6,2
Европейская	30,35,41	8	65	6,8
Баран	20	4,8-5,5	30-40	3,3
Хряк	26-41	8	70	6,2

Жеребец	54	13	90	9,3
---------	----	----	----	-----

Правила подготовки и сборки искусственной вагины. Корпус искусственной вагины, камеру, фиксирующие резиновые кольца и держатель спермоприемника тщательно моют горячим 2-3%-ным раствором натрия гидрокарбоната, многократно ополаскивают чистой горячей водой и высушивают. Перед сборкой убеждаются в целостности корпуса вагины и резиновой камеры, в соответствии диаметров отверстия патрубка и краника для подачи воздуха и исправности краника. Если краник проворачивается туго, его слегка смазывают вазелином. Для обнаружения повреждений камеры ее растягивают двумя руками за концы и осматривают каждую сторону; в момент растяжения повреждения хорошо заметны. Неиспользованные новые резиновые камеры выворачивают гладкой поверхностью внутрь. Удобнее это сделать следующим образом: через всю камеру проводят корнцанг и захватывают противоположный конец, затем постепенно выворачивают ее.

Камеру вставляют в корпус, заворачивают концы ее и поочередно натягивают на концы цилиндра. Чтобы не было перекосов, после натягивания одного конца камеры вагину переворачивают вниз и приподнимают за свободный конец камеры, выравнивают ее и натягивают на цилиндр. При натяжении камеры сначала отвернутые края ее двумя руками натягивают на цилиндр, а затем ладонью руки выравнивают просвет. При правильном натяжении камеры диаметр внутреннего просвета искусственной вагины должен быть на всем протяжении одинаковый и не меть складок. Завернутые концы камеры должны быть примерно одинаковой величины; их закрепляют с каждой стороны резиновыми кольцами.

В просвет искусственной вагины для хряка со стороны спермоприемника (до присоединения его) рекомендуется вставить полиэтиленовый вкладыш. Он способствует свободному передвижению спермы в спермоприемник. В качестве спермоприемника используется полулитровая (литровая) банка. Ее присоединяют к вагине при помощи отрезка резиновой камеры; в верхней части отрезка делают небольшое отверстие для выхода воздуха во время эякуляции хряка.

В вагине для барана вследствие разницы в диаметрах резиновой камеры и цилиндра, натягивается камера с трудом. Но на цилиндре удерживается прочно и не требует дополнительной фиксации кольцами. При выполнении этой процедуры не следует растягивать камеру, чтобы не допустить образования воронкообразного расширения; камера должна загигаться внутрь под прямым углом.

Порядок подготовки искусственной вагины к работе. Подготовка искусственной вагины включает выполнение следующих последовательных работ.

Мытье искусственной вагины. В предприятиях по искусственному осеменению сразу после получения спермы вагину помещают в ванну с 0,02%-ным раствором фурацилина. Моют использованные вагины с помощью протирки 2-3%-ным раствором натрия гидрокарбоната. После этого их тщательно ополаскивают чистой горячей водой для удаления остатков соды, затем дистиллированной водой и высушивают или насухо вытирают полотенцем.

Стерилизация искусственной вагины проводится автоклавированием или кипячением. Перед стерилизацией на оба конца искусственной вагины надевают чехлы из белой ткани (при автоклавировании можно использовать и колпаки из пергаментной бумаги или алюминиевой фольги; укрепляют колпаки новым резиновыми кольцами). Автоклавирование искусственных вагин проводят при температуре 105°C и давлении 0,3-0,5 атм. в течение 15-20 минут. Европейскую модель вагины рекомендуется автоклавировать при давлении не более 0,02 атм. (*bar*) и температуре 100°C в специальных автоклавах-стерилизаторах типа Sterivar (фирмы "Minitub") с низким давлением (рис. 20). Кипячением искусственные вагины стерилизуют в дистиллированной воде не менее 20 минут.

Стерилизация 96%-ным спиртом-ректификатом применяется как дополнительный способ. Спиртовой тампон диаметром 5-6 см складывают пополам, затем еще раз и зажимают прямой угол образовавшегося четырехслойного треугольника корнцангом, вводят инструмент в середину искусственной вагины и тщательно протирают внутреннюю поверхность камеры по направлению к одному концу, затем поворачивают вагину и обрабатывают другую часть камеры.

Наполнение искусственной вагины водой. После стерилизации в межстенную полость вагины заливают воду. Температура воды перед заполнением зависит от типа и температуры прибора (табл. 3). Если прибор охлажденный, то вода должна иметь температуру 45-70°C, а к моменту получения спермы 43-45°C. После наполнения вагины водой отверстие патрубка закрывают краником и ее помещают в термостат и хранят при температуре 45-46°C.

Таблица 3

Количество воды и температура ее в вагине для различных производителей

Производитель	Тип прибора	Количество воды, мл	Температура воды (°C),
Бык	1942 г.	450-500	60-70
	Современная	200-300	60-65
Баран	1942 г.	150-180	50-55
	Хряк	Резиновая (ВИЖ)	300-400
Жеребец	Полтавский НИИ свиноводства	1000-1200	45-50
	Алюминиевая	1500-2000	50-60

Стерилизация спермоприемника. В приборах образца 1942 г. (для быка и барана) используются стеклянный двустенный или градуированный одностенный спермоприемники. Стерилизуют их сухим жаром, кипячением или автоклавированием. Стерилизация сухим жаром проводится при температуре 160-180°C в течение 40-60 минут. Перед стерилизацией подготовленный спермоприемник закрывают крышкой и заворачивают в пергаментную бумагу или фольгу. Если стерилизация проводится кипячением или автоклавированием, то после извлечения из стерилизатора или автоклава с внутренних стенок спермоприемника необходимо удалить капельки воды. Перед присоединением к искусственной вагине в обеззараженный двустенный спермоприемник наливают воду. В спермоприемнике для быка вода должна иметь температуру 30-35°C, для барана - 25-30°C; заливают воду температуры соответственно 35-40°C и 30-35°C.

Стерилизация полиэтиленовых спермоприемников проводится с помощью бактерицидных ламп. Спермоприемники раскладывают в один ряд и выдерживают под лампами в течение 40-50 минут.

Смазывание резиновой камеры. Внутреннюю поверхность резиновой камеры смазывают стерильным вазелином или синтетической средой с помощью эбонитовой палочки. Обеззараживают палочку спиртовым тампоном, пропитанным 96%-ным спиртом. Для обеззараживания конец палочки обхватывают тампоном и несколькими движениями назад и вперед тщательно обрабатывают ту часть ее, которая будет соприкасаться с внутренней поверхностью камеры. затем концом палочки берут вазелин из банки и круговыми движениями начиная с конца вагины равномерно смазывают поверхность камеры. Отрезок ее (длиной 2-3 см в вагине для барана, 4-6 см - для быка и хряка и 8-10 см - для жеребца) со стороны спермоприемника не смазывается для предупреждения попадания вазелина в сперму.

Присоединение спермоприемника. Стеклянный спермоприемник для быка вставляется в вагину до кольцевого выступа на его середине и закрепляется резиновым держателем и кольцом. При использовании одноразового полиэтиленового спермоприемника для быка, конец вагины можно обернуть полоской стерильной фильтровальной бумаги для предупреждения попадания вазелина в сперму. Полоску выдвигают на 1-2 см за край корпуса, сверху на корпус вагины одевают спермоприемник и закрепляют его кольцами. В Европейской модели прибора спермоприемник вставляется в узкую часть резинового конуса и прочно удерживается без дополнительной фиксации благодаря расширению (фланцу) на его открытом конце.

В вагине для барана спермоприемник не крепится, а при получении спермы придерживается пальцами. К вагине для жеребца спермоприемник присоединяется одеванием его на узкий конец корпуса (горловину); в момент совокупительных движений производителя он удерживается в таком положении давлением руки. К искусственной вагине для хряка спермоприемник присоединяется при помощи обеззараженного отрезка резиновой ка-

меры с отверстием; отрезок укрепляют на корпусе вагины резиновыми кольцами. К металлической вагине пластмассовый спермоприемник присоединяется посредством специальной резиновой муфты или же отрезка камеры для вагины барана.

Нагнетание воздуха в искусственную вагину. Воздух в вагину нагнетается через краник с помощью баллона, двойных шаров Ричардсона или специального компрессора. Для этого резиновый шланг от компрессора (трубку от шаров) надевают на верхнюю (округлую) часть краника, открывают его и нагнетают воздух; нагнетание продолжают до смыкания стенок камеры и образования щели или треугольной складки. В искусственную вагину для жеребца воздух не нагнетается, давление создается за счет большого объема полости цилиндра и перемещения в нем воды. В жестяную вагину для хряка воздух нагнетают через тонкий патрубок в пространство между внутренней стенкой корпуса и резиновой камерой. Шары Ричардсона посредством стеклянного тройника соединяют длинными резиновыми трубками с патрубком и манометром (ртутным или водяным). По показаниям манометра во время получения спермы следят за давлением в вагине и при необходимости понижают или увеличивают его до необходимого уровня: 40-60 мм ртутного или 40-50 см водяного столба. Устройство для нагнетания воздуха имеется и в ряде зарубежных моделей искусственной вагины для хряка. Оно остается присоединенным к кранику в процессе получения спермы. Это необходимо для регулирования давления в вагине, к которому очень чувствительны хряки.

Измерение температуры в искусственной вагине. Температуру в вагине проверяют непосредственно перед взятием спермы. Подготовленную вагину несколько раз покачивают для равномерного обогривания водой ее стенок (если она не находилась в термостате после наполнения водой), поворачивают спермоприемником вверх и вставляют специально предназначенный для этой цели спиртовой термометр в открытый конец вагины. Предварительно термометр обеззараживают ватным тампоном, смоченным 96%-ным спиртом-ректификатом. Температура в вагине (образца 1942 г.) в момент получения спермы должна быть не ниже 40^oC и не выше 42^oC. При использовании укороченной вагины с одноразовым спермоприемником температуру устанавливают не ниже 43^oC и не выше 55^oC.

Получение спермы от быка

В предприятиях по искусственному осеменению сперму от быков-производителей получают в искусственную вагину. В качестве манекена используют малоценных в племенном отношении быков или волов, а также чучела различных конструкций. Использование быков-производителей в качестве подставных животных неблагоприятно отражается на качестве их спермы, поэтому практикуется редко. Взятие спермы с использованием ме-

ханических установок более целесообразно по сравнению с подставными животными: снижается микробная контаминация эякулятов, улучшаются условия работы техников, повышаются технологические свойства спермы и удлиняются сроки эксплуатации производителей. Наиболее популярны механическое чучело с амортизирующим устройством и подвижное чучело (рис. 21).

Получают сперму в манеже, а в теплое время года и на открытой площадке. Манеж должен быть просторным, высотой не менее 4 м, площадью 70 м² или более. В нем устанавливается одно или несколько чучел и станки для фиксации животных-манекенов (рис. 22 а). Сзади станка или чучела пол покрывают прочными резиновыми матами или ковриками из другого эластичного материала. Возле стенок манежа устанавливают защитные барьеры, обеспечивающие безопасность работы с животными.

В США некоторые организации по искусственному осеменению в помещениях устраивают просторные манежи, площадью 150-200 м² или даже 500 м². В них оборудовано несколько мест (до 6) для получения спермы на корову, другого быка или чучело, а также для фиксации и выдержки производителей перед взятием спермы. Такая разнообразная обстановка усиливает половое возбуждение у быков и способствует более быстрому получению спермы хорошего качества. Пол в таких манежах покрыт резиновыми ковриками, но чаще земляной (глинобитный), следовательно более благоприятный для конечностей быков. Взятие спермы может вестись на быка или корову, не зафиксированных в станках (рис. 22 г).

В манеж для взятия спермы быка вводят с помощью палки-водила длиной около 2 м, зафиксированной за носовое кольцо (рис. 22 б). Производителя подводят к животному-манекену, выдерживают несколько минут и допускают садку. В момент прыжка быка студент (оператор), расположенный на 2-3 шага справа и сзади подставного животного или чучела, немедленно подходит ближе и левой рукой (ладонь обращена вверх) осторожно смещает за препуций половой член производителя в правую сторону и направляет его в искусственную вагину (рис. 22 в, г); продольная ось вагины в этот момент должна совпадать с направлением полового члена. Прикосновение или обхватывание рукой непосредственно пениса быка может затормозить рефлекс эрекции, а в начале совокупительного движения - вызвать даже преждевременную эякуляцию (рис. 22 е).

После совокупительного толчка вагине придают горизонтальное положение, но не снимают с полового члена производителя, а опускают по мере движения быка вниз (пока он передними конечностями не коснется пола). После этого, отняв искусственную вагину, переворачивают ее спермоприемником вниз, открывают краник, чтобы выпустить из меж стеного пространства воздух и дать стечь эякуляту в спермоприемник. От вагины стеклянный спермоприемник отделяют постепенно и осторожно, затем закрывают крышкой. В современной модели прибора полиэтиленовый спермоприемник оставляют на цилиндре вагины и при помощи прибора "Мол-

ния" герметизируют в нем полученный эякулят, после чего ножницами отделяют эту часть и передают в лабораторию.

Взятие спермы проводят в утренние часы до кормления производителей. Именно такая очередность производственных процессов необходима потому, что одновременное сочетание акта кормления и взятия спермы является одним из факторов, предрасполагающих к развитию импотенции.

Получение высококачественной спермы возможно лишь при условии хорошей подготовки быков непосредственно перед ее взятием. При этом важное место должно отводиться функциональной подготовке. Целостная эффективная система подготовки их к получению спермы должна включать следующие мероприятия.

1. Гигиена манекена (животного, чучела). До начала работы животных, на которых получают сперму, необходимо тщательно почистить, чтобы во время садки производителя микроорганизмы с частицами грязи и пыли с них не попадали в воздух, на половой член производителя и в искусственную вагину. Если используют чучело, то его моют теплой водой с мылом, высушивают и обеззараживают 2%-ным раствором хлорамина. Можно использовать для мытья и обеззараживания раствор перекиси водорода. Обработку чучела проводят обычно сразу после окончания получения спермы.

2. Гигиена быка производителя - чистка, подмывание препуция и высушивание. Наружную поверхность препуция обмывают теплым раствором фурацилина и насухо вытирают бумажной салфеткой или туалетной бумагой. Можно использовать индивидуальные полотенца. Если препуций сильно загрязнен, то его моют теплой водой с мылом, а затем обмывают раствором фурацилина. Полностью животное моют за день до получения спермы или не ранее, чем за 1-1,5 часа до получения, и тщательно высушивают (рис.23).

3. Подвязывание стерильного фартука (рис. 23).

4. Функциональная подготовка к взятию спермы быков молочных пород: ввод в манеж, подвод к манекену, одна холостая садка, выдержка возле манекена 2,5 минуты, две холостые садки и получение эякулята. Такая же подготовка и перед получением второго эякулята. При отсутствии фартука во время холостых садок половой член производителя необходимо отводить в сторону, чтобы он не касался манекена или чучела (рис. 22). Быков мясных пород после подвода к манекену не сдерживают, а позволяют сделать три холостых садки, затем берут первый эякулят; второй эякулят обычно получают без предварительных холостых садок.

5. Температура в искусственной вагине с одноразовым полиэтиленовым спермоприемником устанавливается в пределах 45-46°C (возможно до 55°C).

6. Проводка производителя и получение второго эякулята не позднее, чем через 10-15 минут.

7. Регулярная смена манекена, замена чучела на манекена или наоборот, смена места получения спермы, присутствие других животных в манеже.

Применение системы функциональной подготовки для взятия спермы позволяет существенно повысить эффективность использования быков-производителей (Г.Ф. Медведев и Н.А. Лебедев). Себестоимость производства одной спермодозы в Могилевском племпредприятии в зависимости от уровня половой потенции быка и сезона года была снижена на 5,3-37,6%. Кроме того, повышалась криоустойчивость и оплодотворяющая способность их спермы.

Получение спермы с помощью электроэякулятора. В практике иногда возникает необходимость применить метод электроэякуляции. Обычно этим методом получают сперму от молодых, не приученных к искусственной вагине быков для оценки качества их спермы, а в центрах по искусственному осеменению - и от старых, хромых быков, которые не могут сделать садку. Перед получением спермы производителя фиксируют в станке, прямую кишку освобождают от каловых масс и подмывают препуций. При наличии современного прибора (рис. 24) зонд его с электродами вставляют в прямую кишку и прижимают книзу. После этого делают электрические стимулы в соответствии с рекомендованной инструкцией режимом, при этом напряжение тока постепенно повышают. В начале при невысоком напряжении происходит выделение секрета луковичных желез, затем следует обильное выделение секрета пузырьковидных и предстательной желез и, наконец, семенная жидкость по каплям стекает по волосам препуция или из отростка уретры выдвинутого полового члена. Обычно сперма выделяется спонтанно, пассивно, но иногда отмечается эрекция пениса и оргазм. В таких случаях эякулят нередко теряется. Оргазм часто сопровождается поворотом головки полового члена вокруг продольной оси. Это же можно наблюдать и при массаже и при получении спермы в искусственную вагину. В момент электроэякуляции сперму собирают как и при ректальном массаже. Объем эякулята чаще больше стандартного.

Получение спермы методом массажа. Известно, что во время полового возбуждения сперматозоиды из канала придатка семенника перемещаются в ампулы спермиопроводов и сохраняются там до момента эякуляции. Массажом можно вызвать сокращение ампул и выделение половых клеток наружу.

Перед получением спермы быка выдерживают возле коровы в охоте, чтобы вызвать у него половое возбуждение. Затем руку вводят в прямую кишку на глубину 25-35 см; при необходимости освобождают ее от каловых масс. В момент расслабления находят твердый червеобразный орган - мочеполовой канал. Двигая по нему рукой вперед, отыскивают мягкую шейку мочевого пузыря с лежащими на ней ампулами спермиопроводов в виде эластичных трубок, толщиной почти с палец, а по бокам от них - грушевидные пузырьковидные железы. Производят осторожный массаж желез спереди назад, и таким же образом массируют ампулы спермиопроводов. Обычно двухминутного массажа бывает достаточно для того, чтобы выделилась сперма. Если массировать только пузырьковидные железы, то, как правило, выделяется семенная жидкость без сперматозоидов.

Объем получаемой этим методом семенной жидкости колеблется от 0,5 до 23 мл. Так как пенис при массаже часто не выдвигается и не наступает эрекции его, то для предотвращения загрязнения спермы волос вокруг отверстия препуция тщательно подмывают и вытирают насухо. Сперму собирают в чистый стаканчик, подставленный к отверстию препуция, или специальное приспособление, входящее в комплект электроэякулятора (рис. 24). Полученная этим методом сперма нередко бывает загрязнена мочой, имеет более высокое содержание секрета пузырьковидных желез и вообще худшее, чем в нормально эякулированной жидкости, соотношение отдельных компонентов. При грубом и неумелом массаже возможны травмы спермиопроводов и пузырьковидных желез.

Этим методом можно воспользоваться для получения спермы от тех быков, которые по какой-либо причине (слабые или больные задние конечности, слишком вялое проявление половых рефлексов и др.) не в состоянии выделить сперму в искусственную вагину или идти в случку.

Получение спермы от барана.

Сперму от барана получают в манеже, а в теплое время года - и на открытой площадке. В качестве подставного животного используют овцу в охоте. Особенно это необходимо вначале приучения производителя к ис-

кусственной вагине. В последующем, когда будут выработаны условные рефлексы на обстановку и время, можно пытаться получить сперму и на овцу не в охоте, а то и на валуха или другого малоценного барана, или даже на чучело. Перед получением спермы брюхо барана или козла и препуций их необходимо почистить.

Сперму от барана получают также, как и от быка. Половой акт у овец продолжается недолго, поэтому студент должен быть наготове и находится возле зафиксированной в станке овцы справа. При подходе барана к овце (манекену) студент немедленно должен опуститься на корточки и следить за его поведением. В момент садки барана левой рукой необходимо отвести половой член за препуций в сторону и направить в вагину. После совокупительного толчка баран соскакивает с овцы и в это время вагину отнимают и поворачивают спермоприемником вниз. Затем открывают краник, выпускают воздух, отделяют спермоприемник от вагины, накрывают крышечкой и передают в лабораторию.

Когда нет возможности или не удастся получить сперму от барана в искусственную вагину, применяют метод электроэякуляции.

Получение спермы от хряков. От хряков сперму получают в манеже пункта искусственного осеменения. В качестве манекена используют чучело свиньи. Конструкции чучел разнообразны, но все они имеют сплошную поверхность, что позволяет легко мыть и дезинфицировать ее.

Чаще используется деревянное чучело (рис. 26). По внешнему виду оно похоже на свинью и это способствует более быстрой выработке у хряков условных половых рефлексов и обеспечивает в последующем хорошее проявление их. Искусственная вагина фиксируется внутри чучела. Наружная поверхность задней части его имеет воронкообразное углубление с отверстием в центре. Оно совпадает с просветом искусственной вагины. Для обеспечения скольжения и попадания полового члена хряка в вагину углубление в стенке чучела делают гладким и скользким. Это достигается путем нанесения на деревянную поверхность кисточкой раствора органического стекла в ацетоне или дихлорэтане. При получении спермы в холодном помещении внутрь чучела помещается электрическая лампочка. Включают ее в сеть в момент получения спермы. Это предотвращает снижение температуры в искусственной вагине. На спермоприемник одевают ватно-марлевый чехол.

Нередко используются чучела, представляющие собой простые лавки. На расстоянии примерно 60 см от задней части чучела размещают опоры для передних конечностей хряка. Лавку обивают мягким материалом, а сверху кожей. При получении спермы на такое чучело искусственную вагину техник держит в руке или же получает сперму мануальным способом. В помещении чучело размещается так, чтобы хряк подходил к нему сзади и с боков, но не спереди. Особое внимание обращают на высоту задней части

чучела и наличие удобной для хряка поверхности пола (не скользкой, ребристой).

Для приучения хряков к садке на чучело его вначале можно обтянуть шкурой свиньи в охоте или обрызгать жидкостью с специфическим запахом, полученной из влагалища свиноматки в охоте. Приучают хряков к вагине по отдельности или группой. Для облегчения этой работы в качестве манекена можно использовать свиноматку в охоте. После садки хрячка половой член его отводят в сторону и направляют в искусственную вагину. В последующем он может быстрее сделать садку и на чучело.

Успех приучения хрячков к садке на чучело зависит от их возраста и половой потенции, а также отсутствия или наличия половых извращений. Уже в 6-месячном возрасте у хрячков проявляется половая потенция, а их половые железы вырабатывают достаточное для оплодотворения количество сперматозоидов и секретов, формирующих эякулят. С этого момента можно начать приучение их к искусственной вагине.

После садки на чучело хряк делает поисковые движения пенисом, при этом все глубже и глубже вводит его в вагину. После нескольких глубоких совокупительных движений он успокаивается и начинает выделять сперму. Хвост у него в это время закручивается кверху, семенники подтягиваются ближе к анальному отверстию, мошонка становится слабо напряженной и несколько отвисшей.

После окончания эякуляции хряка удаляют из манежа, искусственную вагину вынимают из чучела, отсоединяют от нее спермоприемник и передают его в лабораторию.

Применение искусственной вагины у свиней имеет ряд особенностей. Хряки менее чувствительны, чем быки, к температуре в вагине, но для них очень важным является давление. При коитусе необходимое давление создается после введения закрученной головки пениса в спиралевидный цервикальный канал. В зависимости от состояния мышечной оболочки шейки матки давление в нем периодически изменяется. В обычной искусственной вагине подобные условия отсутствуют. Однако предложены и такие модели приборов, в которых имеется пульсатор и суживающаяся латексная трубка с конической стальной спиралью, имитирующая шейку матки свиньи.

Можно симулировать соответствующие условия путем обхватывания выдвинутого пениса пальцами руки, на которую одета теплая, смазанная латексная перчатка. Давление, создаваемое рукой, легко вызывает эякуляцию. Этот прием, названный *мануальным методом*, широко используется в ряде стран для взятия спермы. Постепенно находит применение он и в свиноводческих хозяйствах Беларуси. При этом методе после вскакивания хряка на чучело или свиноматку в охоте и первых начальных движениях полового члена осторожно кладут на него левую руку в перчатке. Когда совокупительные движения хорошо проявятся и половой член окажется выдвинутым полностью, обхватывают головку и плавным движением назад пыта-

ются как бы распрямить естественную извитость ее. Давление усиливают и это вызывает более энергичные совокупительные движения, а вскоре начинается и эякуляция. После начала эякуляции конечную часть полового члена можно направить вниз (рис. 26). Сперму собирают в спермоприемник, подогретый до температуры 30°C. На него кладут фильтр (марлевый), чтобы отделить густую желеобразную фракцию спермы. Первые порции спермы содержат небольшие количества желатина подобного вещества, которое остается вблизи головки полового члена, и сразу же выделяется прозрачная или слегка мутноватая фракция. Ее не собирают, а собирают только последующую фракцию, которая имеет молочно-белую окраску и богата сперматозоидами. После этой основной фракции выделяется третья фракция сероватого цвета; ее также не собирают. К концу эякуляции хряк опять начинает делать совокупительные движения и выделяется при этом желеобразная фракция спермы.

Используя этот способ, можно уверенно распознать и отделить основную фракцию спермы от остальных, снизить микробную загрязненность спермы, объективно и точно оценить весь процесс эякуляции.

При получении спермы от хряков следует строго соблюдать правила гигиены. Даже при хороших условиях содержания хряки часто бывают загрязнены и при садке их на чучело поднимается много пыли. Больше всего загрязнена кожа живота и препуция. Поэтому незадолго до получения спермы хряка необходимо помыть под душем либо в специальной установке, где кожа не только смачивается, но и механически очищается щетками и затем высушивается теплым воздухом.

Получение спермы от жеребца. Сперму от жеребца получают на открытой ровной площадке среди двора или под навесом. В холодную дождливую погоду получать сперму целесообразно в закрытом помещении (манеже) с высоким потолком. Получают сперму на кобылу в охоте. Тазовые конечности ее фиксируют случной шлеей, хвост забинтовывают.

После подготовки кобылы двое студентов (или конюх и студент) выводят жеребца на поводьях. Спокойных жеребцов может выводить один человек. Как только у производителя хорошо проявится эрекция (пенис приподнимается к брюху) его сразу же пускают на кобылу. Техник по взятию спермы (преподаватель и помощник - студент) находится с правой стороны кобылы, в нескольких шагах; вагину удерживает в правой руке. Один из помощников его находится с другой стороны и во время садки жеребца должен быстро отвести хвост кобылы в сторону и постоянно удерживать его. Техник в момент начала садки приближается быстро к животным, искусственную вагину прижимает к крупу кобылы, а левой рукой берется за половой член жеребца вблизи головки (ладонь руки обращена вниз) и направляет его в вагину. Касание рукой полового члена не тормозит половых рефлексов у жеребцов. Не следует только дотрагиваться до головки пениса. Как только половой член производителя попадет в искусственную вагину,

ее необходимо прижать обеими руками к крупу кобылы (рис. 27). При этом левая рука фиксирует скобу корпуса, а правая располагается сверху спермоприемника; угол наклона вагины спермоприемником вверх 30-35°. При получении спермы от крупных жеребцов технику помогает удерживать вагину помощник. Жеребец делает мощные совокупительные движения и чтобы вагина не отходила вперед, необходимо особый упор делать на спермоприемник. Эякуляция быстрее проявится, если головка пениса будет достигать суженной части горловины. Здесь возникает необходимое для выделения спермы давление.

Во время совокупительных движений необходимо следить за состоянием резиновой камеры вагины. Если возникает опасность срыва ее с цилиндра или нарушения целостности, то немедленно ослабляют пробку патрубка и выпускают немного воздуха; затем опять пробку плотно закручивают. При разрыве камеры воздух и вода выходят из цилиндра и жеребец немедленно прекращает садку.

Садка у лошадей продолжается 1-1,5 минуты, эякуляция происходит в течение 10-20 секунд. Об эякуляции можно судить по ритмичному сокращению мускулатуры корня хвоста, вследствие чего он поднимается и опускается, а также путем ощущения продвижения спермы по мочеполовому каналу вблизи мошонки. Совокупительные движения во время выделения спермы прекращаются.

В конце эякуляции жеребец медленно опускается ("сползает") с кобылы. Вместе с ним опускают искусственную вагину спермоприемником вниз, а затем медленно и осторожно, чтобы не потерять часть эякулята, снимают с полового члена. Следует учитывать, что головка пениса в это время сильно увеличена и грубое и быстрое снятие вагины может причинить боль производителю.

Если садка по какой-то причине не получилась, то жеребцу делают проводку в течение нескольких минут и затем опять подводят к кобыле.

Режим получения спермы от производителей. От быка обычно получают по два эякулята в день с промежутком в 5-15 минут; интервалы между взятием спермы - 3-4 дня или более в зависимости от половой потенции производителя. При получении трех эякулятов в день промежутки между взятием составляют 4-5 дней (3 раза за две недели).

От взрослых баранов сперму получают во время случного сезона ежедневно или через день по 2-3 эякулята (2 эякулята утром с промежутком в 5-10 минут и 1 (иногда 2 эякулята) вечером; молодых производителей используют реже (1-2 эякулята в день). От козла сперму берут 2-3 раза в неделю.

У хряка получают один эякулят через 3-4 дня.

У жеребца сперму получают обычно во время случного сезона по одному эякуляту 5-6 дней подряд с предоставлением в последующем одного-двух дней отдыха.

ОЦЕНКА КАЧЕСТВА СПЕРМЫ

Цель занятий: изучение методов оценки качества спермы и приобретение студентами навыков применения их на практике.

Методические указания. Занятия проводят в клинике и лаборатории кафедры или в учебном пункте. Сначала преподаватель знакомит студентов с существующими методами оценки качества спермы, выделяя из них те, которые используются для оценки каждого эякулята (*обязательные*), и другие методы (*дополнительные*), позволяющие всесторонне оценить сперму; дополнительные методы используются периодически.

К обязательным методам относят:

*оценку внешних свойств спермы,
оценку спермы по густоте и подвижности сперматозоидов,
определение концентрации сперматозоидов в сперме.*

Дополнительные способы включают:

*определение процента живых сперматозоидов путем дифференциальной окраски;
определение процента морфологически ненормальных сперматозоидов;
определение метаболической активности сперматозоидов (по скорости обесцвечивания метиленовой синьки, индексу фруктолиза, показателю рН и др.);
определение абсолютного показателя живучести сперматозоидов и другие.*

Целесообразно занятия (два или три по 2-4 часа) по оценке качества спермы сочетать с получением спермы от различных производителей. При этом учитывается место и условия проведения занятия и др. Если имеется возможность в клинике кафедры получать сперму от самцов всех видов сельскохозяйственных животных, то обязательные методы следует применить каждый раз, а дополнительные изучать поочередно. Целесообразно провести отдельное занятие по освоению методов оценки сохраняемой спермы, обратив особое внимание на оценку по подвижности и частоте повреждений акросомы сперматозоидов.

Вопросы для контроля полноты усвоения знания и понимания значения методов оценки качества спермы для прогнозирования оплодотворяющей способности ее и плодовитости производителя:

1. В какие сроки должна быть проведена оценка полученной спермы? При какой температуре хранят ее до разбавления?
2. От чего зависят внешние свойства спермы - цвет и консистенция? Каковы характерные цвет и консистенция спермы хорошего качества у различных производителей?
3. Чем может быть загрязнена сперма? Что делают со спермой загрязненной или с измененными цветом, консистенцией?
4. Можно ли ограничиться оценкой внешних свойств спермы?
5. Как влияет понижение температуры на подвижность сперматозоидов в свежеполученной сперме? При какой температуре следует определять их подвижность?
6. Влияют ли толщина мазка и процент подвижных сперматозоидов на результаты оценки спермы при микроскопическом исследовании? Как оценивают подвижность сперматозоидов в различных странах?
7. С какой целью определяют концентрацию сперматозоидов в сперме?
8. Какой метод наиболее часто используется для определения концентрации сперматозоидов? Какие факторы влияют на этот показатель?
9. Какие наиболее типичные отклонения в морфологии сперматозоидов встречаются? Как их классифицируют?
10. Какие факторы могут вызвать появление в сперме повышенного числа ненормальных сперматозоидов?
11. Какие аномалии сперматозоидов обусловлены генетически и какие связаны с факторами внешней среды? Какие аномалии наиболее сильно влияют на плодовитость производителя?
12. Какие тесты можно использовать для оценки интенсивности метаболических процессов в сперме? Их сущность?
13. Существует ли корреляционная связь между концентрацией сперматозоидов в сперме и индексом фруктолиза, величиной рН, скоростью обесцвечивания метиленовой сини?
14. Как изменяется рН свежеполученной спермы при хранении при комнатной температуре?
15. Каковы стандартные показатели качества спермы быков, баранов, хряков и жеребцов с нормальной воспроизводительной способностью?
16. Какие показатели качества спермы подвержены наибольшему изменению?

17. Возможно ли улучшение качества спермы после ее получения?
18. Какие методы оценки качества спермы позволяют наиболее объективно и точно прогнозировать ее оплодотворяющую способность?
19. Результаты какой оценки спермы: до замораживания (охлаждения) или после оттаивания более важны при искусственном осеменении?
20. Как определить состояние акросом у подвижных сперматозоидов? Сохраняют ли сперматозоиды способность к оплодотворению при повреждении акросомы?
21. Какие факторы влияют на результаты оценки качества спермы?
22. Почему необходимо постоянно регистрировать показатели качества эякулятов у одного и того же производителя?

На первом занятии (4 часа) после ознакомления студентов с обязательными методами оценки качества спермы, а также правилами работы с микроскопом, осветительными приборами и обогревательными столиками, ФЭК или спектрофотометром, преподаватель намечает последовательность работ и поручает каждому студенту выполнить определенную работу (подготовка вагины; подготовка, привод и фиксация производителя и манекена; получение спермы). Получив сперму от быка (барана, жеребца, хряка), студенты осматривают эякулят и измеряют его объем. Затем распределившись на небольшие группы (по 2-3 человека) готовят мазки и счетные камеры и оценивают сперму по густоте и подвижности, определяют в ней концентрацию сперматозоидов путем прямого подсчета, а в заключение под контролем преподавателя определяют этот показатель с помощью оптического прибора.

Оценка внешних свойств спермы.

Объекты исследования, материалы и оборудование: животные - бык, корова (чучело) или самец и самка другого вида; оборудование, материалы и инструменты для получения спермы (соответствующего вида животных), стерильные марлевые салфетки; лабораторные весы, смесители для спермы, мерные цилиндры на 100, 250 и 500 мл, стерильные градуированные пипетки на 2 и 10 мл.

Оценка внешних свойств свежеполученной спермы проводится по следующим критериям: цвету, консистенции, запаху и объему эякулята.

Таблица 4.

Объем эякулята самцов сельскохозяйственных животных

Производитель	Объем эякулята, мл		
	минимальный	средний	максимальный
Баран	0,6	1	2
Бык	2	4—6	10
Жеребец	20	70—75	300
Хряк	100	200—250	500

Цвет спермы зависит от вида животных и содержания в ней сперматозоидов: чем больше содержится их в сперме, тем более белый цвет ее. Сперма барана белого цвета с желтоватым оттенком, быка - белого или желтоватого, а жеребца и хряка - серовато-белого цвета. При наличии примесей крови сперма приобретает буроватый или розовый цвет; примеси хлопьев или сгустков гноя придают сперме синевато-зеленоватый, а мочи - желтоватый цвет.

Запах нормальная сперма сельскохозяйственных животных не имеет. Гнилостный или другой запах в ней может быть результатом воспалительного процесса в половых путях.

Изменение цвета спермы или появление в ней запаха дает основание для выбраковки эякулята.

Консистенция, как и цвет спермы, зависит от концентрации сперматозоидов. Чем больше содержится в ней половых клеток, тем более вязкая консистенция. Сперма барана имеет консистенцию сливок, быка - редких сливок или густого молока, а сперма жеребца и хряка - водянистая.

Объем эякулята быка определяют сразу же после получения путем взвешивания отделенной герметизированной части полиэтиленового спермоприемника. Взвешивают на точных весах (типа ВЛК-20, ВЛК-500, Р-2-200 или др.); масса 1 г спермы принимается за 1 мл, при этом вычитается масса самого спермоприемника. В Европейской модели вагины объем эякулята определяют по шкале градуированного спермоприемника. При получении спермы в стеклянный двустенный спермоприемник, ее предварительно разбавляют 1:1 (добавляют 5 мл среды) и затем переливают в специальный градуированный смеситель и определяют объем.

Объем эякулята барана измеряют с помощью градуированной пипетки на 2 мл или определяют по меткам одно-стенного спермоприемника. Объем спермы жеребца и хряка определяют в градуированных мензурках или цилиндрах после процеживания через трехслойный марлевый фильтр.

При измерении объема эякулята мерная посуда должна быть сухой, стерильной и подогретой до температуры свежеполученной спермы.

Оценка спермы по густоте и подвижности сперматозоидов

Объекты исследования, материалы и оборудование: животные - бык, корова (чучело) или самец и самка другого вида; оборудование, материалы и инструменты для получения спермы (соответствующего вида животных); термостат для микроскопа; микроскопы МБР (МБИ-1, МБИ-3, МБИ-4 или БИОЛАМ) с осветителями ОИ-35 либо МКИ-11, микроскоп МБИ-11 (МБИ-14) с телевизионной камерой; конденсор светлого и темного поля марки ОИ-10 производства ЛОМО или фазово-контрастный микроскоп; обогревательные столики; дозаторы пипеточные и наконечники к ним, пипетки глазные, палочки стеклянные; предметные и покровные стекла; марлевые салфетки; система автоматического компьютерного анализа спермы.

Эта оценка производится путем просматривания спермы под микроскопом при увеличении 100-250х (в зависимости от типа микроскопа и набора объективов и окуляров). На чистое подогретое предметное стекло стерильной стеклянной палочкой или глазной пипеткой наносят маленькую каплю спермы и накрывают ее покровным стеклом. Желательно, чтобы каждый раз величина капельки была одинаковой, так как от этого в значительной мере зависит объективность и точность оценки. Это условие в полной мере можно выдержать при использовании дозатора пипеточного регулируемого или калиброванного на 0,03 мл. К дозатору прилагается 20-30 полиэтиленовых наконечников. Готовят их заранее: моют путем погружения в теплый раствор натрия гидрокарбоната, затем тщательно промывают проточной и дистиллированной водой; обеззараживают путем погружения в этиловый спирт или выдержки под бактерицидной лампой.

Чтобы капля равномерно растеклась под покровным стеклышком (без пузырьков воздуха) и не выходила за его края, поступают следующим обра-

зом. Держа двумя пальцами за грани (ребрышки) покровное стеклышко, касаются одной его гранью предметного стекла возле края капли под углом 45-50°. Когда капля расплывется по всей ширине стеклышка, медленно опускают его. Покровное стеклышко должно быть тщательно вытерто. Протирают его марлевой салфеткой между большим и указательным пальцами, поворачивая за ребрышки пальцами другой руки.

Исследуют сперму при температуре 38-40°C (в организациях по искусственному осеменению в США - при 35-37°C с помощью фазово-контрастного микроскопа). Для создания требуемой температуры используют специальный термостат или обогревательный столик (конструкции Морозова или Пакенаса) с автоматическим регулированием температуры. Обогревательный столик помещают на предметный столик микроскопа. При помощи макро винта приближают объектив (увеличение 80-120х) к предметному столику микроскопа на расстояние 4-5 мм и устанавливают необходимое освещение. Обычно пользуются электрическим осветителем ОИ-35 либо МКИ-11, а при отсутствии осветителя - осветительным зеркалом. В таких случаях микроскоп необходимо расположить напротив хорошего источника света (окно помещения, лампа дневного света и т. д.). Равномерность и сила освещения достигается за счет приподнимания или опускания конденсора микроскопа и прикрытия диафрагмы. Для улучшения видимости сперматозоидов желательно использовать конденсор темного поля ОИ-10; в поле зрения будут отчетливо просматриваться ярко светящиеся контуры половых клеток на темном фоне.

После подготовки микроскопа готовят мазок и помещают его на обогревательный столик. Глядя в окуляр, при помощи макро винта медленно приподнимают тубус до появления изображения в поле зрения. Вращая затем микро винтом в ту или другую сторону добиваются четкого изображения.

Густота спермы определяется по количеству сперматозоидов, наблюдаемых в поле зрения микроскопа. Такая оценка проводится с целью получения предварительных данных о содержании половых клеток в сперме и о необходимости дальнейшей оценки ее. Наиболее хорошо разработана для спермы быка и барана. Имеет самостоятельное значение лишь в том случае, когда по какой-либо причине не определяют концентрацию сперматозоидов. Классифицируют сперму как густую, среднюю и редкую.

Густая сперма - все поле зрения заполнено сперматозоидами без промежутков между ними; обозначается буквой **G**.

Средняя сперма - промежутки между сперматозоидами имеются, но они не превышают размеров сперматозоида; обозначается буквой **C**.

Редкая сперма - промежутки между сперматозоидами превышают их размеры; обозначается буквой **P** (рис. 28).

Олигоспермия - в поле зрения имеются единичные сперматозоиды; обозначается буквой **О**. *Аспермия* - в поле зрения сперматозоиды отсутствуют; обозначается буквой **А**.

Таблица 5.

Зависимость густоты спермы от концентрации сперматозоидов

Производитель	Концентрация сперматозоидов в сперме, млрд. в мл		
	в густой	в средней	в редкой
Баран	≥ 2	1—2	≤ 1
Бык	≥ 1	0,8—1	$\leq 0,8$
Жеребец	$\geq 0,25$	0,15—0,25	$\leq 0,15$
Хряк	$\geq 0,2$	0,1—0,2	$\leq 0,1$

К использованию допускается сперма быка, жеребца и хряка с оценкой густая и средняя, сперма барана - только густая.

Одновременно с определением густоты спермы проводят и оценку ее по подвижности (активности) сперматозоидов. Различают три вида движения сперматозоидов: прямолинейно-поступательное, манежное и колебательное. Нормальным для сперматозоидов движением является *прямолинейно-поступательное*. Сперматозоиды с *манежным, колебательным* движением или *неподвижные* неспособны к оплодотворению.

Подвижность сперматозоидов оценивают по 10-балльной шкале. Если около 90% сперматозоидов движутся прямолинейно поступательно, то такой сперме ставится оценка 9 баллов, если 80% - 8 баллов и т.д. *Некроспермия* - все сперматозоиды в поле зрения неподвижны; обозначается буквой **Н**. Свежеполученная сперма допускается к использованию по подвижности, если она оценена не ниже 8 баллов у барана, не ниже 7 баллов - у быка и хряка и не ниже 6 баллов - у жеребца. Результат оценки по густоте и подвижности сперматозоидов обозначается двумя знаками, например Г-9, С-9, Р-7 и т.д.

В ряде стран (США и др.) допускается использование спермы, в которой не менее 50% клеток обладают поступательным движением. При оценке по подвижности большое внимание уделяется характеру движения половых клеток, а также образованию в мазке из свежеполученной спермы вихрей и завихрений и их силе. В густой сперме энергичнодвигающиеся в одном направлении сперматозоиды образуют своеобразные потоки ("струи"). Когда такие струи сталкиваются, в поле зрения возникают темные завихрения, которые быстро исчезают.

5 баллов оценивается сперма, если в мазке сперматозоиды проявляют очень быстрое и энергичное поступательное движение, за счет которого чрезвычайно быстро возникают вихреобразное движение и небольшие завихрения, постоянно изменяющиеся в поле зрения.

4 балла - быстрое поступательное движение сперматозоидов и внезапное формирование вихреобразного движения и завихрений в просматриваемом мазке.

3 балла - устойчивое, средней силы поступательное движение сперматозоидов; вихревое движение и небольшие завихрения продвигаются более медленно через поле зрения.

2 балла - слабое поступательное движение, отмечаются остановки и возобновление движения сперматозоидов. Вихреобразное движение и завихрения отсутствуют.

1 балл - слабое волнообразное или колебательное движение сперматозоидов.

0 баллов - отсутствие в мазке подвижных сперматозоидов.

Для предприятий по искусственному осеменению Республики Беларусь инструкцией (1998 г.) рекомендуется при оценке спермы быка по подвижности не сразу выбраковывать густые эякуляты, в которых сперматозоиды проявляют слабое движение. Возможно, что в момент эякуляции половые клетки не успевают полностью выйти из состояния анабиоза. Поэтому капельку такой спермы необходимо разбавить одной-двумя капельками натрия цитрата, подогретого до 38-40°C, затем провести оценку в нескольких полях зрения и сделать окончательное заключение о пригодности спермы к использованию.

В крупных центрах по искусственному осеменению ряда стран используют современное оборудование, позволяющее определять концентрацию и подвижность сперматозоидов (включая прямолинейное поступательное и маневренное движение), а также морфологию их. Имеется уже три поколения систем автоматического компьютерного анализа спермы. В системах первого и второго поколения не дифференцируются клеточные фрагменты от неподвижных сперматозоидов. Поэтому необходимо проводить раствор через мембранные фильтры 0,2 μ . Системы третьего поколения анализируют каждый объект (клетку) до хвоста и если не обнаруживают его, то не включают в общее количество. Использование этих систем позволяет повысить точность оценки качества спермы и ее оплодотворяющую способность.

Определение концентрации сперматозоидов в сперме.

Объекты исследования, материалы и оборудование: животные - бык, корова (чучело) или самец и самка другого вида; оборудование, материалы и инструменты для получения спермы (соответствующего вида животных); микроскопы МБР (МБИ-1, МБИ-3, МБИ-4 или БИОЛАМ) с осветителями ОИ-35 либо МКИ-11, микроскоп МБИ-11 или БИОЛАМ-М с телевизионной камерой; камеры Горяева, лейкоцитарный и эритроцитарный меланжеры (смесители); марлевые салфетки; спектрофотометр или фотоэлектрический колориметр; дозаторы пипеточные, градуированные микропипетки на 0,1 мл и пипетки на 1, 2, 5 и 10 мл; система автоматического компьютерного анализа спермы; 96%-ный этиловый спирт, эфир, дистиллированная вода, 3%-ный раствор натрия хлорида; шары Ричардсона или резиновый баллон (для продувания смесителей).

Концентрацию сперматозоидов определяют:

- путем подсчета в счетной камере,
- с помощью спектрофотометра (фотоэлектрического колориметра),
- с помощью специальных электронных счетчиков.

Определение концентрации сперматозоидов с помощью счетной камеры.

Счетная камера Горяева (рис. 29) представляет собой пластинку из толстого стекла. Поделена желобами на поля: центральное и два опорных.

Центральное поле разделено средним поперечным желобом на две части; это поле на 0,1 мм ниже опорных полей и на каждой половине его выгравирована сетка. При помещении на опорные поля покровного стекла над сетками образуется пространство высотой 0,1 мм; оно закрыто только с двух сторон, а с двух других сторон остаются широкие щелевидные отверстия, через которые заполняют спермой камеру. Чтобы шлифованное покровное стекло прочно держалось, его помещают на чистую и обезжиренную спиртом камеру и, прижимая пальцами к опорным полям, притирают до появления радужных колец (рис. 30).

На сетки камеры помещается сперма, разбавленная 3%-ным раствором натрия хлорида (или дистиллированной водой). Разбавление производят в смесителях (меланжерах). Сперму барана разбавляют в 200, быка - в 100 раз. Для этого в эритроцитарный смеситель (с красной бусинкой) набирают сперму соответственно до метки 0,5 и 1,0, а раствор (воду) - до метки 101. Сперму жеребца и хряка разбавляют в 20 раз, набирая ее в лейкоцитарный смеситель (с белой бусинкой) до метки 0,5, а раствор (воду) до метки 11.

Смесители должны быть чистыми и сухими. Поэтому после использования их промывают многократно дистиллированной водой, а затем 96%-ным спиртом и эфиром (1:1) и высушивают путем продувания воздуха резиновым баллоном или шарами Ричардсона. Для удобства в работе на каждый смеситель одевают резиновую трубку (15-20 см) с кусочком зашлифованной стеклянной трубки.

Перед использованием кончик пипетки смесителя обеззараживают спиртовым тампоном. Обеззараженную часть пипетки слегка погружают в сперму, берут в рот кончик резиновой трубки (отрезок стеклянной трубки) и осторожно набирают сперму до нужной метки. Кончик пипетки вытирают ватой, одновременно подравнивая столбик спермы до метки, затем быстро погружают в раствор натрия хлорида и насыщают его до метки 101 (11). После этого зажимают кончик пипетки меланжера большим пальцем левой руки, быстро перегибают резиновую трубку возле другого конца меланжера, а затем и на кончике пипетки, постепенно освобождая его от пальца. Кончик резиновой трубки фиксируют на меланжере. Зажав концы смесителя между мизинцем и большим пальцем быстрыми движениями кисти руки смешивают сперму с раствором (водой) в течение 2-3 минут.

После перемешивания немедленно производят зарядку камеры. При этом первые 3-4 капли из смесителя сливают отдельно. Последующую каплю на кончике смесителя подносят к центральному полю и касаются ею щелевидного отверстия у края покровного стекла. Капля быстро заполняет пространство между центральным полем с сеткой и покровным стеклом; пузырьков воздуха не должно быть над сеткой. Если часть капли останется у края покровного стеклышка, ее необходимо осторожно снять комочком сухой ваты. Другую сетку можно заполнить другим образцом спермы.

Камеру помещают на предметный столик микроскопа (*строго горизонтальное расположение!*), устанавливают увеличение 200х, подбирают необходимое освещение и осторожно наводят микроскоп. Сперматозоидов подсчитывают в пяти больших квадратах сетки (по диагонали), каждый из которых поделен на 16 малых квадратов.

Концентрацию сперматозоидов вычисляют по формуле:

$$C = \frac{N \cdot D \cdot 4000 \cdot 1000}{n},$$

где С — концентрация (количество) сперматозоидов в 1 мл (см³),

N — количество подсчитанных сперматозоидов,

D — степень разбавления спермы раствором (водой),

4000 - коэффициент перевода в объем (малый квадрат имеет объем 1/4000 мм³),

1000 - количество мм³ в 1 см³,

n — количество малых квадратов, в которых производился подсчет (80).

Удобнее пользоваться упрощенными формулами, которые получены из приведенной выше:

а) формула для расчета концентрации спермы барана

$$C = N/200;$$

б) формула для расчета концентрации спермы быка

$$C = N/100;$$

в) формула для расчета концентрации спермы жеребца и хряка

$$C = N/1000,$$

где С — концентрация сперматозоидов в сперме, млрд./мл;

N — количество сперматозоидов, подсчитанных в пяти больших (80 малых) квадратах.

Электрофотометрический метод

Этот метод базируется на зависимости мутности или оптической плотности спермы от содержания сперматозоидов. Оптическая плотность различных образцов спермы при стандартном разбавлении повышается прямо пропорционально концентрации половых клеток. Точно определить оптическую плотность можно с помощью спектрофотометра (фотоэлектрического колориметра, эритрогеметра и др.).

Из свежеполученного эякулята отбирают пробу спермы и разбавляют 2,9%-ным раствором натрия цитрата. Сперму быка разбавляют в 100 раз; в зависимости от типа прибора и объема кюветы берут 0,05 или 0,1 мл спермы и соответственно 5 или 10 мл натрия цитрата. Сперму барана разбавляют в 400 раз; для этого берут 0,025 мл спермы и 10 мл натрия цитрата. Сперму хряка разбавляют в 30 раз, используя 0,4 мл спермы и 12 мл натрия цитрата. Разбавление производят во флаконе емкостью 10-20 мл. Необходимо до получения спермы приготовить столько флаконов, сколько планируется получить эякулятов, и в них заранее внести раствор натрия цитрата.

При взятии проб спермы необходимо стремиться к высокой точности. Отбирать пробы следует только микропипетками или дозаторами пипеточными из середины свежеполученных эякулятов, не допуская попадания в них пены или вазелина. Перед внесением пробы спермы в раствор микропипетку (наконечник дозатора) следует вытереть снаружи чистой марлевой салфеткой для удаления излишней спермы. Температура 2,9%-ного раствора натрия цитрата должна быть в пределах +20-25°C.

Для исследования необходимы две кюветы (для фотоэлектрических колориметров - с рабочей длиной 10 мм). Одну из них наполняют до метки разбавленной спермой, вторую - раствором натрия цитрата. Кюветы ставят в кюветодержатель прибора. Сначала располагают на пути пучка света (с длиной волны около 550-нанометров, красный светофильтр) кювету с раствором натрия цитрата (без спермы). Стрелка гальванометра при этом смещается. Ручками грубой и тонкой настройки ее устанавливают на "0" (рис. 31). Затем перемещают кюветодержатель, располагая на пути пучка света кювету с разбавленной спермой. В результате стрелка гальванометра укажет величину, соответствующую оптической плотности спермы.

Для определения концентрации сперматозоидов в сперме по величине оптической плотности необходимо прокалибровать шкалу прибора, т. е. установить, какой концентрации соответствует одно деление шкалы. Для этого необходимо определить концентрацию сперматозоидов в 12-15 эякулятах путем подсчета в счетной камере и одновременно исследовать эти эякуляты с помощью прибора. Подсчет сперматозоидов в каждом образце спермы в камере должен проводиться четырехкратно; для этого заправляют два мелянжера и из каждого из них - две сетки камеры. Из четырех подсчетов (они не должны отличаться более чем на 10%) берется среднеарифметический результат. Отобранные для построения калибровочной кривой эякуляты должны быть различной концентрации - от редких до самых густых.

Определив оптическую плотность спермы с помощью прибора и концентрацию сперматозоидов в счетной камере в исследуемых эякулятах, строят калибровочную кривую. Для этого откладывают в определенном масштабе на миллиметровой бумаге по оси абсцисс показатели концентрации сперматозоидов 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 млрд./мл и т. д., а по оси ординат - величины оптической плотности - 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 и т. д. На пересечениях перпендикуляров с оси абсцисс и оси ординат ставят точки в соответствии с полученными данными. Затем проводят калибровочную кривую так, чтобы она охватила большинство точек (рис.31).

Калибровочную кривую следует выводить для каждого прибора в отдельности и время от времени ее проверять. При исследовании большого числа образцов можно пользоваться коэффициентами-множителями (это возможно при прямолинейной зависимости концентрации и оптической плотности). Для этого необходимо сделать регрессионный анализ полученных данных и определить коэффициент регрессии для двух показателей:

концентрации и оптической плотности. Зная величину концентрации сперматозоидов для одного деления шкалы прибора (коэффициент), можно легко определить концентрацию сперматозоидов в неразбавленной сперме. Для этого необходимо перемножить оптическую плотность на коэффициент.

Наиболее точно определить концентрацию сперматозоидов в сперме можно с помощью специальных электронных счетчиков. В этих приборах разбавленная сперма пропускается через капилляр так, что между электродами проходит только один сперматозоид. Головка его вызывает резкое увеличение сопротивления и это регистрируется счетчиком.

Такие счетчики необходимы и при оценке качества разбавленной спермы путем фильтрации через сфадекс гель/стекловату. Приготовленный сфадекс гель укладывается поверх пробки из стекловаты на дно пластикового шприца, используемого в качестве фильтрационной колонки. Фильтр колонки промывается буфером и в нее вносится небольшое количество спермы. Затем система промывается большим количеством буфера и в фильтрате подсчитывается число сперматозоидов. Мертвые или поврежденные клетки, а также отдельные формы абнормальных клеток остаются в фильтрационной колонке, тогда как живые проходят через нее. Считают, что целостность мембраны и поверхности сперматозоидов определяет возможность продвижения их через такую систему. Отмечена высокая степень зависимости оплодотворяющей способности спермы от соотношения живых и мертвых сперматозоидов.

В сохраняемой сперме можно определить количество сперматозоидов (в единице объема или дозе) по содержанию ДНК. Для определения ее необходим буфер, специальный краситель и флуорометр. В каждом сперматозоиде содержится 3,3 пкг ДНК.

Дифференциальная окраска живых и мертвых сперматозоидов.

Объекты исследования, материалы и оборудование: свежеполученная сперма; микроскопы МБР (МБИ или БИОЛАМ) с осветителями, МБИ-11 или МБИ-14 с телевизионной камерой; дозаторы пипеточные и наконечники к ним, пипетки глазные, палочки стеклянные, петля платиновая; предметные стекла, стекла с шлифованными краями; ванночки; фильтровальная бумага, марлевые салфетки; красители: эозин, берлинская лазурь; соли KH_2PO_4 и Na_2HPO_4 для приготовления фосфатного буфера; дистиллированная вода, смесь спирта этилового с эфиром (1:1); обогревательный столик, устройство для сушки мазков (электрофен бытовой).

Этот метод, предложенный В.А. Морозовым в 1938 г., основан на свойстве эозина проникать через мембрану мертвых сперматозоидов и окрашивать их; мембрана живых клеток не пропускает краску и они остаются не окрашенными. Использование других красителей в сочетании с эозином, может повышать точность метода за счет создания фона, на котором лучше просматриваются окрашенные и неокрашенные сперматозоиды.

На край обезжиренного предметного стекла наносят дозатором пипеточным (стеклянной палочкой, глазной пипеткой) маленькую капельку свежеполученной спермы и рядом с ней - капельку 5%-ного водного раствора эозина. Обе капельки быстро смешивают стеклянной палочкой (уголком шлифованного стекла) и делают тонкий мазок. Для этого прижимают торцевой гранью шлифованное стеклышко к предметному стеклу и подводят его под углом 35-40° к капле так, чтобы она растеклась сзади него на всю ширину грани. Придерживая в наклонном положении шлифованное стеклышко большим и указательным пальцами, быстро, но плавно тянут каплю вдоль предметного стекла к другому краю; при этом капля равномерно размазывается сзади стеклышка. Ровным получится мазок, если указательный

палец, фиксирующий шлифованное стеклышко, опустить несколько ниже грани предметного стекла и двигать по ней. Важно, чтобы мазок был тонким (заканчивался на расстоянии 0,5-1 см от края предметного стекла); в таких случаях он быстро высохнет. Чтобы ускорить высыхание, его следует положить на подогретые обогревательный столик или пластину (45-55°) и обдувать потоком теплого воздуха (можно использовать электрофен бытовой).

Высушенный мазок просматривают под микроскопом при увеличении 900х (иммерсионный объектив); увеличение 300-400х менее подходящее для этого метода. Подсчитывают минимум 100 сперматозоидов. К окрашенным (*мертвым*) клеткам относят тех, у которых окрашена полностью головка или задняя часть ее. После подсчета выводят процент неокрашенных (*живых*) клеток.

Зарубежные организации по искусственному осеменению используют следующий рецепт красителя. Растворяют 1 г эозина синеватого (спирт- или водо-растворимого, 88% содержание краски) и 4 г берлинской лазури (анилин голубой водо-растворимый) в 100 мл М/8 фосфатного буфера. Для приготовления буфера растворяют 1,702 г KH_2PO_4 в 100 мл дистиллированной воды и 1,776 г безводного Na_2HPO_4 в 100 мл дистиллированной воды. Смешивают 28,5 мл раствора KH_2PO_4 и 71,5 мл раствора Na_2HPO_4 . Краситель растворяют в буфере и прогревают в водяной бане при 85°С в течение 10 мин. Финальный показатель рН красителя должен быть 6,6. Хранить буфер можно в холодильнике при 5°С.

Для приготовления мазков берут дозатором пипеточным или градуированной пипеткой 0,03 мл красителя, подогретого до комнатной температуры, и капельку спермы. Смешивают платиновой петлей (толщина проволоки 1-3 мм) или тоненькой стеклянной палочкой и делают мазок. Процедура приготовления мазка (после смешивания спермы с красителем) до помещения его на теплую пластину не должна превышать 15 с., а высыхание - более 30 секунд. Высушенный мазок просматривают под микроскопом при увеличении 900х.

На результаты дифференциальной окраски сперматозоидов оказывают влияние рН смеси, концентрация применяемых красителей и время, за которое может произойти окрашивание клеток. Поэтому следует постоянно выдерживать условия приготовления мазков, а также одинаковый рецепт раствора красителя.

Определение процента патологических (морфологически ненормальных) сперматозоидов.

Объекты исследования, материалы и оборудование: свежеполученная сперма; микроскопы МБР (МБИ или БИОЛАМ) с осветителями, МБИ-11 или МБИ-14 с телевизионной камерой; конденсор светлого и темного поля марки ОИ-10 производства ЛОМО или фазово-контрастный микроскоп; дозаторы пипеточные и наконечники к ним, пипетки глазные, палочки стеклянные; предметные стекла, стекла с шлифованными краями, пробирки, ванночки; фильтровальная бумага; красители: эозин, берлинская лазурь,

кристаллвиолет, анилин, основной фуксин; карболовая кислота, спирт этиловый; калий хлорид, натрий фтористый, KH_2PO_4 и Na_2HPO_4 для приготовления фосфатного буфера; 2,9%-ный раствор натрия цитрата, дистиллированная вода, смесь спирта этилового с эфиром (1:1), марлевые салфетки; термостат, обогревательный столик, устройство для сушки мазков (электрофен бытовой).

Для сперматозоидов каждого вида животных характерна своя структура и величина; не исключены и некоторые индивидуальные особенности. Появление в эякуляте значительного числа клеток с явными отклонениями в их структуре (*тератоспермия*) сопровождается понижением плодовитости производителя. Это может быть обусловлено тем, что продвижение ненормальных сперматозоидов в половом тракте самки к месту оплодотворения нарушено и не накапливается там необходимое число половых клеток (в половом тракте есть места, которые не пропускают ненормальных сперматозоидов), или же с неспособностью таких клеток вызвать оплодотворение и последующее развитие зародыша.

Ненормальности головки имеют большее значение, чем ненормальности в области хвоста. В связи с этим классифицируют ненормальности сперматозоидов как: первичные (главные), вторичные и третичные. *Первичные* связаны с головкой или акросомой клетки, *вторичные* - с наличием цитоплазматической капельки в средней части хвоста и *третичные* - с другими дефектами хвоста.

В предприятиях по искусственному осеменению необходимо периодически (один-два раза в год) тщательно просматривать образцы спермы от каждого производителя и при выявлении повышенного числа ненормальных клеток внимательно обследовать животное.

При наличии фазово-контрастного микроскопа или конденсора ОИ-10 готовят сырой неокрашенный мазок. На обезжиренное предметное стекло наносят капельку спермы и капельку 0,35 М раствора калия хлорида или 40,0 мМ натрия фтористого, приготовленных на 2,9%-ном растворе натрия цитрата. После смешивания делают тонкий мазок. Просматривают с использованием иммерсионного объектива 100 клеток. Можно исследовать свежеполученную и оттаянную сперму.

Более надежно исследование производить в окрашенных сухих мазках. Самый простой способ - это использование мазка, окрашенного смесью эозина и анилина голубого при определении процента живых и мертвых сперматозоидов. Однако, можно готовить и окрашивать мазок непосредственно для определения патологических форм сперматозоидов.

При приготовлении мазка следует предотвратить температурный шок, в результате которого хвостики сперматозоидов закручиваются и невозможно отличить такие клетки от тех, которые образовались в семенниках. Попадание воды (например, влажное предметное стекло) также вызывает этот артефакт. Свежеполученные сперматозоиды легко разламываются в области шейки, что приводит к увеличению процента бесхвостых головок. Чтобы предотвратить такую опасность, можно до исследования сперму вы-

держат при комнатной температуре; сохраняемые сперматозоиды менее чувствительны к разломам.

Перед приготовлением мазка сперму разбавляют изотоническим раствором натрия хлорида или натрия цитрата. В пробирку вносят 1 мл раствора и добавляют одну каплю спермы быка. Степень разбавления спермы барана должна быть большей, а спермы хряка и жеребца - меньшей. Температура раствора и спермы перед смешиванием должна быть одинаковой. Смешивание проводят осторожно, путем легкого постукивания пальцем по нижнему концу пробирки. Каплю приготовленной смеси помещают на обезжиренное предметное стекло и делают мазок.

Если сперма хранилась несколько часов, то можно нанесенную на предметное стекло каплю спермы накрыть вторым таким же стеклом и плавно и ровно протянуть его по первому. Мазки высушивают при температуре 36-37°C в термостате, а затем фиксируют на пламени или погружением на 1-2 минуты в стаканчик с 96%-ным этиловым спиртом. После фиксации производят окрашивание. Используют различные красители. Хорошие результаты получают при двойном окрашивании анилиновым генцианвиолетом и карболовым фуксином Циля. Фиксация мазков после высушивания не требуется.

Анилиновый генцианвиолет (Эрлиха).

Раствор А.

Кристаллвиолет (85% красящего вещества) - 2,5 г;
этиловый спирт (96%-ный) - 12 мл.

Раствор Б.

Анилин - 2 мл;
дистиллированная вода - 98 мл.

После полного растворения оба раствора смешивают вместе и хранят во флаконе с стеклянной пробкой.

Карболовый фуксин Циля.

Раствор А.

Основной фуксин (90% красящего вещества) - 3 г;
этиловый спирт (96%-ный) - 10 мл.

Раствор Б.

Фенол (карболовая кислота) - 5 г;
дистиллированная вода - 95 мл.

Раствор А добавляют в *раствор Б*, смешивают и хранят во флаконе с стеклянной пробкой.

Для получения лучших результатов карболовый фуксин надо время от времени фильтровать. Хранить обе краски можно бесконечно.

Высушенные мазки окрашивают в течение 2 мин. анилиновым генцианвиолетом и сразу же промывают проточной, затем дистиллированной водой и высушивают. После этого дополнительно окрашивают карболовым фуксином в течение 10-15 с. или дольше, в зависимости от желательной интенсивности окрашивания; промывают проточной водой, потом дистиллированной и высушивают.

Из каждого образца спермы готовят 2-3 мазка, исследуют под микроскопом с иммерсионной системой и в каждом из них просматривают 100-

200 сперматозоидов. Это дает более надежные результаты, чем просмотр большего количества клеток (до 500) в одной мазке. При подсчете ненормальных сперматозоидов придерживаются какой-либо классификации. Проще всего аномалии в структуре спермиев классифицировать по измененным частям их: аномалии в области головки, шейки, средней части (тела) и хвоста.

Головки могут быть двойными, конусообразными и грушевидными, круглыми, сморщенными, большими, узкими, удлинёнными, уменьшенными, асимметричными. Наиболее частые *аномалии шейки*: сломанные шейки, бесхвостые головки. *Аномалии тела*: изогнутые, разорванные, удлинённые, утолщенные, двойные, нитевидные и рудиментарные, а также ненормальное прикрепление тела к головке. *Аномалии хвостика*: извитые, двойные, сломанные, изогнутые, закрученные и срезанные (рис. 33).

Многие патологические изменения в структуре сперматозоидов появляются в результате нарушения сперматогенеза. Особенно это относится к отклонениям в величине и форме головки, а так же к нарушениям структуры тела и хвостика. Большие головки бывают у сперматозоидов с диплоидным набором хромосом; головка и хвостовая часть у них, как правило, деформированы. Некоторые нарушения по своему происхождению генетические.

В сперме каждого производителя, даже с высокой плодовитостью, обнаруживаются морфологически ненормальные половые клетки, однако процент их обычно невысокий. У животных с гипоплазией семенников, с воспалительными процессами в них, а также при нарушениях условий кормления число таких клеток может резко возрасти.

В сперме барана содержание морфологически ненормальных сперматозоидов не должно превышать 14%, в сперме быка - 20%, хряка и жеребца - 39%. Обычно в сперме быков молочных пород число ненормальных сперматозоидов менее 10%, из них 0-5% клеток с первичными нарушениями, 1-5% - с вторичными и 2,5-7,5% - с третичными.

Определение метаболической активности сперматозоидов.

Предложены следующие методы: измерение поглощения кислорода из расчета на стандартное число клеток, определение скорости обесцвечивания метиленовой сини, определение индекса фруктолиза и величины pH и др. Каждый из этих способов объективно отражает активность метаболических процессов, происходящих в сперматозоидах при температуре выше 20-25°C. Поэтому в большинстве случаев отмечают корреляционную связь данных, полученных с помощью этих методов, с основным показателем качества спермы - ее оплодотворяющей способностью. В практике обычно используют способ, основанный на способности сперматозоидов при отсутствии источника кислорода обесцвечивать метиленовую синьку.

Определение качества спермы по скорости обесцвечивания метиленовой синьки.

В процессе гликолиза при окислении фосфоглицеринового альдегида выделяется водород, который переносится на пировиноградную кислоту, превращая ее в молочную. Метиленовая синь является хорошим акцептором водорода. При присоединении двух ионов водорода этот краситель теряет свой темно-синий цвет и превращается в лейкометиленовый синий, представляющий собой белый порошок. Водород фруктоза отдает под воздействием внутриклеточного фермента дегидрогеназы. Реакция должна происходить без доступа воздуха, так как кислород воздуха быстро окисляет лейкометиленовый синий в метиленовый.

Объекты исследования, материалы и оборудование: свежеполученная сперма, желток куриных яиц, 2,9%- и 3,6%-ный раствор натрия цитрата; дозаторы пипеточные и наконечники к ним, пипетки глазные, палочки стеклянные; предметные стекла с луночками, стеклянные трубки с внутренним диаметром 0,8-1 мм, бактериологические пробирки; цилиндры мерные на 10, 100 и 1000 мл, колбы емкостью 100 мл и 1 л, банка из темного стекла с притертой пробкой; марлевые салфетки; водяная баня, метиленовая синька, физиологический раствор, минеральное (вазелиновое) масло; секундомер или часы, аналитические (точные) весы.

По методу Н.П. Шергина на предметное стекло с луночкой глазной пипеткой наносят каплю свежеполученной спермы быка или барана и добавляют каплю 0,01%-ного раствора метиленовой синьки. Быстро перемешивают обе капли стеклянной трубкой с внутренним диаметром 0,8-1 мм и набирают в нее смесь так, чтобы образовался столбик длиной около 2 см без пузырьков воздуха (пены). Трубку кладут на белую бумагу при температуре 20-22°C и наблюдают, через какое время голубой столбик обесцветится. По концам, где мениски смеси соприкасаются с воздухом, окраска обычно не изменяется. Оценивают сперму исходя из сроков обесцвечивания смеси: *хорошее качество* - для быка 5-10 и для барана 3-7 минут, *среднее* - соответственно 11-30 и 8-12 минут, *плохое* - более 30 минут для быка и более 12 минут для барана.

Раствор метиленовой синьки необходимо приготовить заранее. Для этого сначала готовят 1000 мл физиологического раствора на дистиллированной воде, затем растворяют в нем 100 мг краски. Краску переливают в банку из темного стекла с притертой пробкой и хранят в закрытом шкафу.

В качестве стеклянных трубочек можно использовать кусочки разбитых шприцев-катетеров для осеменения коров. Концы таких трубочек шлифуют наждаком или напильником.

Метод Бека и Солсбери (Beck G.H., Salisbury G.W.). В бактериологическую пробирку (объем 10 мл) вносят 0,2 мл свежеполученной спермы и 0,8 мл желточно-цитратной среды (40 мл 2,9%-ного раствора натрия цитрата и 10 мл желтка); тщательно смешивают. Добавляют 0,1 мл раствора метиленовой синьки, приготовленного из 50 мг красителя и 100 мл 3,6%-ного раствора натрия цитрата ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$); содержимое смешивают и покрыв-

вают слоем минерального (вазелинового) масла толщиной 1,25 см. Пробирку помещают в водяную баню с регулируемой температурой при 43-46°C. При такой температуре восстановление метиленовой сини происходит наиболее быстро, а бактерии, попавшие в образец при получении или обработке спермы, не оказывают влияния на результаты, так как многие из них погибают. Лучшие по качеству эякуляты быка обесцвечивают краситель в течение 3-6 минут.

Определение выживаемости (живучести) сперматозоидов вне организма.

Объекты исследования, материалы и оборудование: свежеполученная сперма, среда для разбавления спермы, оттаянная сперма; дозаторы пипеточные и наконечники к ним, пипетки глазные, палочки стеклянные; предметные и покровные стекла; термостат, микроскопы МБР (МБИ-1, МБИ-3, МБИ-4 или БИОЛАМ) с осветителями ОИ-35 либо МКИ-11, микроскоп МБИ-11 (МБИ-14) с телевизионной камерой; конденсор светлого и темного поля марки ОИ-10 производства ЛОМО или фазово-контрастный микроскоп; термостат для микроскопа, обогревательные столики; марлевые салфетки; система автоматического компьютерного анализа спермы.

Установлена зависимость оплодотворяющей способности спермы от степени сохранения подвижности сперматозоидов при стандартных условиях (например, при температурах близких к 0°C). В.К. Миловановым был предложен метод, который позволяет одновременно проследить за характером снижения подвижности сперматозоидов в течение всего срока хранения, определить максимальную продолжительность жизни отдельных сперматозоидов и найти оптимальную степень разбавления. В настоящее время степень разбавления спермы варьирует в более узких пределах, чем было предусмотрено автором, поэтому метод этот в полном объеме не используется. Достаточно исследовать сперму после стандартного разбавления: от 100-125 до 150-187 млн. сперматозоидов в мл из расчета получения 10-15 млн. подвижных клеток в грануле или солоmine после оттаивания.

Для исследования 1-2 мл разбавленной спермы оставляют в холодильнике при 2-4°C и ежедневно определяют подвижность сперматозоидов при температуре 38-40°C до полной их гибели. Суммируя все произведения времени (в часах), в течение которого наблюдалась та или иная подвижность, на активность сперматозоидов (в баллах), вычисляют абсолютный показатель живучести. Для спермы барана высокого качества он должен быть не ниже 1600, для спермы быка - 1000-1400, для спермы жеребца - 400-730 и для спермы хряка - 700-800. Максимальная продолжительность жизни для сперматозоидов (в часах) - для быка не менее 200, для барана - 250 и жеребца - не менее 300.

Для определения выживаемости сперматозоидов в замороженных эякулятах применяют экспресс-методику. Из каждого дуплетного эякулята по 2 дозы спермы после оттаивания помещают в термостат при температуре 38°C. Фиксируют время оттаивания и одновременно определяют исходную

подвижность сперматозоидов. Через 5 часов оценку повторяют. Пригодной для осеменения считают сперму (быка), начальная подвижность которой не менее 4 баллов и через 5 часов единичные (или многие) сперматозоиды проявляют движение.

Образец записи результатов исследования спермы

Дата исследования	Время исследования	Подвижность, баллов (a)	Время сохранения подвижности, ч (t)	Произведение подвижности на время (at)
7.02	8 ⁰⁰	8	12	96
8.02	8 ⁰⁰	7	24	168
9.02	8 ⁰⁰	6	24	144
10.02	8 ⁰⁰	5	24	120
11.02	8 ⁰⁰	4	24	96
12.02	8 ⁰⁰	3	36	108
14.02	8 ⁰⁰	1	36	36
15.02	8 ⁰⁰	1	24	24
16.02	8 ⁰⁰	0	-	0
				792

Определение сперматозоидов с поврежденной акросомой.

Объекты исследования, материалы и оборудование: замороженная в соломинах или гранулах сперма быка; 10%-ный раствор желатины (рН 7,0); фазово-контрастный микроскоп или микроскопы БИОЛАМ (МБИ-3 или МБИ-4) с осветителями ОИ-19 (ОИ-35, МКИ-11) и конденсор светлого и темного поля марки ОИ-10 производства ЛОМО; дозаторы пипеточные и наконечники к ним или Пастеровские пипетки; предметные и покровные стекла; фильтровальная бумага, марлевые салфетки; термостат.

Акросома сперматозоидов содержит две группы ферментов, которые играют важную роль в процессе оплодотворения. Различные дефекты ее или повреждения структуры в процессе обработки и хранения спермы приводят к потере сперматозоидами оплодотворяющей способности. Такие повреждения, как правило, возникают в процессе замораживания и оттаивания спермы. При этом большое значение имеют индивидуальные особенности производителей. Высокая частота повреждений акросомы может существенным образом повлиять на результаты осеменения. Поэтому целесообразно оценивать замороженную сперму не только по подвижности, но и по числу сперматозоидов с поврежденной акросомой. Для этой оценки используют интерференционный или фазово-контрастный микроскоп. При отсутствии их достаточно иметь микроскоп БИОЛАМ (МБИ-3 или МБИ-4) и конденсор темного поля ОИ-10.

Сперматозоиды по окраске почти не отличаются от окружающей среды. Они не адсорбируют свет, не изменяют ни интенсивность, ни цвет прошедшего через них луча, поэтому микроскопия их затруднена. Однако они изменяют фазу волны света. Для обнаружения сдвига фаз используются интерференционные или фазово-контрастные микроскопы.

В фазово-контрастном микроскопе освещение устроено по методу светлого поля. Но в нем имеются: 1) дополнительная (кольцевая) осветительная диафрагма, которая помещается под конденсором (в его передней фокальной плоскости), и 2) фазовая пластинка из вещества, поглощающего свет и вносящего определенный сдвиг фаз; фазовая пластинка помещается в задней фокальной плоскости объектива, где изображается и кольцевая диафрагма. Изображения диафрагмы и фазовой пластинки (вследствие соответствия

размеров их) совмещаются. Весь свет, не прошедший через объект, проходит через фазовую пластинку. Луч, прошедший через объект, распадается (подвергается дифракции) на пучки света (убывающей интенсивности), выходящие из объекта под разными углами. Этот дифрагированный свет проходит через весь зрачок объектива, в основном вне изображения кольцевой диафрагмы. Два пучка лучей - один от объекта, другой от среды, в которой находится объект, - соединяются, преобразуя при этом фазовые изменения, обусловленные объектом, в амплитудные (различной интенсивности). В результате получается видимое, фазово-контрастное изображение структуры объекта, в котором распределение яркостей (амплитуд) воспроизводит фазовый рельеф.

Экспресс метод определения оплодотворяющей способности сперматозоидов (разработанный под руководством Соколовской И.И.). Этот метод позволяет определять состояние акросом непосредственно у движущихся сперматозоидов в неразбавленной или оттаянной сперме быка, а также соотношение подвижных и неподвижных клеток.

Замороженную сперму быка оттаивают и разбавляют 10%-ным раствором желатины в отношении 1:1 для создания повышенной вязкости и снижения интенсивности движения сперматозоидов. Каплю разбавленной спермы (0,03 мл) наносят на предметное стекло дозатором пипеточным (Пастеровской пипеткой) и накрывают покровным стеклом. Сперму за пределами стекла удаляют при помощи фильтровальной бумаги. Приготовленные мазки немедленно исследуют под микроскопом БИОЛАМ, оснащенном окуляром 15х и объективом 40х и конденсором ОИ-10. Необходимый уровень освещения обеспечивается при помощи осветителя ОИ-19.

Для получения четкого изображения прикрывают диафрагму конденсора и опускают его кремальеру до упора; находят изображение сперматозоидов сперва в светлом поле конденсора, затем наводят фокус, полностью открывают диафрагму конденсора и вводят в ход лучи темного поля. Следя за изображением медленно перемещают кремальеру вверх до появления ярко светящихся контуров половых клеток на темном фоне.

На этом фоне можно отчетливо различить три категории клеток:

- сперматозоидов с ярким свечением всего контура головки, иногда с утолщенным передним краем – это биологически полноценные клетки с неповрежденной акросомой; у таких сперматозоидов ярко светятся также тело и хвост;

– сперматозоидов с отчетливо заметным задним ядерным кольцом и хвостом, но слабо заметным контуром передней половины головки – это неполноценные половые клетки с разбухшей акросомой (рис. 34);

– сперматозоидов с полностью отсутствующими контурами всей передней части головки – это клетки с полностью разрушенной или утерянной акросомой (рис. 34).

Просматривают в препарате 100 сперматозоидов, обладающих прямолинейным поступательным движением и вычисляют процент клеток с поврежденной акросомой. Каждый образец спермы исследуют сразу после ее оттаивания и спустя 1 и 2 часа (по И.И. Соколовской - однократно). В период исследований сперму выдерживают в термостате при температуре 37°С.

Процент сперматозоидов с поврежденной акросомой спустя 1 час после оттаивания составляет 7.1 ± 3.9 . Установлено наличие высоко достоверной корреляции этого показателя спермы с ее оплодотворяющей способностью. При увеличении содержания поврежденных половых клеток на 1%, оплодотворяемость животных снижалась на 2,48%. При анализе результатов осеменения коров и телок установлено, что средний процент оплодотворяемости после первого осеменения, при использовании эякулятов хорошего качества (ненормальных сперматозоидов 7% или менее), составил – 62.4%, при использовании эякулятов удовлетворительного качества (8-11%) – 56.3% и неудовлетворительного качества (12% или более поврежденных клеток – 35.3%. Следует отметить, что корреляционная связь между данными признаками внутри групп возростала и в третьей группе составила – 0.44 при $P > 0.05$. (Г.Ф. Медведев, С.О. Турчанов)

Определение подвижности сперматозоидов в оттаянной сперме по способу БелНИИЖ.

Объекты исследования, материалы и оборудование: замороженная в соломинах сперма быка; 2,9%-ный раствор натрия цитрата в ампулах; 7%-ный раствор глюкозы или 9%-ный раствор лактозы; микроскопы БИОЛАМ (МБИ-3 или МБИ-4) с осветителями ОИ-19 (ОИ-35, МКИ-11) и конденсор ОИ-10 или фазово-контрастный микроскоп; биотермостат, обогревательные столики, дозаторы пипеточные и наконечники к ним, глазные палочки; предметные и покровные стекла; фильтровальная бумага, марлевые салфетки; термостат.

Оттаянную в соломинке сперму выливают в ампулу с 2,9%-ным раствором натрия цитрата (1 мл, $t = 38^\circ\text{C}$); содержимое осторожно смешивают. В небольшой (5-10 мл) флакон наливают 1 мл 7%-ного раствора глюкозы медицинской безводной или 9%-ного раствора лактозы и добавляют 0,2 мл разбавленной после оттаивания спермы; температура спермы и раствора – $18-20^\circ\text{C}$. Небольшую каплю вторично разбавленной спермы наносят стеклянной глазной палочкой (дозатором пипеточным) на подогретое ($t = 38^\circ\text{C}$) предметное стекло, накрывают покровным стеклом, помещают на обогревательный столик микроскопа и просматривают при увеличении 600-800х. Подсчитывают всех сперматозоидов в пяти полях зрения, причем в каждом из них сначала учитывают подвижных. Подсчитывают общее количество просмотренных сперматозоидов и вычисляют процент подвижных.

Для лучшей видимости сперматозоидов рекомендуется использовать конденсор ОИ-10.

РАЗБАВЛЕНИЕ СПЕРМЫ

Цель занятий: приобретение студентами навыков приготовления синтетических сред, контроля качества их и разбавления спермы производителей сельскохозяйственных животных с учетом условий и срока хранения.

Объекты исследования, материалы и оборудование: самцы животных, животные-манекены или чучела (для быка и хряка); инструменты, оборудование и материалы для получения спермы; термостат, холодильник, водяная баня, магнитная мешалка, биологический термостат; спектрофотометр (электрический фотоколориметр), микроскопы МБР (МБИ-1, МБИ-3, МБИ-4 или БИОЛАМ) с осветителями, микроскоп МБИ-11 или БИОЛАМ-М с телевизионной камерой; обогревательные столики, предметные и покровные стекла; посуда - колбы, мерные цилиндры и мензурки, смесители для спермы; градуированные пипетки, стеклянные палочки; фильтры бумажные и марлевые, мембранный фильтр 0,45 мкм; спиртовые тампоны; компоненты сред - вода дистиллированная, куриные яйца, гомогенизированное молоко (гомогенизированные сливки и обрат), лактоза, глюкоза, фруктоза, сахароза, глицин, глицерин, натрия цитрат, K_2HPO_4 , $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, натрия хлорид, натрия гидрокарбонат, калия хлорид, аммония сульфат, магния сульфат, хелатон, капроновая кислота, токоферол (25-30%-ный масляный раствор), ди-трет-бутил-крезол (ДТБК), декстрин, гуммиарабик, трис-буфер, лимонная кислота, ксилит, спермосан-3 или спермосан ППК или полиген, стрептоцид, пенициллин, стрептомицин, каталаза, тилозин, гентамицин, линкомицин, спектинамицин.

Краткие методические указания. Занятия проводятся в клинике и лаборатории кафедры (учебном пункте). Сначала преподаватель объясняет студентам цель и значение разбавления спермы. Затем знакомит с составом наиболее распространенных синтетических сред для разбавления спермы различных производителей; называет и демонстрирует основные компоненты сред, которые могут быть использованы во время занятий; рассказывает о технике приготовления сред, контроле свойств и качества их, о влиянии на сперматозоидов различных факторов и правилах разбавления спермы.

После этого студентов (несколько групп) обеспечивают необходимыми реактивами, материалами и оборудованием для приготовления одной из синтетических сред. После приготовления сред (возможно одновременно с приготовлением их) ведется подготовка к получению спермы от производителя. Полученную сперму оценивают и затем разбавляют. Методы контроля качества сред можно изучить одновременно с изучением действия на сперматозоидов физических и химических факторов. По теме целесообразно проведение одного-двух занятий (по 2-4 часа).

Вопросы:

1. *Цель разбавления спермы?*
2. *Какие требования предъявляют к средам для разбавления спермы?*
3. *Роль желтка куриных яиц, глицерина, сахаров, различных солей в средах для разбавления спермы?*
4. *Что такое изотонический раствор (буфер), какова его роль в среде для разбавления спермы?*
5. *Для чего включают в среды противомикробные вещества? Какие антибиотики и сульфаниламиды наиболее часто используются, какая концентрация их в разбавленной сперме?*
6. *Какие способы внесения антибиотиков в разбавленную сперму наиболее эффективны?*
7. *Как часто используется молочная среда для разбавления спермы производителей? Какова основа этой среды? Какие вещества дополнительно вносятся в эту среду?*
8. *Какое осмотическое давление в сперматозоиде? Каково оно должно быть в среде для разбавления спермы?*
9. *При какой температуре производится начальное разбавление спермы? Как и почему необходимо охлаждать сперму перед финальным разбавлением?*
10. *В какой степени разбавляют сперму производителей сельскохозяйственных животных? От каких факторов зависит степень разбавления?*
11. *Какое количество сперматозоидов должно содержаться в одной дозе для осеменения коровы, овцы, свиньи, кобылы?*
12. *Какая подвижность сперматозоидов в свежеполученной и в разбавленной и сохраняемой сперме?*
13. *Для чего проводится окрашивание среды для разбавления спермы или соломины (пайеты)?*

Состав сред

Для приготовления сред применяют компоненты (реактивы) в заводской упаковке: в стеклянных банках с притертыми пробками (или с корковыми пробками, залитыми сверху парафином), а также в запаянных полиэтиленовых мешочках. На упаковке должна быть этикетка с обозначением названия препарата и предприятия, выпустившего реактив, степени чистоты реактива (ЧДА - чистый для анализа, ХЧ - химический чистый) и номера контрольного анализа. Хранят реактивы в шкафах в сухом теплом помещении.

Для приготовления сред используют следующие вещества.

Натрия цитрат (трехзамещенный, пятиводный - $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). Белые прозрачные кристаллы или мелкокристаллический порошок, слабощелочного, солоноватого вкуса. Обладает хелатными свойствами - активно связывает ионы кальция и тяжелых металлов и уменьшает содержание их в среде; понижает набухание и проницаемость мембраны сперматозоидов, предохраняя их от потери электрического заряда и агглютинации; рассеивает жировые шарики в желтке так, что при оценке разбавленной спермы под микроскопом можно наблюдать за отдельными сперматозоидами; вместе с другими компонентами создает необходимое осмотическое давление и рН среды.

Натрия цитрат (трехзамещенный двухводный - $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), идентичен $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

Калия фосфат (однозамещенный - KH_2PO_4). Большие прозрачные кристаллы или кристаллический порошок, слабокислый на вкус.

Натрия фосфат (двузамещенный двенадцативодный - $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$). Белые крупные кристаллы.

Натрия гидрокарбонат (NaHCO_3). Белый порошок, щелочной на вкус.

Магния сульфат ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Бесцветные кристаллы.

Аммония сульфат [$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$]. Бесцветный кристаллический порошок, возможен легкий желтоватый оттенок.

Трилон Б (*хелатон-3*, динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты, $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_8\text{N}_2\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Белые кристаллы; сберегают в темном месте.

Все эти соли, подобно натрий цитрату, связывают ионы кальция и оказывают благоприятное действие на состояние и целостность мембран сперматозоидов, создают необходимое осмотическое давление и рН среды.

Натрия хлорид (NaCl). Мелкокристаллический порошок или таблетки массой 0,9 г.

Калия хлорид (KCl). Белый мелкокристаллический порошок.

Кислота лимонная ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$). Белый кристаллический порошок, хорошо растворим в воде.

Трис-буфер (2-амино-2-гидроксиметил-1,3-пропандиол). Мелкокристаллический белый порошок. Устойчиво удерживает первоначальную величину рН среды, обладает осмотическим действием, хорошо проникает

через клеточную мембрану. Он способен соединяться с H^+ и CO_2 и устранять явления дыхательного ацидоза клеток и может заменить в средах глюкозу и натрия цитрат.

Глюкоза (виноградный сахар, $C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$). Белый гигроскопичный порошок сладкого вкуса.

Фруктоза (гексоза, $C_6H_{12}O_6$). Белый порошок сладкого вкуса.

Сахароза (тростниковый сахар, $C_{12}H_{22}O_{11}$). Представляет собой белые кристаллы, сладкие на вкус.

Лактоза (молочный сахар - $C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$). Белые кристаллы или белый кристаллический порошок без запаха, со слабым сладким вкусом, растворимы в воде. Хранят в бытовом холодильнике при температуре $5^\circ C$.

Глицин (аминоуксусная кислота, NH_2CH_2COOH). Белый мелкокристаллический порошок, слабого специфического запаха и сладковатого вкуса.

Введение в среды сахаров или глицина (гликокола) понижает их электропроводность и защищает сперматозоидов от агглютинации (склеивания их головками или всем телом в результате потери отрицательного электрического заряда), а также способствует инактивации антител (спермолизинов). Сахара (глюкоза, фруктоза) могут быть использованы сперматозоидами для метаболических процессов.

Благоприятное действие сахаров на сперматозоидов связано не только с участием их в метаболических процессах. Сахара являются источником редуцирующих веществ. Воспринимая кислород и окисляясь, они могут выполнять роль антиоксидантов и предохранять антагглютинин и ферменты, содержащие сульфгидрильную группу, от окисления. Сахара увеличивают вязкость среды и устойчивость к развитию гнилостных микроорганизмов, что также благоприятно отражается на жизнедеятельности сперматозоидов. Кроме того, они способны задерживать воду или заменять ее в структурах, чувствительных к дегидратации.

Желток куриных свежих (1-2 дня!) яиц. Содержит: глюкозу (которая используется сперматозоидами раньше, чем фруктоза плазмы спермы), различные протеиды, водо-растворимые и жирорастворимые витамины, каротин, холестерин и другие вещества, стимулирующие активность дегидрогеназ сперматозоидов. Лецитин желтка защищает сперматозоидов от температурного шока, а ряд других веществ и соединений могут служить в качестве окислительных субстратов, предохраняющих сульфгидрильные группы ферментов и антагглютинин от разрушения. Желток имеет слабокислую реакцию (рН 6,0-6,3). Обычно она нейтрализуется введением в среду лимоннокислого натрия. В среды для спермы быка и барана желтка включают 12,5-20,0%. Оптимальным количеством для спермы хряка и кролика является 3-5%, а для жеребца - менее 1% желтка.

Глицерин ($CH_2OH \cdot CHOH \cdot CH_2OH$). Простейший трехатомный спирт; представляет собой густую, прозрачную, бесцветную, гигроскопичную жидкость. Легко смешивается с водой или этиловым спиртом в любых пропорциях. При охлаждении до $-196^\circ C$ затвердевает без образования кристаллов льда. Таким же свойством обладают и растворы с концентрацией его 70%

или более. Точка замерзания растворов даже с небольшим содержанием глицерина понижается, а объем их уменьшается. Введенный в среды для замораживания спермы глицерин уменьшает опасность образования кристаллов льда и механического повреждения ими сперматозоидов, способствует снижению давления на клетки и препятствует сильному повышению концентрации растворенных веществ при образовании кристаллов льда из воды. Глицерин используется сперматозоидами путем окисления для образования энергии, а в аэробных условиях восполняет содержание фруктозы. Вносится он в количестве от 3 до 10 мл на 100 мл среды.

Бактериостатические вещества - пенициллин, стрептомицин, гентомицин, тилозин, линкомицин, спектиномицин, стрептоцид белый растворимый или комбинированные препараты: спермосан-3, спермосан ППК, полиген, комбиспермосан ЛАП и др. Все антибиотики должны быть проверены на безвредность для сперматозоидов.

При хранении спермы возможно развитие в ней микроорганизмов. Попадают они в момент получения или обработки спермы. Размножаясь, микроорганизмы выделяют в среду продукты обмена, которые отрицательно сказываются на выживаемости сперматозоидов. При осеменении внесенные со спермой в половые пути самки микроорганизмы могут препятствовать оплодотворению или развитию беременности. Особенно большую опасность представляет загрязнение спермы возбудителями специфических половых инфекций. Для предупреждения размножения микроорганизмов в сперме и инфицирования спермы вносят сульфаниламиды и антибиотики.

Среды готовят на *дистиллированной (желательно дважды дистиллированной)* воде. Проводить дистилляцию необходимо в цельностеклянном дистилляционном аппарате, чтобы вода не соприкасалась металлическими деталями. Хранят в закрытых стеклянных сосудах.

Среды для разбавления спермы быка. Сперму быка хранят при комнатных температурах, при температуре 0..5°C и при минус 196°C (в жидком азоте). Разбавляют сперму средами, состав которых зависит от технологии расфасовки и хранения.

В ряде стран (Новая Зеландия) широко практикуется хранение спермы в течение трех дней при комнатных температурах (18-24°C). Осеменение скота сезонное - с середины сентября до декабря. Осемняют ежегодно до 1,8 млн. животных. В 1991 г. в течение трех месяцев из полученной от быка голштинской породы Srocketts Trevog спермы было подготовлено и использовано для осеменения 380000 доз.

Для разбавления спермы используют *цитратно-желточную* среду. Ее насыщают азотом и добавляют капроновую кислоту. *Буфер цитратный* содержит:

Натрий цитрат ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	2,0%
Глюкоза	0,3%
Глицин	1,0%
Глицерин	1,25%
Капроновая кислота	0,03125%
Сульфацетамид	0,01%
Вода дважды дистиллированная	до 100 мл

Желток, пенициллин и стрептомицин добавляют в среду перед использованием. Содержание желтка при предварительном разбавлении 20%, после финального разбавления 5%. Сперма разбавляется нередко из расчета 2 млн. сперматозоидов в дозе (0,5 мл), но чаще ее расфасовывают в соломины объемом 0,25 мл. Добавление каталазы 20 мкг на 1 мл среды повышает оплодотворяемость на 1-2%. Каталаза разрушает образующуюся в процессе метаболизма сперматозоидов перекись водорода.

Среды для хранения при 0...5°C в течение 72 часов

Глюкозо-цитратно-желточная среда

Вода дистиллированная	100 мл
Глюкоза	3 г
Натрий цитрат	1,4 г
Желток куриных яиц	20 мл
Спермосан-3	75-90 тыс. ед.

Желточно-фосфатная среда

Фосфатный буфер и
желток куриных яиц в соотношении 1:1.

Фосфатный буфер (рН 6,7-6,8) содержит в 100 мл дистиллированной воды 0,2 г $\text{KН}_2\text{PО}_4$ и 2,0 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$. Смесь подогревается в кипящей водяной бане до растворения солей. Хранится при температуре 15°C.

При замораживании спермы (в гранулах и соломинах) разбавление проводят ЛЖГ (лактозо-желточно-глицериновой) средой или ЛГЦЖ (лактозо-желточно-цитратно-глицериновой), в состав которых входят:

Вода дистиллированная	100 мл	100 мл
Лактоза	11,5 г	10,5 г
Натрия цитрат	-	0,2 г
Желток куриных яиц	20 мл	20 мл
Глицерин	5 мл	5 мл
Спермосан-3	50 тыс. ЕД.	50 тыс. ЕД

В мировой практике широко используются *двух фракционные среды*. Сперму ими разбавляют дважды: сначала одной, а затем другой фракцией. Несодержащая глицерина *фракция А* используется для начального разбавления и охлаждения спермы, вторая *фракция Б* с удвоенным содержанием глицерина добавляется после того, как сперма охлаждена до +5°C. Введение глицериновой фракции после охлаждения уже разбавленной спермы предотвращает возможные повреждения сперматозоидов и обеспечивает проявление действия антибиотиков. Наиболее простая, состоящая из двух фракций, *желточно-цитратно-глицериновая среда*:

Фракция А

2,9%-ный цитратный буфер	400 мл
Желток свежих (1-2 дня) куриных яиц	100 мл

Фракция Б

Цитратный буфер	330 мл
Желток	100 мл
Глицерин	70 мл

Финальное соотношение *фракции А + сперма* и *фракции Б* - 1:1. При таком соотношении содержание компонентов (в %) в смеси: *буфер цитратный* - 73, *желток* - 20 и *глицерин* - 7. В эту среду (в од-

ну или обе фракции) нередко включают фруктозу или глюкозу; конечная концентрация в среде от 1 до 1,25%. Среда должна иметь рН 6,8-6,9 и осмотическое давление 285-300 милли осмомолей.

Широко используется и молочная среда. Так, в США в 1992 году 1/4 часть всей спермы была разбавлена молочной средой. Единственный серьезный недостаток этой среды - это наличие оптически различных жировых шариков, которые затрудняют оценку подвижности сперматозоидов.

Ф р а к ц и я А

Прогретое гомогенизированное молоко 500 мл

Ф р а к ц и я Б

Прогретое гомогенизированное молоко 430 мл
Глицерина 70 мл

При отсутствии оборудования для гомогенизации молока можно использовать гомогенизированные сливки жирностью 10% - 175 мл, обрат - 285 мл и 40 мл 5%-ного раствора фруктозы (Г.Ф. Медведев, Л.П. Аникевич). Молочная среда должна иметь рН 6,5-6,6 и осмотическое давление 260-290 милли осмомолей.

Среды для разбавления спермы барана. Сперму барана и козла хранят при температуре +2...4°C в течение одного-двух дней или длительное время при минус 196°C. Среды для краткосрочного хранения:

Глюкозо-цитратно-желточная среда

Вода дистиллированная 100 мл
Глюкоза 0,8 г
Натрия цитрат 2,8 г
Желток куриных яиц 20 мл
Спермосан-3 50-75 тыс. ед.

В США для разбавления спермы барана используют *желточно-цитратный* или *желточно-фосфатный буфер*. *Цитратный буфер* готовят из расчета 36 г трехзамещенного пятиводного ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 5\frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$) или 30 г двух водного ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) натрия цитрата в 1 л дистиллированной или очищенной воды. *Фосфатный буфер* готовят путем растворения 2 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ и 0,2 г KH_2PO_4 на 100 мл дистиллированной или очищенной воды. Раствор стерилизуют в водяной бане и добавляют в момент разбавления спермы 20% (к объему) желтка свежих куриных яиц.

Замораживание спермы барана практикуется реже, чем спермы быка. Это связано с недостаточно стабильными результатами осеменения маток замороженной спермой, а также с особенностями организации искусственного осеменения в овцеводстве и сроках его проведения. Для разбавления и замораживания рекомендуются синтетические среды ВИКА (с антиоксидантом), ГЖУК-трис-буфеная (с полисахаридом декстрином) и ЛЖГТЦГ (с полисахаридом гуммиарабиком).

Состав среды ВИКА

Сахароза 9,84 г
Натрий-кальциевая соль ЭДТА 0,84 г
Желток 10 мл
Глицерин 5,0 мл
Токоферол (25-30%-ный масляный раствор) 2,0 мл или
Ди-трет-бутил-крезол (ДТБК) 0,05 г
Спермосан-3 25 тыс. ЕД
Вода дистиллированная до 100 мл

Состав ЛЖГТЦГ-среды

Лактоза	14,5 г
Гуммиарабик	6,0 г
Желток	20 мл
Глицерин	17,0 мл
Трис-(оксиметил)-аминометан	0,6 г
Лимонная кислота	0,27 г
Спермосан-3	25 тыс. ЕД
Вода дистиллированная	100 мл

Состав лактозо-желточной (ЛЖ) среды

Вода дистиллированная	100 мл
Лактоза	12 г
Желток	20 мл

Состав ГЖУК-трис-буферной среды

Лактоза	8,4 г
Ксилит	0,26 г
Хелатон-3	0,135 г
Желток	20 мл
Глицерин	6,0 мл
Трис-(оксиметил)-аминометан	0,105 г
Декстрин	5 г
Спермосан-3 или ППК	25 тыс. ЕД
Вода дистиллированная	100 мл

Сперму хряка хранят при температуре +16...20°C в течение трех суток. Для этого используют *глюкозо-хелато-цитратно-сульфатную (ГХЦС)* или *глюкозо-хелато-цитратную (ГХЦ)* среды.

Состав ГХЦС:

Вода дистиллированная	1000 мл
Глюкоза.....	40 г
Хелатон	2,6 г
Натрия цитрат	3,8 г
Аммония сульфат.....	1,8 г
Натрий гидрокарбонат	0,5 г
Спермосан-3.....	250-300 тыс. ед.

Состав ГХЦ:

Вода дистиллированная	1000 мл
Глюкоза.....	60 г
Хелатон	3,7 г
Натрия цитрат	3,56 г
Натрий гидрокарбонат	1,2 г
Спермосан-3.....	250-300 тыс. ед.

Для разбавления и хранения спермы жеребца при температуре +2...4°C в течение 48 часов применяется *лактозо-хелато-цитратно-желточная среда (ЛХЦЖ)*:

Вода дистиллированная	100 мл
Лактоза	11,0 г
Натрий гидрокарбонат.....	8,0 мг
Натрий цитрат	89,0 мг
Хелатон	100 мг
Желток куриных яиц	1,6 мл
Спермосан-3	24-30 тыс. ед.

Эта же среда, но с добавлением 3,5 мл глицерина, применяется для разбавления и замораживания спермы.

Приготовление сред и разбавление спермы производителей

Приготовление сред. В племпредприятии среды готовят в день разбавления спермы. Работу по разбавлению спермы проводят в стерильной камере или в специальной оборудованной лаборатории, облученной бактерицидными лампами. Температуру (18-20°C) в лаборатории поддерживают бытовыми кондиционерами.

Среды для краткосрочного хранения спермы быка и барана (ГЦЖ) готовят следующим образом. В химическую колбу наливают дистиллированную (бидистиллированную) воду, закрывают колпачком из пергаментной бумаги и стерилизуют кипячением в течение 5-7 минут; затем охлаждают до 35°C. На точных весах отвешивают глюкозу и натрия цитрат и высыпают их в другую стерильную колбу. Стерильной мензуркой или цилиндром отмеривают нужное количество прокипяченной воды, переливают ее в колбу с реактивами и размешивают до полного их растворения. Раствор фильтруют через бумажный фильтр и стерилизуют в водяной бане 5-10 мин. Охлаждают до 35°C и добавляют спермосан-3 и желток.

Свежие (1-2 дня) куриные яйца сначала моют теплой водой с детергентом, затем промывают теплой проточной и дистиллированной водой, вытирают стерильной марлевой салфеткой и обеззараживают 70%-ным этиловым спиртом. Стерильным скальпелем яйцо раскалывают пополам и, оставляя желток в одной половинке скорлупы, сливают в чашку белок; при этом следят, чтобы оболочка желтка не была повреждена острым краем скорлупы. Осторожно наклоня скорлупу перемещают желток на стерильную фильтровальную бумагу. Для освобождения желтка от остатков белка край бумаги приподнимают, поворачивают в разные стороны и скатывают медленно желток к другому краю ее. Поддерживая на несколько сжатой бумаге желток, стерильным пинцетом или скальпелем разрушают его оболочку и выливают в подготовленную мензурку (цилиндр). Один желток имеет объем 10-20 мл.

Среда ЛХЦЖ для разбавления спермы жеребца. Отвешивают согласно рецепту лактозу и хелатон и высыпают в стерильную колбу. В эту колбу добавляют 0,2 мл 4,2%-ного стерильного раствора натрия гидрокарбоната и 0,25 мл 35,7%-ного стерильного раствора натрия цитрата (из расчета на каждые 100 мл среды) и приливают необходимое количество прокипяченной

охлажденной дистиллированной воды. Содержимое растворяют, фильтруют через стерильный бумажный фильтр и добавляют желток.

Среда ГХЦС для разбавления спермы хряка в форме сухих заготовок, выпускаемых медицинской промышленностью или специальными лабораториями научно-исследовательских институтов, готовят согласно наставлению по применению "Глюкозо-хелато-цитратно-сульфатно-бикарбонатной смеси в порошке".

Среда ГХЦ также выпускается в форме сухих заготовок или же ее готовят в лаборатории пункта. Для этого стерильным мерным цилиндром или мензуркой отмеривают необходимый объем прокипяченной дистиллированной воды и переливают ее в химическую стерильную колбу. Сюда же вносят взвешенные на точных весах необходимые компоненты, кроме saniрующих препаратов. Приготовленную среду кипятят в водяной бане 5-10 минут, охлаждают до 40-45°C и добавляют спермосан-3 из расчета 250-300 тыс. ед. на 1000 мл. Колбу закрывают стерильной пергаментной бумагой и фиксируют резиновым кольцом.

ЛГЖ - и ЛГЦЖ - среды, используемые для разбавления и замораживания спермы быка. В чистую стерильную колбу наливают необходимый объем бидистиллированной (дистиллированной) воды, закрывают колпачком из пергаментной бумаги и кипятят 10-15 мин. В горячую (90-95°C) воду вносят лактозу и перемешивают до полного растворения порошка; добавляют глицерин и содержимое еще раз тщательно перемешивают, а затем охлаждают до 20-30°C. В охлажденную среду добавляют saniрующий препарат, растворяют его, добавляют желток и натрия цитрат (в среду ЛГЦЖ, в которой лактозы 10,5 г и натрия цитрата 0,2 г). Колбу плавно покачивают до полного растворения и размешивания всех компонентов.

После приготовления часть среды (20%), предназначенную для первичного разбавления спермы, помещают в термостат при 27±1°C. Другую часть оставляют при комнатной температуре (18-20°C) и используют для окончательного разбавления. Приготовленная среда должна быть использована в течение 3-4 часов.

Желточно-цитратно-глицериновая среда. Сначала готовят цитратный буфер. На аналитических или других точных весах отвешивают 29 г натрия цитрата ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Навеску вносят в мерную колбу на 1 л и добавляют приблизительно 500 мл бидистиллированной воды. Помешиванием раствора добиваются растворения кристаллов цитрата натрия. Затем добавляют необходимое количество воды, постоянно помешивая с помощью магнитной мешалки. Приготовленный буфер переносят в емкость для хранения и стерилизуют автоклавированием или вакуумной фильтрацией через мембранный фильтр 0,45 мкм в стерильной химической колбе. Определяют осмотическое давление и рН. Хранят в прохладном месте или бытовом холодильнике до момента использования (одна-две недели).

Перед разбавлением спермы буфер подогревают до 32...35°C, разделяют на две фракции, добавляют в каждую из них необходимое количество желтка и глицерина (в фракцию Б). В фракцию А вносят из расчета на каждый миллилитр среды 100 мкг тилозина, 500 мкг гентамицина и 300/600 мкг Линко-Спектина, растворенных в 0,02 мл бидистиллированной стерильной воды. Весовые количества антибиотиков необходимо приводить в соответствие с их активностью, которая может различаться в зависимости от партии препарата. Гентомицин и тилозин могут сохраняться в растворе при 5°C в течение 8 дней, а в парах жидкого азота до 6 месяцев.

Молочная среда. Для приготовления используют свежее или пастеризованное, гомогенизированное цельное молоко жирностью около 3,5% (или гомогенизированные сливки + обрат из расчета получения смеси, жирностью 3,5%). Такое молоко содержит вредные для сперматозоидов энзимы, но при нагревании его в течение 10 минут при 92-95°C они разрушаются. Прогревают молоко в закрытом двойном стеклянном бойлере или в водяной бане; затем охлаждают до комнатной температуры. Переливают охлажденное молоко в стерильную колбу, оставляя пену в бойлере или при необходимости фильтруют через стерильный фильтр. Разделяют на две фракции. При использовании гомогенизированных сливок и обрата после стерилизации и охлаждения смеси к ней приливают стерильный раствор фруктозы и дистиллированную воду, а затем разделяют на две фракции. В фракцию А молочных сред добавляют антибиотики, в фракцию Б - глицерин. Первую фракцию оставляют при температуре 32...35°C, а фракцию Б охлаждают до температуры 4°C.

Среды для разбавления и замораживания спермы барана. При приготовлении среды ВИКА токоферол может быть заменен ди-трет-бутил-крезолом (ДТБК) в количестве 0,05 г. Раствор сахарозы и натрий-кальциевую соль ЭДТА стерилизуют в водяной бане в течение 15 минут. Желток эмульгируют с токоферолом в стерильном мерном стакане в водяной бане при температуре 37°C в течение 5-7 минут, постоянно помешивая стеклянной палочкой (удобнее пользоваться магнитной мешалкой). Затем в этот стакан вносят последовательно стерильный раствор сахарозы с солью ЭДТА, спермосан-3 и глицерин. Техника приготовления ЛЖГТЦГ - среды более сложная, что обусловлено требованиями длительной стерилизации в водяной бане (30 минут для ЛЖ - среды и 60 минут для ЛЖГТЦГ - среды) всех компонентов, кроме желтка и спермосана, контроля испарения воды в процессе стерилизации путем взвешивания колбы с содержимым и восполнения воды при значительных потерях ее.

Техника разбавления спермы быка. Зависит от свойств и состава среды. При использовании одно-фракционных сред признанную годной после предварительной оценки сперму быка вначале разбавляют 1:1 непосредственно в спермоприемнике; перед разбавлением температура среды и спермы должна быть одинаковой (27±1°C). Для этого посуду со средой хранят в термостате или на подогреваемой магнитной мешалке (рис. 35). Через 15-20 мин. после предварительного разбавления проводят финальное разбавление при температуре 18-20°C. Разбавляют сперму так, чтобы в дозе спермы после оттаивания содержалось 10-15 млн. подвижных сперматозоидов.

При разбавлении используют шприц непрерывного действия. Разбавляют сперму средой постепенно. Для этого среду приливают к предварительно разбавленной сперме небольшими порциями в полиэтиленовый спермоприемник, осторожно смешивают после добавления каждой порции среды. При использовании градуированного смесителя разбавленную в стеклянном спермоприемнике 1:1 сперму быка переливают в смеситель и небольшими порциями по стенке добавляют среду. После добавления каждой порции смеситель наклоняют так, чтобы сперма оставалась внизу его расширенной части; вращая смеситель, смешивают сперму.

Если используется желточно-цитратно-глицериновая или молочная среды для быка, то сначала добавляют антибиотики непосредственно в сперму, осторожно смешивают и выдерживают 3-5 минут до момента разбавления. На каждый миллилитр спермы берут 100 мкг тилозина, 500 мкг гентамицина и 300/600 мкг Линко-Спектина, растворенных в 0,02 мл бидистиллированной стерильной воды.

После 3-5-минутной выдержки проводят предварительное разбавление спермы фракцией А, содержащей в расчете на 1 мл такие же количества антибиотиков; степень разбавления - от 1:1 до 1:4. Обычно объем этой фракции составляет около 50% от всего объема среды. Предварительно разбавленную сперму помещают в холодильник и охлаждают в течение 2 часов до 4°C. Чтобы поддержать такой режим охлаждения необходимо сперму поставить в чашку с водой, подогретой до температуры 27±1°C.

Фракция Б может содержать 5-10% концентрации антибиотиков, определенной для фракции А. Фракция Б добавляется из расчета 1:1 по отношению к объему спермы + фракция А. Финальная концентрация антибиотиков - 50 мкг тилозина, 250 мкг гентамицина и 150/300 мкг Линко-Спектина в расчете на каждый миллилитр замороженной спермы.

Сперму быка разбавляют с расчетом получения 10-15 млн. сперматозоидов с прямолинейно-поступательным движением при подвижности не менее 4 баллов. Для расчета степени разбавления используют формулу:

$$P = \frac{C \cdot A \cdot V}{0,015 \cdot 10},$$

- где P — количество среды из расчета на 1 мл спермы;
C — концентрация сперматозоидов в сперме, млрд./мл;
A — подвижность сперматозоидов после оттаивания спермы (4 балла);
V — объем одной дозы спермы, мл;
0,015 -- необходимое число подвижных сперматозоидов в дозе после оттаивания, млрд./мл;
10 -- для пересчета подвижных сперматозоидов в абсолютное число вместо баллов.

Разбавление спермы барана и козла. После получения сперму постепенно охлаждают до 25-30°C. В момент разбавления сперма и среда должны иметь одинаковую температуру. Разбавляют сперму в спермоприемнике. На 1 мл спермы добавляют 1-2 мл среды. Охлаждают разбавленную

сперму постепенно до 2-4°C в течение 2-3 часов. Желательно флаконы со спермой поместить в химический стакан с водой температуры 25-30°C и поместить в холодильник на 2 часа.

При использовании сред для замораживания и длительного хранения после получения сперму выдерживают не более 15 минут. Средой ВИКА разбавляют в один прием в соотношении 1:2 при концентрации сперматозоидов 2,5-3,3 млрд. в мл и 1:3 при концентрации их выше 3,3 млрд. в мл. Среду (температуры 30°C) добавляют в сперму осторожно по стенкам спермоприемника.

При использовании ЛЖГТЦГ - среды сперму разбавляют в два приема: сначала ЛЖ - средой в соотношении 1:0,5 при температуре 28±2°C, а затем добавляют один объем ЛЖГТЦГ - среды при температуре 20±2°C.

ГЖУК - трис-буферной средой свежеполученную сперму разбавляют в один прием в соотношении 1:3 при концентрации сперматозоидов 3-4 млрд. в мл и 1:4 при концентрации их свыше 4 млрд. в мл.

Сперму козла разбавляют в 5-20 раз. Из одного эякулята можно получить до 40 доз, а в неделю от одного самца во время полового сезона - до 300 доз.

Разбавление спермы хряка. После получения сперму выдерживают в течение 20-30 мин. при комнатной температуре и разбавляют в 2-10 раз. В неразбавленной сперме должно содержаться не менее 100 млн. сперматозоидов, подвижность - не ниже 7 баллов.

Разбавление спермы жеребца. Разбавляют сперму, если концентрация сперматозоидов не менее 150 млн. в мл и подвижность не ниже 6 баллов. Степень разбавления - 1:2 - 1:3. Среду приливают к сперме небольшими порциями и осторожно смешивают после добавления каждой порции среды.

Изучение влияния на сперматозоидов физических и химических факторов. Контроль осмотического давления и pH сред.

В процессе разбавления, расфасовки и хранения сперма подвергается воздействию различных факторов. При последовательном переходе от одной процедуры к другой изменяется, прежде всего, температурный режим, а при непосредственном контакте спермы со средой могут измениться pH и осмотическое давление или наблюдаться нежелательные биохимические процессы. Эти изменения не должны нарушать цикл естественных биохимических процессов, целостность структуры сперматозоидов и способность их к участию в оплодотворении.

Цель занятия: изучить действие на сперматозоидов физических и химических факторов и познакомиться с методами определения pH и осмотического давления в средах для разбавления спермы.

Объекты исследования, материалы и оборудование: животные - бык, корова (чучело) или самец и самка другого вида; оборудование, материалы и инструменты для получения спермы (соответствующего вида животных); термостат для микроскопа; микроскопы с осветителями, микроскоп МБИ-11 (БИО-ЛАМ - М) с телевизионной камерой; обогревательные столики, металлическая пластина; дозаторы пипеточные и наконечники к ним, пипетки глазные, палочки стеклянные; предметные и покровные стекла; марлевые салфетки, полотенца; растворы натрия хлорида: физиологический, 0,5%-ный и 3%-ный; 1%-ный раствор молочной кислоты; лед, поваренная соль; криоскоп с термометром Бекмана и обычные ртутные термометры; pH-метр (pH-метр-милливольтметр pH-121 или pH-150 М или др.), раствор универсального индикатора (или бумажные индикаторные полоски).

Методические указания. Занятия проводят в ветеринарной клинике и лаборатории кафедры или в учебном пункте. Сначала преподаватель объясняет студентам действие на сперматозоидов некоторых фак-

торов, знакомит их с методами контроля физических и химических свойств сред для разбавления спермы. Затем студенты готовят искусственную вагину для получения спермы (от быка или самца другого вида животных), получают сперму; одновременно приготавливают и среду для разбавления спермы. Разделившись на группы (по 2 человека за столом) изучают действие температуры, растворов с различным осмотическим давлением, молочной кислоты на подвижность и выживаемость сперматозоидов. В конце занятия преподаватель демонстрирует студентам определение осмотического давления среды для разбавления спермы методом криоскопии и pH среды - потенциометрическим методом.

Изучение действия высокой и низкой температуры. В выделенной сперме, имеющей температуру $38,5^{\circ}\text{C}$, сперматозоиды проявляют высокую метаболическую активность и подвижность. При повышении температуры до $41-43^{\circ}\text{C}$ подвижность их возрастает, а скорость гликолиза в сперме быка достигает максимума при $43-46^{\circ}\text{C}$. При температуре около 50°C происходит денатурация белка и другие необратимые изменения, которые приводят к гибели клеток. Продолжительность жизни сперматозоидов при температуре выше 20°C ограничена несколькими часами. Это связано с быстрым расходом ими ряда химических соединений и неспособностью восстанавливать или поглощать их из внешней среды.

При понижении температуры интенсивность движения сперматозоидов уменьшается, а при температуре 7°C они приостанавливают свои движения. Интенсивность метаболических процессов снижается, но полностью они не прекращаются и протекают еще на достаточно высоком уровне (состояние анабиоза). Продолжительность сохранения оплодотворяющей способности сперматозоидов при таких температурах ($0-5^{\circ}\text{C}$) увеличивается до нескольких дней.

После подогревания охлажденной спермы подвижность сперматозоидов восстанавливается. Однако, это наблюдается в том случае, если охлаждалась сперма медленно. В других случаях охлаждение может вызвать у сперматозоидов необратимые изменения и гибель их. Это происходит вследствие "холодового удара" ("температурного шока") в результате резкого охлаждения. Температурный шок наблюдается при температурах выше 0°C , но возможен и при отрицательных температурах, когда сохраняется жидкая фаза и имеются условия для протекания осмотических процессов.

Наиболее чувствительны к быстрому снижению температуры сперматозоиды хряка. В неразбавленной сперме быка температурный шок у сперматозоидов возможен при температуре ниже 24°C . В разбавленной желточно-цитратной или молочной средой сперме действие температурного шока может проявиться при резком снижении температуры ниже 16°C . В связи с этим в практике должны обращать внимание на скорость охлаждения разбавленной спермы.

Для изучения действия различных температур на сперматозоидов из полученной спермы готовят три мазка; предметные стекла предварительно подогревают до температуры спермы. *Один мазок* помещают поочередно на два подготовленные обогревательные столики с температурой 38°C и $43-45^{\circ}\text{C}$ и определяют под микроскопом подвижность сперматозоидов; затем

мазок снимают с обогревательного столика и оставляют при комнатной температуре на 5-7 минут. *Второй мазок* помещают на лед и охлаждают несколько минут. После охлаждения вначале определяют под микроскопом состояние сперматозоидов при комнатной температуре, а затем кладут на обогревательный столик и определяют подвижность при температуре 38°C. Так же поступают и с уже исследованным первым мазком: просматривают его при комнатной температуре, а потом после подогревания до 38°C.

При комнатной температуре в первом мазке сперматозоиды будут проявлять заметную подвижность, а после подогревания исходная подвижность восстановится. Во втором мазке при комнатной температуре только отдельные сперматозоиды проявят слабые движения, а после подогревания немногие из них восстановят подвижность; большинство же клеток будут неподвижными - они погибнут вследствие температурного шока.

В третьем мазке определяют подвижность сперматозоидов сначала при температуре 38°C, а затем мазок помещают на подогретую до 55°C пластину и оставляют на ней несколько минут. После этого опять определяют подвижность сперматозоидов. Все клетки погибнут и не проявят подвижность.

Изучение действия растворов (сред) с различным осмотическим давлением. Осмотическое давление спермы определяется количеством растворенных в плазме веществ: минеральных и органических. Выражается осмотическое давление в атмосферах; колеблется в пределах 6,7-8,7 атм. Определяется этот показатель на основании величины депрессии, т.е. точки замерзания, которая для спермы животных равна примерно минус 0,6°C, и исходя из правила, что раствор, содержащий в 1 л грамм-молекулу не электролита, дает депрессию минус 1,86°C и имеет осмотическое давление 22,4 атмосферы. Для получения равных по осмотическому давлению сперме растворов (изотонических) необходимо брать 1/3 грамм-молекулы не электролита на 1 л дистиллированной воды. Если берется электролит, то количество вещества уменьшается во столько раз, на сколько ионов диссоциирует его молекула. Например, для приготовления изотонического раствора хлористого натрия необходимо взять не одну треть, а одну шестую грамм-молекулы, т.е. 58,5:6.

Если поместить сперматозоидов в *гипотонический* раствор или дистиллированную воду, то они быстро погибнут вследствие повышения внутреннего давления. Под влиянием гипотонического раствора хвостики сперматозоидов набухают и закручиваются. В *гипертоническом* растворе сперматозоиды погибают от обезвоживания. Они сморщиваются, а хвостики их приобретают зигзаговидную форму. Особенно губительно для сперматозоидов быстрое изменение осмотического давления. В *изотоническом* растворе (физиологический раствор, среда Дюльбекко и др.) сперматозоиды будут проявлять высокую подвижность в течение достаточно продолжительного периода времени.

Для изучения действия на сперматозоидов растворов с различной концентрацией солей из полученной спермы готовят три мазка. Для этого на подогретое предметное стекло наносят дозатором пипеточным или глазной пипеткой три капельки спермы и рядом с каждой из них капельку одного из трех растворов натрия хлорида: изотонического, 0.5%-ного и 3%-ного. Каждую пару капелек (сперму и раствор) осторожно накрывают покровным стеклом так, чтобы они соединились под покровным стеклом, но граница между ними четко просматривалась. Все три мазка исследуют под микроскопом и наблюдают за состоянием сперматозоидов на границе раствора и спермы, а также в растворе и в сперме.

Изучение действия рН среды. Если сперму быка или барана хранить при комнатной температуре, то в результате гликолиза накапливается молочная кислота, буферные свойства спермы ослабевают, а затем показатель рН начинает снижаться. Подвижность сперматозоидов замедляется, а затем приостанавливается полностью вследствие наступления состояния анабиоза. Тормозится подвижность сперматозоидов и в гипертонических солевых растворах. При повышении рН и температуры среды, или при добавлении воды в гипертонический раствор сперматозоиды восстанавливают свою подвижность.

Для перевода клеток в активное состояние температура должна быть тем выше, чем ниже рН. Так, в слабощелочной среде (рН 7,6) сперматозоиды двигаются при температуре 15-20°C, а при рН 6,0 движение их проявляется только при 35-40°C. При рН 4,5 одного повышения температуры уже недостаточно, чтобы вывести сперматозоидов из анабиоза; требуется одновременное повышение температуры и подщелачивание среды. Длительное воздействие на сперматозоидов среды с более низким значением рН приводит к их гибели. Слабые органические кислоты проявляют губительное действие и при рН выше 5. Так, при температуре 4°C молочная кислота может необратимо иммобилизовать сперматозоидов уже при рН 6.

Сразу же после получения из неразбавленной спермы готовят несколько мазков. На одном предметном стекле помещают две капельки спермы. Рядом с одной капелькой помещают капельку 1%-ного раствора молочной кислоты и обе капельки накрывают покровным стеклышком. На другую капельку спермы наносят такую же капельку кислоты и обе капли смешивают стеклянной палочкой. При помощи универсального индикатора определяют рН смеси: оранжевая или желто-оранжевая окраска капли свидетельствует о том, что рН ниже 6,0. После этого просматривают под микроскопом мазок на границе раствора кислоты и спермы и наблюдают за гибелью сперматозоидов после попадания их в раствор кислоты.

На другое предметное стекло также наносят две капли спермы. Рядом с одной помещают капельку подкисленного физиологического раствора (к 10 мл 1%-ного раствора натрия хлорида приливают 2 мл 1%-ного раствора молочной кислоты) и обе капли накрывают покровным стеклом. На другую

каплю спермы наносят каплю подкисленного физиологического раствора и обе капельки смешивают. При помощи индикатора определяют рН смеси - показатель рН около 6,0. Мазок исследуют под микроскопом сначала при температуре 20-25°C, а затем на обогревательном столике при 38°C. При комнатной температуре сперматозоиды будут неподвижны, но после подогревания некоторые из них могут возобновлять движения.

На третье предметное стекло также наносят две капли спермы. Рядом с ними помещают по капельке подкисленного физиологического раствора и по 1-2 капельки натрия цитрата. Первые три (четыре) капельки смешивают, накрывают покровным стеклом и исследуют под микроскопом, а другие три (четыре) капельки после смешивания используют для определения рН смеси. После добавления натрия цитрата рН смеси приобретает щелочную реакцию (желто-зеленая или зеленая окраска). Подвижность сперматозоидов в такой смеси может быть достаточно активной.

Изучение действия антисептических растворов. Пункты (лаборатории) по искусственному осеменению нередко расположены вблизи ветеринарных аптек, где могут храниться различные дезинфицирующие вещества. На сперматозоидов они действуют губительно. Это относится и к моющим средствам: даже следы мыла на руках или на посуде проявляют на половые клетки губительное действие.

В процессе занятия целесообразно изучить действие на сперматозоидов ряда дезинфицирующих средств. Из неразбавленной или разбавленной спермы готовят несколько мазков. На одно предметное стекло наносят 2-3 капельки спермы. Рядом с каждой капелькой ее помещают по одной капельке какого-либо раствора: марганцевокислого калия 1:2000, лизола 1%-ного, спирта 70%-ного, йода 5%-ного, мыльной воды и т.д. и каждую пару капелек накрывают покровным стеклышком. Все три мазка исследуют под микроскопом и наблюдают за состоянием сперматозоидов на границе раствора и спермы, а также в растворе и в сперме.

Контроль осмотического давления и рН сред для разбавления спермы). Осмотическое давление определяют методом криоскопии, рН - потенциометрическим методом с помощью соответствующего прибора.

Криоскоп имеет внутреннюю пробирку (цилиндр на 100 мл без основания, с плоским дном), в которую вставляется резиновая пробка. Пробка имеет центральное отверстие для термометра Бекмана и небольшое отверстие в боковой части с металлической втулкой, через которую проходит проволочная мешалка; в процессе работы втулку смазывают капелькой машинного масла. Внутренняя пробирка с термометром Бекмана и мешалкой вставляется в более широкую пробирку (цилиндр на 250 мл без основания, с плоским дном) и укрепляется в ней посредством широкого (4-5 см) толстого резинового манжета. Широкая пробирка служит воздушной рубашкой для внутренней пробирки. Собранный прибор погружают через отверстие в крышке с резиновой втулкой в толстостенный стакан (высота 200 мм, внутренний диаметр 115-120 мм). Предварительно стакан заполняют охлаждающей смесью, состоящей из мелко раздробленного льда или снега и соли в весовом отношении 5:1. Температура охлаждающей смеси должна поддерживаться на 3-5°C ниже температуры замерзания синтетической среды путем добавления льда или снега. Причем смесь льда (снега) и соли периодически перемешивается проволочной мешалкой, которая вставляется через боковое отверстие в крышке сосуда.

Термометр Бекмана имеет два резервуара ртути: основной нижний и дополнительный в верхней части; оба резервуара соединены между собой капилляром; при необходимости можно ртуть перемещать из

одного в другой. Возможность перераспределения ртути в резервуарах позволяет настроить термометр так, чтобы температура замерзания растворителя (воды) лежала в верхней части шкалы.

Основная шкала термометра длинная - около 25 см и разделена на 5-6°C, цена деления 0,01°. На шкале с помощью лупы можно делать отсчет с точностью до 0,001-0,002°C.

Перед работой необходимо настроить термометр, т. е. установить измеряемую температуру замерзания дистиллированной воды таким образом, чтобы при 0°C ртуть находилась в верхней части шкалы, примерно между делением 3 и 5. До начала настройки следует убедиться в том, что нижний резервуар при комнатной температуре полностью заполнен ртутью.

В стакан емкостью 200-250 мл наливают 150-200 мл дистиллированной воды и, добавляя кусочки льда, охлаждают до 2-3°C; контролируют температуру обычным термометром. В термометре Бекмана нагревают рукой ртуть в нижнем резервуаре и следят, чтобы она заполнила до верха капилляр, после чего термометр переворачивают вверх нижним резервуаром. Продолжая нагревать резервуар добиваются соединения столбика ртути с ртутью верхнего резервуара. После этого осторожно и плавно, чтобы не разорвать столбик ртути в капилляре, придают термометру обычное вертикальное положение и погружают нижний резервуар в подготовленную охлажденную воду. Выдерживают 3-5 мин., постоянно помешивая термометром (резервуаром) в воде кусочки льда. Затем осторожно вынимают термометр и резко опускают нижним резервуаром на ладонь руки. Столбик ртути должен оборваться между значениями шкалы 3 и 4. Если столбик оборвался выше, то подогреванием резервуара рукой смещают столбик ртути за изгиб капилляра к верхнему резервуару и пытаются оборвать столбик в небольшом расширении капилляра верхнего резервуара. Затем быстро помещают термометр в охлажденную воду. При температуре 2-2,5°C столбик ртути должен находиться между делением шкалы 4,5 и 5°C (при 0°C - между 3 и 4,5°C). После настройки термометр закрепляют с помощью штатива в вертикальном положении в стакане с охлажденной водой. Пробка с проволочной мешалкой должна постоянно оставаться на термометре (при неосторожном вставлении настроенного термометра в центральное отверстие пробки можно разорвать столбик ртути).

Для того чтобы определить температуру замерзания среды для разбавления спермы (и по ней вычислить осмотическое давление) необходимо сначала определить точку замерзания дистиллированной воды по шкале настроенного термометра. Для этого во внутреннюю пробирку криоскопа наливают 30 мл дистиллированной воды и помещают пробирку в охлаждающую смесь; охлаждают в течение нескольких минут до 1-3°C. Температуру контролируют обычным термометром. Пробирку извлекают из охлаждающей смеси, высушивают снаружи фильтровальной бумагой и закрепляют в наружной пробирке. Стенки внутренней пробирки не должны соприкасаться с стенками наружной пробирки. Соединенные обе пробирки вставляют через отверстие в крышке в сосуд (стакан) с охлаждающей смесью. Затем во внутреннюю пробирку вставляют настроенный термометр с пробкой и проволочной мешалкой и укрепляют его с помощью штатива. Основной резервуар с ртутью термометра должен быть полностью погружен в дистиллированную воду, но не касаться дна. По термометру Бекмана наблюдают за понижением температуры воды. Так как охлаждение дальнейшее ее идет медленно, вода переохлаждается и не замерзает ниже точки ее замерзания (0°C). Столбик ртути медленно опускается. Для равномерного охлаждения воды ее постоянно помешивают проволочной мешалкой. Наступает момент, когда в переохлажденной воде начинается процесс кристаллизации. При этом выделяется скрытая теплота отвердевания и температура быстро повышается (температурный скачок). Воду продолжают помешивать и с помощью лупы наблюдают, когда столбик ртути полностью остановится. Это и будет точкой замерзания воды (например: 4,12₃. Последняя цифра приблизительная. Для получения точного результата определяют температуру замерзания воды два-три раза.

После этого осторожно извлекают термометр Бекмана из пробирки и помещают его в стакан с охлажденной до 2-3°C водой. Во внутреннюю пробирку криоскопа вместо дистиллированной воды наливают 30 мл охлажденной среды для разбавления спермы (без глицерина) и затем в нее вставляют термометр Бекмана. Процедуру охлаждения среды до замерзания осуществляют также, как и воды. После температурного скачка фиксируют на шкале термометра точку замерзания среды (например: 3,56₂).

Разница между первым числом (4,12₃) и вторым (3,56₂) укажет на фактическую точку замерзания среды - она будет равна 0,561°C. Для определения осмотического давления в милли осмомолях необходимо это число разделить на 0,00186. В данном случае осмотическое давление составит 301. При этом принимается во внимание, что одна осмомоля соответствует депрессии 1,86°C, а милли осмомоля - 0,00186°C.

Концентрацию водородных ионов (рН) в среде определяют при помощи рН-метров согласно наставлениям по применению приборов.

ХРАНЕНИЕ СПЕРМЫ

Цель занятий: изучить технологию охлаждения, замораживания и хранения спермы при температуре 16-20°C, 2-4°C и минус 196°C; приобрести навыки практического использования спермы, сохраняемой при различных условиях.

Объекты исследования, материалы и оборудование: разбавленная сперма быка (барана, жеребца, хряка); термоса, бытовой холодильник, сосуды Дьюара с канистрами или марлевыми мешочками, паллы (стаканчики) для соломин, металлическая воронка для сбора гранул, лопатка для съема гранул с пластины, корнцанги и пинцеты, фторопластовые пластины; лед, жидкий азот; синтетические соломины (пайеты) для расфасовки спермы, стеклянные шарики для укупорки соломин, вакуумный насос, машины для маркировки (М6-ММС-2 или М6-ММС-3), наполнения и укупорки соломин (М6-АПА); прямоугольная теплоизолированная емкость (30 · 40 · 30 см) или широкогорлый цилиндрической формы сосуд Дьюара; оборудование для замораживания спермы в облицованных гранулах; биотермостаты, микроскопы, подогревательные столики; бюретка с резиновой трубкой, зажимом и стеклянным наконечником для дозирования спермы или автоматическое устройство для расфасовки спермы при замораживании в гранулах.

Методические указания. Занятия проводят в лаборатории кафедры или в учебном пункте. Сначала преподаватель знакомит студентов со способами и оборудованием для расфасовки, охлаждения и замораживания разбавленной спермы, условиями ее хранения, правилами подготовки и последующего использования для осеменения животных. Затем вместе со студентами расфасовывают сперму, охлаждают и упаковывают в термоса для хранения или замораживают и помещают на хранение в сосуд Дьюара. После этого каждый студент должен выполнить процедуру оттаивания замороженной в гранулах и соломинах спермы.

Вопросы:

1. Сперма каких животных храниться при температуре, близкой к 0 °С? Какие среды для разбавления используются?
2. Какое оборудование необходимо для хранения спермы при температуре 2-4 °С?
3. Сперма каких животных и в течение какого срока храниться при комнатной температуре? Каков принцип краткосрочного хранения и какие среды используются?
4. Каковы преимущества хранения спермы при низкой температуре (минус 196 °С)?
5. Какие среды применяют для разбавления и замораживания спермы быка, барана, жеребца?
6. Каковы преимущества двух фракционных сред и какие из них наиболее часто применяют?
7. Какие внутриклеточные процессы происходят в сперматозоидах при замораживании? Какова роль криопротектора (глицерина) при замораживании спермы?
8. Для чего необходима эквilibрация спермы после финального разбавления? Сущность этого процесса и при какой температуре он протекает?
9. Как расфасовывается сперма перед замораживанием?
10. Какое оборудование необходимо для расфасовки, замораживания и упаковки спермы?
11. Как храниться замороженная сперма в племпредприятии, на фермах?
12. Какие термоса используются для перевозки спермы?
13. Как часто необходимо пополнять азотом сосуд Дьюара? Какие меры предосторожности необходимо соблюдать при работе с такими сосудами?
14. Как оттаивают сперму, замороженную в гранулах и соломинах? Какое оборудование необходимо для оттаивания?
15. В течение какого времени необходимо использовать оттаянную сперму?

В настоящее время сперму производителей сельскохозяйственных животных хранят в течение одного - трех дней или длительное время в замороженном состоянии. При краткосрочном хранении при температуре +2...4°C сперму быков используют в течение 72 часов, жеребцов - до 48 час. и баранов - в течение 24 часов. Хранят сперму в холодильниках или пищевых термосах со льдом.

Сперму хряков сохраняют одни - двое суток при температуре +16...20°C, используя для хранения и транспортировки термосы-ящики.

Для хранения спермы производителей в течение длительного времени без потери оплодотворяющей способности применяют замораживание ее в жидком азоте при -196°C.

Хранение спермы при температуре 16-20°C

Хранение спермы хряка. Для разбавления и хранения спермы хряка при температуре 16-20°C в течение трех суток применяют синтетические среды ГХЦС и ГХЦ. Разбавляют сперму через 20-30 минут после получения и определения ее качества. Для разбавления используют эякуляты с концентрацией сперматозоидов не менее 100 млн. в 1 мл спермы. Степень разбавления варьирует от 1:1 до 1:9. После разбавления в 1 мл спермы должно содержаться около 30-50 млн. сперматозоидов, а в дозе для осеменения (100-150 мл) - не менее 3 млрд. клеток. Разбавленную сперму расфасовывают в стеклянные колбы или полиэтиленовые флаконы и хранят в темноте при температуре 16-20°C в стерильном боксе-термостате или в специальных термосах для хранения и транспортировки. Колбы прикрывают не герметично целлофаном или пергаментной бумагой без закрепления резиновыми кольцами. На флаконы слегка навинчивают крышки. Во время хранения сперму осторожно перемешивают не менее двух раз в сутки. При хранении и транспортировке необходимо строго следить за температурным режимом. Отклонение температуры от оптимальной (16-20°C) отрицательно влияет на оплодотворяющую способность спермы.

Хранение спермы при температуре 2-5°C (6-10°C)

Хранение спермы быка. Сперму, сохраняемую при 2-5°C, фасуют в одноразовые стерильные полиэтиленовые ампулы, полиэтиленовые пробирки объемом по 1 мл или во флаконы из под антибиотиков; их наполняют полностью. Полиэтиленовые ампулы запаивают, а пробирки и флаконы закрывают стерильной нетоксичной пробкой, закрепляют пробку резиновым кольцом. На каждой ампуле заранее пишут тушью номер быка и дату взятия спермы. На стеклянные флаконы наклеивают бумажные этикетки. Подготовленные флаконы и ампулы со спермой оставляют при комнатной температуре (18-25°C) на 20-30 минут, упаковывают и помещают в холодильник при температуре 2-5°C или в пищевые термоса со льдом.

Быстрое охлаждение разбавленной спермы не желательно. Поэтому целесообразно, чтобы понижение температуры от 32°C до 2-5°C происходило постепенно в течение 2-3 час. Для этого сначала необходимо поместить разбавленную сперму в стеклянный стакан или ванночку с водой такой же температуры, как и температура спермы (32°C), а затем перенести их в водяную баню температуры 22°C на 20 минут, после чего производить фасовку и дальнейшее охлаждение спермы. Хранят в течение трех дней. Используют сперму с активностью не ниже 7 баллов.

Хранение спермы барана. При искусственном осеменении овец широко используют свежеполученную неразбавленную сперму, которая обеспечивает наиболее высокую оплодотворяемость маток. Разбавление и хранение спермы несколько ухудшает результаты. Однако рациональное использование ценных производителей легче достигается при условии разбавления и хранения спермы.

Для разбавления и хранения спермы при температуре не ниже 0°C используют синтетические среды ГЦЖ и ГФЖ. Разбавляют сперму в соотношении 1:1 - 1:2 при температуре 25-30°C. После разбавления сперму можно использо-

вать для осеменения в течение 4 часов, если хранить ее при температуре не ниже 16°C. Если же сперму охлаждают до 2-5°C, то срок хранения увеличивают до 24 часов. Хранят ее в пищевых термосах со льдом. Перед помещением в термос флаконы со спермой обвертывают ватой или вставляют в гнезда в специальных поролоновых амортизаторов и затем упаковывают в полиэтиленовые мешочки. Мешочки кладут на лед в термос, а сверху их также помещают небольшое количество льда.

Хранение спермы жеребца. Для разбавления и краткосрочного (в течение 48 часов) хранения спермы при температуре 2-5°C используется среда ЛХЦЖ. Разбавляют свежеполученную сперму с подвижностью сперматозоидов не ниже 6 баллов и концентрацией 150 млн. в мл в соотношении 1:3; температура среды в момент разбавления должна быть 25-30°C. Расфасовывают сперму в стерильные флаконы емкостью 50-100 мл с притертыми пробками; пробки закрепляют резиновыми кольцами. Флаконы со спермой заворачивают в марлевые салфетки или бумагу и упаковывают в полиэтиленовые пакеты. Пакеты со спермой помещают в термос со льдом. Охлаждение спермы должно проходить постепенно. Поэтому особое внимание уделяют подготовке термосов и теплоизоляционных прокладок; лед в термос помещают в полиэтиленовых мешочках. Более надежно использовать специальный термос (рис. 36). Он состоит из оцинкованного железного бачка и двухстенного теплоизоляционного фанерного футляра с крышкой. В бачке по бокам расположены две емкости для загрузки льдом, а посередине его - емкость цилиндрической формы для баночек со спермой, где температура сохраняется на уровне 2-5°C.

Хранение спермы хряка. При необходимости хранения спермы при температуре 5-10°C (но не ниже 5-6°C) к 1 л среды добавляют 30-40 мл желтка куриных яиц. После разбавления ГХСЦ или ГХЦ средой с желтком сперму хряка хранят в термосах со льдом. Тающий лед кладут на дно термоса, примерно одну четверть объема, покрывают влагонепроницаемым материалом, а сверху настилают сухую серую вату слоем 1-1,5 см. На такую прокладку помещают флаконы со спермой. При таких условиях достигается близкая к рекомендуемой скорость охлаждения: около 4-5°C в час до 18°C и 2°C в час до 6-10°C. Весь период охлаждения длится 7-8 часов. Флаконы должны быть заполнены не полностью. Один раз в день сперму слегка взбалтывают.

Замораживание и хранение спермы.

Замораживание спермы быка в гранулах. Разбавленную сперму выдерживают в холодильнике при температуре +2...4°C в течение 4-5 часов.

В теплоизолированную емкость или широкогорлый сосуд Дьюара наливают на $\frac{2}{3}$ жидкий азот. Фторопластовую пластину обтирают спиртовым тампоном, опускают в жидкий азот и охлаждают в течение нескольких минут до прекращения кипения азота. Затем пластину держателем поднимают к верхнему краю сосуда и после испарения азота протирают сухим стерильным ватным тампоном. С помощью бюретки, шприца или автоматического устройства разливают сперму в лунки пластины (рис. 37). Пластина в это время должна иметь температуру минус 160...170°C. После того, как в по-

следней лунке сперма затвердеет, пластину опускают ближе к жидкому азоту и выдерживают на расстоянии 5-10 см от поверхности азота в течение 1-2 минут. Далее пластину погружают на 1 минуту в жидкий азот, где происходит дальнейшее охлаждение гранул и отделение их от пластины. Затем пластину поднимают из жидкого азота до верхнего уровня сосуда, с помощью лопатки и воронки сгребают гранулы в охлажденный контейнер и переносят в сосуд Дьюара на длительное хранение.

Замораживание спермы быка в полипропиленовых соломинках. После финального разбавления спермы ЛГЖ средой при температуре 18-20°C сперму расфасовывают в стерильные полипропиленовые соломины внутренним диаметром 2 мм, емкостью 0,25 мл. Соломины должны быть промаркированы. Это делается на машине М6-ММС-2 с помощью сменяемого клише, изготовляемого для каждого быка, или М6-ММС-3 кодовой надписью набираемых цифр. На соломинке печатается наименование племпредприятия (первые 3 цифры), порода быка (две последующие цифры), номер быка (пять цифр), а затем последовательно по две цифры год, месяц и день получения спермы.

Маркированные соломины в коробках помещают в настольную бактерицидную камеру и стерилизуют в течение двух часов.

Для автоматического наполнения соломин разбавленной спермой и их закупорки имеется специальная машина М6-АПА (рис. 38). В коробку машины помещается 700 соломин, а в ее бункерочек - 6000 стеклянных шариков. До использования стеклянные шарики выдерживают сутки в растворе соляной кислоты (10 мл концентрированной кислоты на 1 л дистиллированной воды), промывают проточной водой, затем 3-4 раза дистиллированной водой и засыпают на сито с отверстиями 1,7 x 2,0 мм, чтобы удалить обломки. Высушенные шарики помещают в стеклянную банку и стерилизуют в сушильном шкафу при температуре 180°C в течение 1,5 ч.

Перед работой корпус машины протирают марлевой салфеткой; детали, непосредственно соприкасающиеся с соломинами и стеклянными шариками (бункера для шариков и соломин, укупориватели), обрабатывают спиртовым тампоном. Наконечники и сопла, медицинские поливинилхлоридные трубки и уплотнители стерилизуют кипячением.

Коробку с маркированными стерильными соломинами фиксируют рычагом у механизма подачи их на барабан, подсоединяют поливинилхлоридную трубку с соплом для подачи спермы, конец трубки с надетым наконечником погружают в емкость с разбавленной спермой. После включения машины сперма нагнетается в соломинку с обеих сторон и закупоривается двумя стерильными цветными стеклянными шариками. В процессе работы следят, чтобы столбик воздушного пузырька был длиной 5-12 мм, а стеклянные шарики заталкивались на глубину 1,5-2 мм.

Наполненные спермой соломины берут в руку воздушными пузырьками вниз и встряхивают несколько раз для того, чтобы пузырьки перемести-

лись на середину. После этого соломины раскладывают по 143 шт. в металлические рамки и сверху прижимают держателем; рамки кладут одна на другую по 5 штук, помещают в коробку и ставят в холодильник ХЖС-300, в котором поддерживается температура около 4°C. В холодильнике сперма постепенно и равномерно охлаждается до температуры 4°C в течение часа (со скоростью 0,3-0,5°C в минуту). Выдерживают сперму при такой температуре в течение 3-4 часов и потом замораживают в биологических хранилищах на замораживающем устройстве - медном щите, который закрепляют на расстоянии 6-8 см от поверхности жидкого азота.

Для поддержания стабильной температуры на щите (минус 130...150°C) после загрузки рамок с соломинами и обеспечения оптимальной скорости замораживания спермы необходимо под давлением 0,2-0,3 атм. подавать газообразный азот с вентиля газосброса транспортной цистерны. Конец шланга должен лежать на дне биологического хранилища. Если замораживание производится без обдува, тогда щит замораживающего устройства должен касаться поверхности жидкого азота.

Замораживание спермы ведется в течение 7 мин. После этого соломины переносят с помощью специальной воронки в пластмассовые стаканы, наполненные жидким азотом и закрепленные в гнездах щита замораживающего устройства. Затем стаканы с соломинами быстро переносят в подготовленные канистры и размещают их в биологических хранилищах ХБ-0,5 или ХБ-0,2-1.

Зарубежные организации по искусственному осеменению используют высокотехнологичное оборудование (MINITUB) для маркировки соломин, наполнения и закупорки их стеклянными шариками или по методу Кассу, для автоматического контроля замораживания и упаковки замороженных соломин (рис. 39).

Замораживание спермы барана. Разбавленную сперму охлаждают в течение 2-3 часов до +2...4±2°C. При этом флаконы (полиэтиленовые капельницы) со спермой погружают в кювету с теплой (20...25°C) водой и ставят в бытовой холодильник. После охлаждения кювету с флаконами погружают в тающий лед до момента замораживания спермы.

Сперму замораживают на поверхности сухого льда или на охлажденной до минус 80°C фторопластовой пластине. Для обеспечения такой температуры пластину после охлаждения в жидком азоте поднимают и устанавливают с помощью штатива на уровне верхнего края широкогорлого сосуда и выдерживают 4-6 минут. После этого в лунки пластины накапывают сперму по 0,2 мл. Как только сперма затвердеет, пластину опускают ниже и выдерживают над поверхностью жидкого азота на расстоянии 3-5 см в течение 1,5-2,0 минут, а затем погружают на 1 минуту в жидкий азот. После окончания замораживания пластину извлекают из азота и собирают гранулы в алюминиевые тубы или мешочки из тонкой алюминиевой фольги. Емкости должны быть промаркированы. Замороженную сперму помещают в сосуд Дьюара на карантинное хранение на 28 дней.

Замораживание спермы жеребца. Для замораживания и длительного хранения в жидком азоте сперму разбавляют ЛХЦЖ средой с добавлением глицерина. Разбавляют также в соотношении 1:3, в один прием. Разбавленную сперму объемом не более 100 мл при высоте слоя 2,5 см в колбе выдерживают в холодильнике 2 часа и замораживают на поверхности сухого льда или в алюминиевых пакетах в парах жидкого азота. При замораживании в форме гранул сперму наносят каплями по 0,2 мл в лунки на поверхность сухого льда; выдерживают в течение 5 минут, после чего гранулы собирают и упаковывают в алюминиевые тубы или

пластмассовые стаканы и помещают на хранение в жидкий азот. В каждой упаковке должно быть 125-130 гранул, что составляет около 25 мл оттаянной спермы.

При использовании алюминиевых туб (пакетов) в зависимости от их величины сперму расфасовывают по 25 мл или 13 мл. В обоих случаях толщина пакета со спермой не должна быть больше 4-5 мм. Перед использованием пакеты охлаждают, а после заполнения спермой осторожно вытесняют из них воздух и концы закатывают дважды. Пакеты со спермой помещают в специальные держатели с пенопластовыми поплавками и переносят в широкогорлый сосуд Дьюара. Выдерживают в течение 5-7 минут в парах жидкого азота, на расстоянии 10-12 мм от его поверхности. После этого пакеты помещают в жидкий азот на хранение.

При замораживании спермы и в гранулах и в пакетах в одной дозе (125-130 гранул, один пакет объемом 25 мл или 2-3 пакета по 13 мл) должно содержаться около 800 млн. сперматозоидов, а после оттаивания - 300-400 млн. подвижных клеток.

Для хранения спермы на пунктах искусственного осеменения используют узкогорлые сосуды Дьюара различной емкостью — 5, 20, 50 и 500 литров (рис. 40). Сосуд изготовлен из нержавеющей стали, двустенный. Межстенное пространство заполнено порошковой или порошково-вакуумной термоизоляцией. На горловине сосуда подвешиваются металлические канистры или марлевые мешочки для спермы. Крышка сосуда имеет пенопластовую втулку, которая размещается в горловине. Чтобы температура спермы во время хранения не повышалась, в сосуде любого типа должно оставаться не менее 30-40% жидкого азота (от полной емкости), поэтому сосуд необходимо регулярно (через 30-40 суток) пополнять азотом.

Оттаивание спермы

Оттаивание спермы в гранулах. Для оттаивания необходимы ампулы с 1 мл 2,9%-ного раствора натрия цитрата и водяная баня (биологический термостат, оттаиватель) с контролируемой температурой 38-40°C. Приборы подключаются к электрической сети, но многие зарубежные образцы имеют автономный источник питания (рис. 41).

Сначала необходимо включить в сеть оттаиватель и довести температуру воды до 38-39°C. После этого берут ампулу с натрия цитратом и у основания шейки делают круговой надрез пилкой по стеклу. Надпиленный участок протирают спиртовым тампоном и отламывают верхнюю часть ампулы. Если отверстие недостаточно для прохождения гранулы, то его расширяют путем откалывания стерильным пинцетом небольших участков стекла. Для этого одну ветвь пинцета вставляют в ампулу, по кругу продвигают пинцет и обламывают стекло. Ампулу с цитратом натрия помещают в водяную баню заблаговременно (за 3-5 минут) для подогрева. Корнцанг для извлечения спермы обтирают спиртовым тампоном и опускают в сосуд Дьюара для охлаждения. После чего извлекают гранулу из сосуда и помещают в ампулу с цитратом натрия (находящуюся в водяной бане). Дождавшись момента полного растворения гранулы, ампулу извлекают из водяной бани. Размороженная сперма должна быть использована в течение 15 минут.

Оттаивание спермы в соломинах. Стерильным, охлажденным корнцангом извлекают соломинку из сосуда Дьюара, легко встряхивают ее и быстро помещают в водяную баню или оттаиватель с температурой 38°C на 10-11 секунд. В водяной бане соломинку удерживают в вертикальном положении и постоянно перемещают в воде. После размораживания сперма должна быть использована в течение 15 минут.

При плохой герметичности соломин в период нагревания их в результате быстрого испарения жидкого азота резко повышается давление, что приводит к разрыву оболочки соломины.

Перевозка спермы

Перевозят сперму с племпредприятия в районные станции или на пункты искусственного осеменения на специально оборудованных машинах. Нередко сочетают доставку азота и спермы. Сосуды Дьюара или емкости, заполненные жидким азотом, необходимо надежно закрепить на транспортном средстве. Сосуды, которые предполагается транспортировать самолетом, надо заполнять не более чем на половину емкости.

Транспортируют сперму хряка в специальных термосах (рис.), бытовых сумках-холодильниках, термосах-ящиках, в которых для теплоизоляции применяется поролон. На период транспортировки колбы и флаконы плотно укупоривают, а после доставки на пункт ослабляют резиновые кольца, фиксирующие бумагу на кольцах, или расслабляют крышки флаконов. Сперму транспортируют через 30 минут после разбавления. Допускается кратковременное (1-3 часа) постепенное снижение температуры до 14-15°C или повышение до 24°C.

Техника безопасности при работе с жидким азотом

Жидкий азот - прозрачная, бесцветная, легко испаряющаяся жидкость; удельный вес 0,8 кг/л, кипит при температуре минус 196°C. Не токсичен, однако в результате испарения и накопления его в помещении содержание кислорода в воздухе уменьшается, что может вызывать у людей головную боль, головокружение и даже потерю сознания. При попадании на открытые участки тела вызывает обморожение (ожог).

Помещение, в котором находятся сосуды Дьюара или стационарные хранилища с жидким азотом, должно быть оборудовано приточно-вытяжной естественной или принудительной вентиляцией. Курение в таком помещении категорически запрещается. Температура жидкого азота поддерживается на постоянном уровне (- 196°C) в результате его непрерывного испарения. Поэтому горловина сосуда Дьюара не должна быть плотно закрыта, особенно при перевозке. Персоналу, работающему с азотом, следует закрывать горловину сосуда Дьюара крышками, предназначенными только для них. Если плотно закрыть сосуд, то возможен взрыв его. Не допускается эксплуатация сосудов у которых верхняя часть горловины обрастает льдом.

При длительной эксплуатации сосудов Дьюара приходится постоянно доливать жидкий азот, в котором имеются примеси кислорода. Кислород кипит при более высокой температуре - минус 183°С. Поэтому концентрация его в сосуде постепенно возрастает и остающаяся смесь газов становится огнеопасной. Племпредприятия должны контролировать содержание кислорода в сосудах и при достижении содержания его 15% перенести сперму в другой сосуд, а из контролируемого слить остатки азота вдали от предметов органического происхождения (дерева, бумаги, тряпок, особенно промасленных) и наполнить его свежим азотом. Во избежание взрыва запрещается удалять обогащенную кислородом жидкость из сосуда путем выпаривания.

Работать с жидким азотом необходимо в защитных очках и свободных кожаных рукавицах, чтобы при необходимости их можно было легко сбросить. Брюки должны быть без манжет и прикрывать верхнюю часть обуви. Если жидкий азот попадает на незащищенную кожу, ее следует обмыть водой. Особую осторожность следует соблюдать при оттаивании спермы, замороженной в соломинах. При плохой герметизации и быстром испарении азота в период нагревания может резко повыситься давление в соломине, что приведет к разрыву ее оболочки.

При заправке сосудов или биологических хранилищ азотом гибкий шланг опускают до дна заправляемой емкости, чтобы предупредить выброс конца шланга из горловины сосуда и попадание азота на стоящих рядом людей. Заливать азот в сосуд надо медленно.

Если при испытании сосуда Дьюара обнаруживается нарушение теплоизоляции - утрата вакуума (покрыт вблизи горловины слоем инея), его запрещается оставлять на обогрев в помещении, где могут находиться люди. Необходимо после слива азота поместить сосуд на 3-5 суток в изолированном помещении.

ОСЕМЕНЕНИЕ САМОК СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

Цель занятий: приобретение студентами практических навыков диагностики течки, полового возбуждения, охоты и овуляции и освоение техники осеменения самок сельскохозяйственных животных и птиц существующими способами;

ознакомление студентов с методами подготовки самцов-пробников.

Объекты исследований, материалы и оборудование: животные в охоте - корова, кобыла, коза (овца), свинья; самцы-пробники; станки, случная шлейка, веревки для фиксации животных; половые органы убитых самок и самцов; муляжи, рисунки, слайды; термоса или сосуды Дьюара с сохраняемой спермой; микроскопы, обогревательные столики, предметные и покровные стекла, чашки Петри; дозаторы пипеточные (глазные пипетки) или стеклянные палочки; инструмент для осеменения (шприцы ШО-3, ШО-4 и чехлы полиэтиленовые к ним, перчатки полиэтиленовые пятипалые и трехпалые; влагалищные зеркала с осветителем или специальные расширители, ложка Фолькмана; шприцы-катетеры, стеклянные баночки с стерильным физиологическим раствором и 70%-ным спиртом, спиртовые тампоны, сухие ватные тампоны; пипетки полистироловые одноразовые и полиэтиленовые шприцы с соединительной муфтой; катетеры и ампулы полиэтиленовые; микро-шприцы для осеменения овец, шприц полуавтомат; резиновый катетер с ампулой (шприцем) для осеменения кобыл; приборы УЗК-5 и ПОС-5; металлические или пластмассовые подставки для инструмента; полотенце, вата серая и вата белая, марлевые и бумажные салфетки; пинцеты и корнцанг, ножницы прямые и Купера; набор хирургических инструментов; раствор йода, раствор фурацилина, стреп-

тоцид, смесь антибиотиков, коллодий, обезболивающие средства; мыло, кюветы, тазы, кружка Эсмарха, ведра.

Методические указания. Проводят несколько занятий в акушерской клинике, в учебном пункте и затем на фермах. На первом занятии (4 ч.) в клинике (в учебном пункте) преподаватель объясняет и демонстрирует студентам на муляжах, рисунках, фантомах, животных технику искусственного осеменения коров различными способами; знакомит с инструментом для осеменения и способами обеззараживания и подготовки его для использования. Затем студенты самостоятельно готовят инструмент и выполняют процедуру осеменения на подопытных животных, которых содержат на кафедре. Для освоения способов осеменения коров каждый студент обязан выполнить процедуру осеменения каждым способом под контролем преподавателя хотя бы на одном животном. На последующих двух-трех занятиях (по 2-4 ч.) на фермах студенты осваивают способы выявления животных в охоте и технику ректо-цервикального способа осеменения. В процессе таких занятий используются выбракованные небеременные животные. Студенты работают по парам. Каждой паре выделяется одна-две коровы. Справившись с заданием, пары меняются животными. Так за отведенное время каждый студент может ввести пипетку в шейку матки четырем-шести животным.

Технику осеменения кобыл целесообразно изучить во время занятия, на котором получают сперму от жеребца. После получения и оценки качества спермы по густоте и подвижности, часть эякулята можно использовать для осеменения кобылы, на которую получали сперму.

Освоение техники осеменения свиней можно организовать на свиноводческом комплексе, одновременно продемонстрировав студентам и получение спермы от хряка в искусственную вагину или мануальным способом.

Технику осеменения овец изучают в клинике кафедры, или же в овцеводческом хозяйстве, если период учебных занятий совпадает с сезоном осеменения этих животных.

Отдельно планируется занятие по подготовке оперативными методами быков-пробников.

Осеменение коров и телок

Диагностика течки, половой охоты и овуляции.

Процесс введения спермы в половые пути самки является последним, очень важным этапом метода искусственного осеменения. Сперма должна быть введена в наиболее подходящее место и в оптимальное время в период половой охоты; поэтому своевременному выявлению животных в охоте должно уделяться большое внимание. Знание признаков (внешних проявлений) половой охоты и ее продолжительности, а также правильный выбор метода выявления этих признаков имеют большое значение.

Половая охота проявляется в фазу эструс, когда хорошо выражены и другие феномены полового цикла - течка и половое возбуждение. Длиться охота 12-18 часов, хотя может быть более продолжительной или слишком кратковременной.

Течка - процесс выделения слизи из половых органов как следствие морфологических изменений в половом аппарате самки. Характеризуется гиперемией трубчатых половых органов, новообразованием и разрастанием секреторных клеток и желез слизистой оболочки яйцепроводов, рогов, тела и шейки матки.

Наиболее заметным изменениям подвергаются эпителиальные клетки передней части влагалища и секреторные клетки шейки матки. В середине цикла клетки влагалища варьируют от уплощенных до низких цилиндрических. В стадии про-эструс происходит размножение и рост высоких цилиндрических слизеобразующих поверхностных клеток. В период эструса этот процесс усиливается, что приводит к сильному утолщению эпителия передней части влагалища. *За 12-24 часа до появления первых признаков*

охоты начинается обильная секреция слизи из передней части влагалища и шейки матки. Количество слизи *увеличивается в течение охоты* и затем *постепенно уменьшается к четвертому дню после охоты*. В конце течки слизь содержит хлопья из лейкоцитов; максимальная лейкоцитарная инвазия слизистой оболочки влагалища наблюдается через 2-5 дней после охоты. Эластичность слизи варьирует, максимальная она во время охоты. В связи с эластичностью изменяется и способность слизи к кристаллизации. Наиболее хорошо выражена кристаллизация во время охоты и в течение двух последующих дней, а в другое время отсутствует. Под микроскопом в мазках кристаллы слизи расположены в виде листка папоротника (рис. 3). Этот феномен (*арборизация*), также как количество и свойства слизи, зависит от уровня эстрогенов. В начале охоты слизь клейкая, прозрачная, светлая, а к концу охоты становится более вязкой. Период яркого проявления охоты характеризуется наименьшей вязкостью слизи и максимальным понижением электрического сопротивления ее, а также максимальным увлажнением слизистой оболочки преддверия влагалища. Этот период совпадает с оптимальным временем осеменения. В конце охоты по мере возрастания вязкости слизи увеличивается и электрическое сопротивление ее. Электропроводность слизи можно контролировать с помощью специальных приборов (рис. 42). Однако результаты использования величины электрического сопротивления слизи для определения оптимального срока осеменения не высоки. Это связано с недостаточным контактом датчика прибора со слизью в момент пробы, измерением сопротивления вскоре после мочеиспускания и др.

Диагностируют течку осмотром наружных половых органов, влагалища, шейки матки, исследованием выделяющейся из половых органов слизи, клиническими и лабораторными методами.

В мазке-отпечатке с боковой стенки преддверия влагалища в фазу проэструс обнаруживаются малые и большие промежуточные эпителиальные клетки, эритроциты, иногда лейкоциты. В фазу эструс преимущественно большие промежуточные эпителиальные клетки, безъядерные клетки или клетки вакуолизированные с небольшим пикнотическим ядром и эритроциты. Лейкоциты встречаются редко, только в начале эструса, а в конце этой стадии доминируют безъядерные эпителиальные клетки. В фазу мет-эструс в мазке обнаруживается много лейкоцитов, исчезают безъядерные клетки, уменьшается число больших промежуточных клеток, появляются парабазальные клетки и малые промежуточные эпителиальные клетки, которые в последующем становятся вакуолизированными. При анэструсе в мазке преобладают парабазальные и малые промежуточные эпителиальные клетки (рис. 3).

Половое возбуждение (общая реакция) - изменение в поведении самки, возникающее в связи с созреванием фолликулов. Проявляется позднее течки и характеризуется ярко выраженной общей реакцией организма в ви-

де беспокойства, отказа от корма, другими признаками. Самка проявляет "интерес" к самцу, может прыгать на него или других самок, но садку самца на себя не допускает.

Половая охота - строго специфическая, положительная сексуальная реакция самки на самца. Во время охоты самка стремится к самцу, принимает позу для полового акта, часто производит акт мочеиспускания, допускает садку и коитус. Половую охоту можно точно установить рефлексологическим методом, т.е. используя самца-пробника. Однако у коров и телок при контакте их с другими самками проявляются такие характерные для охоты признаки, которые позволяют практически безошибочно распознать ее. Знание этих признаков и умение их использовать помогают животноводам успешно организовать искусственное осеменение коров и телок без использования быков-пробников. Наиболее важными являются следующие признаки.

1. *Незадолго до начала охоты* корова обнюхивает и облизывает соседних коров, особенно их половые органы, а также подошедших близко людей. При этом спина впереди крестца выгибается, а затем сильно прогибается, хвост поднимается и опускается. Такое движение можно вызвать поглаживанием поясницы или прикосновением к вульве.

2. Слизистая оболочка преддверия влагалища припухшая, ярко розового или красного цвета, влажная и покрыта прозрачным секретом, который нередко вытекает из половой щели; поэтому пучок волос в нижнем углу вульвы всегда бывает влажным.

3. Постоянно переступает с ноги на ногу, а находясь в группе коров пытается приблизиться к другим животным в охоте (или не в охоте) и вспрыгнуть на них, иногда даже на человека.

4. *Корова в охоте* проявляет признаки общего возбуждения, чаще стоит; если кто-нибудь проходит сзади, она поднимает голову и провожает проходящего взглядом.

5. Глаза более живые, неподвижные и блестящие, зрачки расширены.

6. У некоторых коров охота сопровождается громким мычанием в течение нескольких часов или всего дня.

7. У многих животных наблюдается снижение удоя, но оно может пройти незамеченным; более обычным является затрудненное доение, так как корова задерживает молоко. Ослабевают деятельность рубца.

Если животные находятся в стаде, то признаки охоты выражены более отчетливо. Корова в охоте в 2-3 раза увеличивает двигательную активность (регистрируемую с помощью педометров), следует за другими животными и вспрыгивает на них, независимо от того, в охоте эти животные или нет. Наибольшая активность прыгать проявляется в конце про-эструса, в эструс и в начале мет-эструса. Если замечено, что корова повторяет прыжки, то следует продолжить наблюдение за ней, так как возможно наступление охоты.

ты. Но этот признак не является определяющим. Он может наблюдаться и у животных, не находящихся в охоте.

8. Более важным для выявления состояния охоты является поведение коровы в момент, когда на нее вспрыгивает другое животное: если она стоит спокойно или слегка уклоняется, то это указывает на наличие у нее охоты. В разгар охоты у коров проявляется, как правило, только такой типичный признак (*рефлекс неподвижности*) и лишь изредка - активный обнимательный рефлекс, но без совокупительных движений. В это время хорошо выражены и специфические изменения в наружных половых органах. Слизь вытекает в виде длинной вязкой нити, приклеивается к ягодицам и хвосту. Если животное лежало, то сзади его можно увидеть скопление мутноватой или голубоватого цвета слизи. У телок наблюдается и четкий подъем температуры во влагалище.

У животных с "тихой овуляцией" эти изменения также имеют место. Отмечается у них и возбужденное состояние, рев, попытки вспрыгивать на других коров. Но сами они не допускают садки других животных и не являются особо "привлекательными". При осеменении таких животных может произойти оплодотворение.

При контакте коровы в охоте с быком-пробником животные облизывают друг друга, после чего корова пытается вспрыгнуть на быка прежде, чем допускает садку сама. Если корова в охоте долгое время находилась в стаде, то вследствие садок других животных у нее стирается волос и появляются ссадины на корне хвоста и седалищных буграх. Эти признаки сохраняются 4-6 дней. Но если ссадины влажные с выделением экссудата или кожа болезненна и имеет повышенную температуру, то это говорит о том, что корова в охоте или охота только что прошла.

Иногда коровы в охоте следуют за другими коровами, с фырканьем обнюхивают их половые органы, опираются головой на поясницу, поднимают хвост и помахивают им. Нередко за такими коровами активно следуют другие животные.

После охоты (в течение 10 ч) у коров наблюдается выделение прозрачной слизи; в этот период животное не допускает на себя садку других животных.

Наблюдается повторяемость признаков проявления и длительности половых циклов у одного и того же животного в различные годы.

Для выявления охоты у коров целесообразно трехкратное в день наблюдение по 20-30 мин. до раздачи корма во время их движения. При беспривязном содержании животные должны быть помечены бирками или ошейниками с хорошо заметными номерами. На крупных фермах наблюдение можно проводить с помощью телеустановок. Очень важное значение имеет степень освещенности помещений, особенно в осенне-зимнее время. В случае планирования сроков осеменения после отела (через 40-45 дней) и предоставлении животным прогулок эффективно использование специаль-

ных детекторов (KaMaR), которые прикрепляются на крестце животного (рис. 42), а также пedomетров.

С целью более полного и своевременного выявления охоты у коров и определения оптимального времени их осеменения используют быков-пробников, а также специально подготовленных коров - выявительниц или натренированных собак.

Использование быков-пробников. Так как половая охота строго специфическая реакция самки на самца, то ее можно достоверно определить с помощью пробника. Без пробника при регулярном визуальном наблюдении за стадом пропуски половой охоты у коров достигают 20% и более. Бык-пробник не только безошибочно выявляет охоту, но является мощным естественным стимулятором, способствующим своевременному и полноценному проявлению половой цикличности после родов.

Способы подготовки быков-пробников. Пробников готовят из числа бычков в возрасте 8-10 мес., предназначенных для выращивания на мясо. Отбирают хорошо развитых, проверенных на инфекционные заболевания животных, проявляющих высокую половую активность. Подготовленных быков-пробников используют в течение 5-10 месяцев. На 150-200 коров достаточно иметь одного быка-пробника.

Предложено много оперативных способов подготовки быков-пробников. Ампутация пениса (пенектомия), фиксация пениса к брюшной стенке и частичное сужение отверстия препуция предотвращают выдвигание пениса, возможность осуществления коитуса и эякуляцию. Однако эти методы приводят к быстрому ослаблению, а затем и полной потере полового влечения (либидо). Отведение полового члена в сторону является более рациональным из оперативных методов на половом члене и препуции. Но наиболее распространенным в мире является способ подготовки пробников путем удаления участка спермиопроводов - *вазэктомия*.

Вазэктомия является самой простой и быстро выполнимой операцией, доступной в условиях любого хозяйства. В результате операции самец сохраняет способность к половому акту, но не может оплодотворить самку, так как эякулят содержит только секреты придаточных половых желез.

В физиологическом отношении вазэктомированные самцы - лучшие пробники. При их использовании у самок после полового акта укорачивается половая охота, ускоряется процесс овуляции, повышается сократительная функция матки и другие функции, что обуславливает повышение процента оплодотворения самок.

Существуют несколько способов вазэктомии быков, которые следует вначале отработать на свежих половых органах, а затем на животных. Впервые эту операцию описал А.Я. Краснитский (1946).

Способ Шупилова. Вазэктомию делают через один или два разреза. В отличие от способа А.Я. Краснитского разрезают переднюю (а не заднюю) стенку шейки мошонки. В этом случае не рассекаются волокна наружного

поднимателя семенника, что значительно облегчает нахождение и извлечение спермиопровода. Операцию у быка делают в возрасте 8-10 мес.

Бычка фиксируют в спинном положении и готовят операционное поле. Удаляют волосы, тщательно обмывают мошонку тёплой водой с мылом и обтирают чистой салфеткой. Семенники максимально отодвигают ко дну мошонки. Кожу шейки мошонки протирают 70%-ным этиловым спиртом. Место разреза смазывают дважды раствором йода. У быков длина разреза 5-6 см. Для обезболивания применяют 1%-ный раствор новокаина. После обезболивания разрезают кожу, рассекают мышечно-эластическую оболочку, фасцию и общую влагалищную оболочку. Затем указательным пальцем выводят наружу семенной канатик, высвобождают спермиопровод из брыжейки, накладывают на него лигатуру (ближе к паховому каналу) и иссекают участок не менее 2 см. После этого разрезают продольную перегородку мошонки, рассекают мышечно-эластическую оболочку и фасцию. Обнажают общую влагалищную оболочку второго семенника, выводят его семенной канатик и иссекают участок спермиопровода. Рану присыпают белым стрептоцидом и на кожу накладывают 5-6 стежков узловатого шва. Края раны смазывают раствором йода, покрывают тонким слоем гигроскопической ваты и заливают коллодием или заклеивают лейкопластырем.

При вазэктомии у крупных животных делают на передней поверхности шейки мошонки два разреза.

Способ Андреевского. Животное фиксируют на левом боку. Мошонку тщательно обмывают, а нижнюю её часть в области хвоста придатка семенника выстригают и смазывают раствором йода. Для анестезии применяют 3%-ный раствор новокаина; вводят его в глубь нижней стенки мошонки и в толщу хвоста придатка в дозе 2-3 мл. Общее количество вводимого раствора новокаина должно составлять 8-10 мл.

Через 5-7 минут приступают к операции. Сначала оперируют нижний, а затем верхний семенники. Сжимают верхнюю часть мошонки и сильно отесняют семенник вниз так, чтобы контуры хвоста придатка семенника хорошо выделялись через натянутую кожу мошонки. Отступают от шва мошонки на 3-4 см и параллельно её шву в области нижнего края семенника разрезают кожу, мускульно-эластическую оболочку, фасцию и общую влагалищную оболочку. Разрез делают такой длины, чтобы через рану мог пройти только хвост придатка.

Затем хирургическим пинцетом захватывают хвост придатка, осторожно отделяют его от семенника и отсекают вместе с частью спермиопровода. На края раны накладывают несколько стежков узловатого шва. Рану смазывают раствором йода, покрывают тонким слоем марли и заливают коллодием.

Оперативные методы отведения полового члена в сторону. В отличие от животных вазэктомированных, быков-пробников с отведённым в сторону пенисом можно использовать для получения спермы в искусственную ваги-

ну и осеменять ею коров. Существует несколько способов отведения пениса в сторону. Впервые подобная операция выполнена W. Rommel (1961).

Способ Шипилова. Перед операцией животное сутки выдерживают на голодной диете и не поят, чтобы ослабить напряжение кожи живота, предупредить акт мочеиспускания и попадание мочи в рану. Фиксируют быка в спинном положении, используя, как и при вазэктомии, деревянный станок типа "козёл". При отсутствии станка животное валят вплотную к стене или забору и фиксируют к нему передние и задние конечности в вытянутом положении. После фиксации животного готовят операционное поле. Выстригают и выбривают волосы на передней части живота вокруг препуция кзади на расстоянии 12 см от его отверстия и спереди до пупочного бугорка. Выбритую поверхность тщательно моют тёплой водой с мылом. Кожу обтирают и подсушивают, затем протирают 70%-ным этиловым спиртом и дважды смазывают раствором йода. Волосы вокруг отверстия препуция укорачивают ножницами до 1-2 см. Раствором йода намечают в области отверстия препуция и начальной части препуциального мешка линию первоначального разреза кожи.

Препуций окружён рыхлой соединительной тканью и легко смещается под кожей в любую сторону. В области же отверстия он фиксируется краиниальными и каудальными препуциальными мышцами, которые оттягивают препуций вперёд или назад. Поэтому достаточно отвести в правую сторону под углом 70-80° (при меньшем угле возможен коитус) лишь переднюю, очень незначительную часть препуция (от отверстия препуция у годовалого бычка не более чем на 12 см), чтобы сделать невозможным половой акт.

После местного обезболивания 2%-ным раствором новокаина разрезают кожу и подкожную клетчатку, отделяют от брюшной стенки начальную часть препуция с отверстием. Образовавшуюся небольшую рану припудривают порошком антибиотиков и зашивают узловатым швом. Под углом 70-80° вправо от линии живота намечают новое место расположения начальной (отделенной от брюшной стенки) части препуция.

После обезболивания делают линейный разрез кожи и подкожной клетчатки, равный длине отпрепарированной части препуция. Рану припудривают порошком антибиотиков и затем помещают в неё эту часть препуция. Края раны и кожи препуция соединяют узловатыми швами, смазывают раствором йода и закрывают коллоидной повязкой. Небольшие раны заживают по первичному натяжению; отёки незначительны. На 12-13-й день после операции швы снимают. Никаких послеоперационных осложнений не наблюдается и на 18-21-й день быков можно использовать как пробников.

Методика использования быков-пробников. Подготовленных оперативным путём быков-пробников используют с 13-14 мес. возраста для выявления охоты у тёлочек и с 15-16 мес. - у коров. К пробникам с низкой живой массой коровы иногда проявляют агрессивность; с помощью таких пробников пробуют коров на наличие охоты под контролем человека. До начала

использования от вазэктомированного пробника необходимо дважды получить в искусственную вагину и проверить под микроскопом выделенный им секрет: если операция сделана правильно, сперматозоидов в секрете не будет.

Использование пробников эффективно при правильной организации работы с ними. Главным условием является непродолжительное пребывание пробников в загоне среди коров или тёлочек (утром и вечером не более 1.5-2 ч). С этой целью необходимо на каждой ферме иметь специальный загон, в который выпускают вместе с пробником коров после отела (за одну-две недели до планируемого осеменения), бесплодных коров, ремонтных тёлочек (с 15-16 мес.), а также осеменённых коров и тёлочек (с 17-го по 25-й день после осеменения). В летний период пробу проводят в загоне перед выгоном животных на пастбище и после возвращения их с пастбы. Коров, у которых выявлена охота, немедленно выводят из загона и осеменяют, а пробника оставляют для общения с другими самками.

Пробника нельзя оставлять постоянно в стаде, так как половая активность его будет снижаться. В зимний период быка-пробника выпускают на прогулку вместе с коровами утром или днём. Вечером пробника медленно проводят по проходу скотного двора. В плохую погоду вечернюю и утреннюю пробу на охоту проводят в коровнике.

В молочном комплексе на 800 коров при пункте осеменения содержат четырёх пробников и используют их попеременно (по два в день). Во всех случаях строго соблюдают принцип "дозированного" общения пробников с коровами и тёлками и постоянно контролируют их использование.

Способы и техника осеменения.

Для осеменения коров и тёлочек применяют цервикальный метод осеменения, т.е. в шейку матки. Существуют три принципиально различающиеся по технике исполнения способа введения спермы в канал шейки: *визоцервикальный*, *ректо-цервикальный* и *mano-цервикальный*. Независимо от способа введения спермы осеменение коров и тёлочек должно проводиться на пункте или в подготовленном для этой цели помещении, где содержатся животные, с соблюдением технологических и ветеринарно-санитарных требований. При осеменении необходимо предупреждать болезненные и стрессовые реакции у животных, а также исключить возможность распространения инфекционных болезней. При маршрутно-кольцевом обслуживании нескольких пунктов оператор по искусственному осеменению может перевозить только сосуд со спермой. Другие необходимые инструменты и материалы должны быть на каждом пункте.

Перед осеменением животного специалист уточняет время, прошедшее после отела, или порядковый номер повторного осеменения; при необходимости знакомится с результатами акушерского и гинекологического исследования. Затем осматривает животное, его половые органы и выделяе-

мую слизь. При наличии в слизи примесей гноя или крови животное не осеменяют и после осмотра его ветеринарным специалистом проводят соответствующее лечение.

После обследования животного оператор по искусственному осеменению снимает рабочий халат темного цвета, моет руки и надевает белый халат. Включает оттаиватель (биотермостат) и доводит температуру воды до 38-39°C. На стол кладет полиэтиленовую пленку или лист (40x60 см) пластика, протирает их спиртовым тампоном. Обрабатывает подставку для инструмента, пинцет, корнцанг, ножницы. Готовит инструмент для осеменения, оттаивает сперму и осеменяет животное одним из способов.

Визио-цервикальный способ осеменения - наиболее простой и доступный. Сущность его заключается в том, что во влагалище коровы или телки вводят теплое стерильное влагалищное зеркало, которое предварительно увлажняют теплым изотоническим раствором натрия хлорида или натрия гидрокарбоната. В момент введения зеркало держат левой рукой так, чтобы ветви его были плотно закрыты, а ручки обращены в сторону. Начальной частью ветвей делают движение сверху вниз между половыми губами и под небольшим углом вверх и затем вперед вводят его во влагалище до упора. После этого поворачивают зеркало ручками вниз и надавливая на них раскрывают зеркало. Во влагалище зеркало размещают так, чтобы можно было видеть отверстие шейки матки. При осеменении в недостаточно освещенном помещении к зеркалу присоединяют осветитель (рис. 43). Затем инструмент для осеменения (стеклянный шприц-катетер, полистироловую пипетку с изогнутым концом и с присоединенным к ней с помощью полиэтиленовой муфты пластмассовым шприцем, шприц конструкции Львовской академии ветеринарной медицины) вводят через зеркало в шейку матки на глубину 4-6 см и нажатием на поршень выдавливают дозу спермы. Если сперма расфасована в соломинах пользуются инструментом ШО-3 или ШО-4. Перед введением спермы зеркало несколько извлекают и уменьшают степень раскрытия влагалища.

Нередко используют металлическое зеркало с вырезом на верхней ветви. Изготавливают его из обычного инструмента. Для этого срезают правый край верхней ветви в виде полоски шириной от 11-12 мм в передней, до 55-60 мм в задней части ее. Кроме того, у основания зеркала делают дополнительный косой срез под углом 20-30° (рис. 43). Через такое зеркало шприц-катетер (или другой инструмент) обычным путем вводят в шейку матки. После этого катетер слегка прижимают к верхнему краю половой щели, а зеркало, повернув срезанной частью к шприцу, вынимают осторожно из влагалища. Через 20-30 с вводят сперму в шейку матки. В момент введения спермы снимаются болевые ощущения, связанные с нахождением во влагалище металлического инструмента, это способствует естественному проявлению сократительной функции матки, глубокому размещению спермы в канале шейки и повышению процента плодотворного осеменения.

В ряде стран вместо металлического влагалищного зеркала используют стеклянный расширитель (рис. 43).

Для асептического проведения осеменения этим способом необходимо животное зафиксировать в станке (рис. 44), подмыть теплой водой половые органы и вытереть салфеткой. Воду для подмывания наливают в полиэтиленовую бутылку емкостью 500-1000 мл, а в пробке делают одно или несколько отверстий. Такую бутылку можно поместить в карман халата. Влагалищное зеркало и шприц-катетер перед осеменением каждого животного необходимо обеззараживают одним из подходящих способов. Обычно зеркало (металлическое) стерилизуют кипячением в дистиллированной воде, а в полевых условиях - фламбированием; осветитель тщательно протирают спиртовым тампоном, шприц-катетер обеззараживают кипячением или 70%-ным спиртом.

Для обработки стеклянного шприца-катетера необходимы три баночки с притертыми пробками для физиологического раствора (баночки №№ 1, 3 и 4) и одна баночка (№ 2) для 70%-ного спирта. Кроме того, необходимы спиртовые тампоны и сухие ватные тампоны (в тампонницах), а также стерильные марлевые салфетки. Следует также иметь отдельную баночку для отработанного спирта, тампонницу для отработанных спиртовых тампонов, толстостенную чашку для отработанных растворов и специальную пластмассовую подставку.

Перед началом работы из шприца-катетера, сохраняемого с 70%-ным спиртом, удаляют спирт; затем промывают его раствором из баночек №2 и №4 по три-четыре раза из каждой. После последнего промывания инструмент поворачивают катетером вниз и двигая медленно поршнем шприца удаляют остатки раствора. Наружную поверхность катетера протирают тампоном, смоченным 96%-ным спиртом. Подготовленный инструмент опускают в ампулу с оттаянной спермой и медленно оттягивая поршень вверх, набирают ее в шприц. Затем шприц поворачивают катетером вверх, несколько оттягивают поршень вниз, чтобы собрать сперму из катетера, после чего медленным движением поршня вытесняют воздух из шприца и катетера (до появления капельки спермы на кончике катетера). После осеменения животного катетер протирают сухим тампоном, промывают из баночки № 1 физиологическим раствором, набирают 1-2 мл 70%-ного спирта и хранят до использования.

Ректо-цервикальный способ - наиболее надежный из всех используемых в скотоводстве; заключается во введении инструмента для осеменения со спермой в шейку матки, которую фиксируют рукой через прямую кишку (рис. 45). Этот способ в одинаковой мере пригоден как для осеменения коров и телок, так и для пересадки зародышей реципиентам.

При использовании спермы, замороженной в гранулах, необходимо иметь одноразовые полистироловые пипетки, полиэтиленовый шприц с соединительной муфтой и полиэтиленовую перчатку. Для осеменения спермой

в соломинах используют металлический шприц ШО-3 или ШО-4, поверх которого одевают защитный чехол.

Оттаяв сперму в гранулах, оператор берет пакет с одноразовыми пипетками, протирает уголок его спиртовым тампоном (со стороны не зашлифованного конца пипеток) и ножницами делает небольшое отверстие. Выдвинув на одну треть длины пипетку, соединяет ее со шприцем. Затем извлекает пипетку полностью, отверстие в пакете зажимает скрепкой и после этого медленно набирает оттаянную сперму из ампулы; сперма должна заполнить переднюю часть пипетки без столбика воздуха. Подготовленный инструмент оператор помещает в свободный стерильный пакет и кладет на стол.

После оттаивания спермы в солоmine оператор берет стерильный инструмент, поршень оттягивает примерно на 10 см и другой рукой вставляет соломину до упора. Конец ее с пузырьком воздуха отрезает острыми ножницами перпендикулярно возле самого конца инструмента (соломина не должна выступать более чем на 3-4 мм). На инструмент одевает защитный одноразовый чехол, фиксирует его в замковом устройстве. Конец чехла изнутри должен плотно охватывать срезанную часть соломины и при надавливании на поршень сперма должна выходить через отверстие чехла и не попадать под чехол.

Если притупился край фиксирующей пружины замкового устройства, то необходимо отвернуть два крепежных винта, снять пружину и подточить край ее округлым надфилем, слегка подогнуть, чтобы крепко фиксировал чехол.

Для осеменения этим способом руку в перчатке вводят в задний участок прямой кишки животного. Затем несколько отодвигают ее назад и располагают так, чтобы большой палец разместился в области промежности выше угла половой щели, а остальные четыре пальца надавливали на нижнюю стенку прямой кишки впереди ануса. Это приводит к раскрытию половой щели. Подготовленный инструмент для осеменения (полистироловая пипетка, соединенная с помощью специальной муфты с полиэтиленовым шприцем; металлический инструмент типа ШО-3 или ШО-4 с полипропиленовой соломиной, зафиксированной в инструменте с помощью защитного чехла; специальный металлический инструмент для облицованных гранул) вводится в половые пути по верхней стенке преддверия влагалища вначале пол углом 30-40°, чтобы не попасть в отверстие мочеиспускательного канала, а затем горизонтально до упора в свод влагалища. Если инструмент упирается в складку стенки влагалища, необходимо осторожно рукой через стенку прямой кишки надавить на передний конец инструмента и продвинуть его вперед. Иногда это удается сделать только после отодвигания шейки матки вперед и распрямления верхней стенки влагалища. Можно инструмент для осеменения продвигать в половые пути раньше, чем будет введена рука в прямую кишку. Для этого одной рукой раскрывают половые

губы, а другой инструмент направляют во влагалище по верхней стенке. Затем руку вводят в прямую кишку. Чтобы рука легче проходила через анальное отверстие, перчатку слегка намазывают или смазывают вазелином. Перед введением можно смазать и анальное отверстие.

Манипуляции по освобождению прямой кишки от каловых масс следует проводить тогда, когда сильно затруднено фиксирование шейки матки; введенный инструмент при этом оберегают от загрязнения. После полного введения инструмента во влагалище рукой через прямую кишку фиксируют шейку матки и направляют инструмент в канал шейки матки. Это наиболее трудная и ответственная операция. Чтобы мастерски овладеть ею, необходим большой практический навык. Для начинающих осваивать этот способ можно рекомендовать два следующих приема.

Если по толщине шейка матки не слишком большая, то сначала необходимо отодвинуть и прижать ее к боковой стенке тазовой полости. При работе правой рукой прижимают шейку к левой стенке, а если левой то к правой стенке. Затем полностью обхватывают заднюю часть шейки так, чтобы указательный, средний и безымянный пальцы размещались снизу шейки, а большой палец фиксировал ее сверху. Мизинец должен находиться сзади устья шейки матки и на нем располагают конец инструмента. Изменяя положение кисти руки с шейкой матки в сагиттальной плоскости, можно выбрать такой момент, когда кончик инструмента совпадет с наружным отверстием шейки, после чего его достаточно легко ввести в заднюю часть канала. Подталкивая инструмент вперед, руку в прямой кишке перемещают на переднюю часть шейки, фиксируют ее и, изменяя положение относительно инструмента в различных направлениях, "насаживают" на него полностью. Когда пальцы ощутят инструмент через тонкую стенку тела матки его несколько отодвигают назад и, надавливая на поршень шприца или толкатель других инструментов, медленно вводят сперму. Можно инструмент извлекать постепенно из канала шейки так, чтобы по крайней мере часть вводимой спермы осталась между складками шейки матки. Это способствует формированию первичного депо сперматозоидов. Более глубокое расположение такого депо, чем при естественном осеменении, позволяет уменьшить объем вводимой спермы и количество в ней подвижных сперматозоидов без снижения результатов осеменения.

Иногда диаметр шейки матки настолько велик, что трудно обхватить заднюю часть ее рукой. В этом случае четырьмя пальцами прижимают влагалищную часть шейки к лонным костям, а большим пальцем отыскивают наружное отверстие шейки и под контролем его направляют инструмент вперед. После этого манипулируя передней частью шейки матки, полностью вводят инструмент в канал шейки матки.

При ректо-цервикальном осеменении сперму можно ввести в половые пути на различную глубину. Однако следует учитывать чувствительность к травмам и инфицированию слизистой оболочки матки (она более

чувствительна, чем слизистая оболочка шейки), возможность осеменения стельной коровы и нарушения беременности (около 4-5% стельных коров проявляют охоту и нередко их осеменяют), в естественную или стимулированную охоту проводится осеменение и др. Наиболее рациональным при этом способе осеменения является введение спермы в тело матки при первом осеменении (а также при осеменении в стимулированную охоту) и в переднюю часть шейки матки при повторном осеменении.

Результативность ректо-цервикального способа осеменения коров и телок выше, чем других способов. При благоприятных условиях при первом осеменении после отела оплодотворяется 63-66% или более коров, т.е. столько же, сколько и после естественного осеменения. Это, а также использование одноразовых стерильных инструментов или минимального количества инструментов многократного пользования и легкость их стерилизации, предупреждение раздражения, травм и инфицирования половой системы, приспособленность ко всем технологиям расфасовки и хранения спермы, контролируемое введение спермы в половые пути и небольшие затраты труда и времени при осеменении животного - являются основными достоинствами ректо-цервикального способа.

Мано-цервикальный способ. Он применяется только для осеменения коров с достаточно широким половым каналом.

При осеменении мано-цервикальным способом сперму вводят в канал шейки матки с помощью короткого полиэтиленового катетера с присоединенной к нему ампулой непосредственно рукой. На руку одевают стерильную полиэтиленовую перчатку. Для введения спермы в облицованных гранулах используется специальный инструмент - зоошприц, который состоит из цилиндрического корпуса, съемного фланца и толкателя (рис. 45).

Сначала готовят животное: фиксируют хвост, а наружные половые органы подмывают теплой водой (при необходимости с мылом) и дезинфицируют раствором фурацилина. Оператор по искусственному осеменению извлекает из упаковки полиэтиленовую ампулу, срезает колпачок наискось острым скальпелем или ножницами и соединяет ее с катетером. Затем набирает сперму, опять вкладывает в упаковку и кладет на подставку. На руку одевает полиэтиленовую перчатку, увлажняет ее 1%-ным раствором натрия хлорида или натрия гидрокарбоната и осторожно вводит во влагалище коровы. После нахождения влагалищной части шейки матки пальцами обхватывает ее и, поворачивая руку относительно продольной оси в одну и другую стороны, делает массаж. В это время корова обычно успокаивается и до конца осеменения стоит неподвижно. Шейка матки и матка периодически сокращаются. В момент расслабления матка проявляет всасывающую функцию. В это время техник, не вынимая кисти руки из влагалища, другой рукой подает подготовленный для осеменения инструмент и располагает его на ладони так, чтобы большой палец прижимал ампулу, а кончик катетера находился вблизи указательного пальца. Не меняя положения инструмента,

вводит кисть руки до шейки матки и под контролем указательного пальца продвигает катетер на глубину 1,5-2 см в цервикальный канал. Затем кончиками пальцев снова начинает массировать шейку матки, а ладонью подталкивает ампулу так, чтобы катетер вошел в канал на всю глубину (6-7 см). После этого ампулу приподнимает вверх на 2-3 см и выдавливает сперму из нее большим и указательным пальцами в момент расслабления матки. Чтобы сперма не оставалась, ампулу сжимать надо начиная с верхнего угла доннышка по направлению к шейке. После введения спермы ампулу не разжимают и вместе с катетером извлекают из канала шейки матки. Далее инструмент необходимо положить на дно влагалища и дополнительно массировать шейку матки и только после этого извлечь руку с инструментом из влагалища.

Многие считают, что этот способ полнее других имитирует естественное осеменение, а массаж влагалищной части шейки матки снимает оборонительную реакцию самки на введение руки и инструментов, усиливает сократительную функцию матки, способствует засасыванию спермы и продвижению ее к яйцепроводам. Это, а также достаточно глубокое введение спермы в цервикальный канал и использование одноразовых стерильных инструментов обеспечивают близкую к стандартной оплодотворяемость коров - 55-57%.

При использовании каждого из трех способов наилучшие результаты получают при осеменении коров через 9-16 ч после начала охоты; подходящее время и в период между 6 и 9 ч, а также с 16 до 28 ч. Если время начала охоты неизвестно, корову (телку) осеменяют немедленно; осматривают затем через 10-12 часов и при сохранении признаков охоты - осеменяют повторно. При длительно протекающей охоте животное следует тщательно исследовать ректально и при отсутствии патологии яичников осеменить третий раз.

Вопросы:

1. Как проявляется течка у коров, какова ее продолжительность? Какими способами выявляют течку?
2. Какие изменения в наружных половых органах, во влагалище и в матке происходят в период течки и охоты? Какое состояние этих органов в середине полового цикла?
3. Как проявляется половая охота у коров? Какие признаки наблюдаются до начала охоты, во время охоты и после окончания ее? Какова продолжительность охоты?
4. Каковы способы и режим выявления половой охоты?
5. Когда происходит у коров овуляция относительно половой охоты? Как определить, что овуляция произошла? В какой период охоты осеменяют коров? Почему?
6. Какие способы подготовки быков-пробников применяют?
7. Как используют быков-пробников для выявления коров в охоте?
8. Какие способы искусственного осеменения коров и телок применяют в практике? Какой из них наиболее эффективен?
9. Какой способ расфасовки спермы наиболее совершенен и почему?
10. Как подготовить животное для осеменения?
11. Как подготовить инструмент для осеменения коровы спермой, расфасованной в соломинах?
12. Как подготовить инструмент для осеменения коровы спермой, расфасованной в гранулах?
13. Как подготовить влагалищное зеркало (расширитель) и инструмент для осеменения коровы визоцервикальным способом?

14. Какой объем спермы необходим для осеменения коровы? Сколько сперматозоидов подвижных должно содержаться в одной дозе для осеменения?

15. В какой участок половых путей вводится сперма при осеменении? Кратность осеменения коровы в течение охоты?

15. Почему все инструменты, применяемые для осеменения, должны сохраняться опрятными, чистыми, стерильными?

16. Как стерилизуют инструмент для осеменения? Как утилизируют инструмент для одноразового использования?

17. Какие записи должен вести техник-осеменатор и какие - заведующий фермы (бригадир)?

Осеменение овец

Диагностика течки и половой охоты

Течка у овец непродолжительна и обнаружить ее трудно. Проявляется гиперемией слизистых оболочек, увеличением числа слоев влагалищного эпителия и ороговением поверхностных клеток, иногда точечными кровоизлияниями, повышением тонуса мускулатуры матки, усилением секреции слизи клетками шейки матки. Слизь в начале охоты прозрачная, слегка опалесцирующая, затем становится более мутной и в конце охоты приобретает сало-образную консистенцию.

Половая охота у овец проявляется не так ярко, как у других видов, и определить ее у большинства животных без барана-пробника практически невозможно. Сопровождается охота выделением специфических пахучих веществ - аттрактантов (*феромонов*), которые легко воспринимаются самцами. Продолжительность охоты 36-38 ч (от 12 до 72 ч).

В отаре овцы, находящиеся в охоте, стучат копытами, помахивают хвостом, стремятся приблизиться к производителю, иногда группой ходят за бараном. Овца считается в охоте, если допускает садку барана.

У коз много общего с овцами в проявлении половой функции. Однако половая цикличность нередко нерегулярная, продолжительность цикла составляет 19-21 день, хотя возможны и более короткие циклы (5-9 дней). Охота длится 22-33 ч; овуляция наступает через 27-34 ч после начала охоты.

Для выявления охоты у овец используют баранов-пробников. Чтобы баран не мог осеменить овцу, а только выявил охоту, ему подвязывают на живот фартук из плотного материала, длиной 60 см и шириной 40 см. Иногда делают вазэктомию; операция у баранов (козлов) проводится также, как и быков. На 80-100 овцематок готовят одного пробника. Обычно используют молодых, энергичных баранов. Если баран не вазэктомирован, то племенная ценность его должна быть не ниже 1 класса.

Перед началом работы как интактным, так и вазэктомированным баранам подвязывают под брюхо фартуки для предотвращения коитуса. Чтобы облегчить процесс выборки овец в охоте, пробникам прикрепляют в области груди красящие метчики. Делая садку на овец бараны окрашивают их с помощью таких устройств. Если вазэктомированным баранам не подвязывать фартуки, то у них торможение половых рефлексов возникает не так быстро, и проявляется не так часто, как у баранов с фартуками. Более того,

многократный коитус усиливает сократительную функцию матки у овец и ускоряет овуляцию, что позволяет ограничиться однократным осеменением вместо обычного двукратного. Для поддержания половой активности на протяжении случного сезона интактным баранам-пробникам позволяют в неделю сделать одну садку на матку в охоте, или же от него получают в искусственную вагину один-два зякулята.

Выбирают овец в охоте один раз (иногда два раза) в сутки, обычно утром. Для проведения выборки в первые 8-10 дней загон (баз) разделяют на две части. Пробников используют поочередно, по группам. Матку считают в охоте, если она не убегает при вскакивании на нее барана, а стоит спокойно. Таких маток вылавливают и помещают в станки из переносных щитов, которые размещают по углам загона. Когда поголовье не проявивших охоту овец уменьшится, выборку проводят в одном загоне, но площадь его постепенно ограничивают переносными щитами по мере перевода овец в группу осеменения. При выборке надо следить, чтобы овцы в загоне не собирались группами, а были распределены в нем равномерно. По завершении выборки баранов-пробников удаляют из отары, а маток выпускают на пастбище. Овец в охоте перегоняют на пункт осеменения, где осеменяют и содержат отдельно до следующего утра, а после выборки животных с продолжающейся охотой соединяют с ранее осемененными овцами. Из них формируют отдельную отару. С 10-го дня после начала искусственного осеменения организуют выявление овец, проявляющих половую охоту повторно. После осеменения маток метят специальной краской "Овцевод". Среди осемененных коз выборку животных в охоте начинают с 5-го дня от начала осеменения.

Способы и техника осеменения.

При осеменении овец и коз применяют влагалищный и цервикальный методы. Яркам и переяркам из-за узости преддверия влагалища сперму вводят без применения влагалищного зеркала во влагалище (парацервикально). Для взрослых маток наиболее подходящим является цервикальный метод. При обоих методах для введения спермы используют стеклянный шприц-катетер (микрошприц) с дозирующим приспособлением, шприц-полуавтомат, металлический шприц (рис. 47).

При влагалищном методе осеменения катетер вводят по верхней стенке преддверия влагалища и влагалища до упора, затем отводят назад примерно на 1 см и выталкивают сперму, надавливая пальцем на поршень. Если влагалищное осеменение практикуют часто, то изготавливают укороченный шприц-катетер. Для этого в обычном инструменте обрезают тонкую изогнутую конечную часть катетера, а место среза шлифуют или оплавливают на пламени. Объем вводимой во влагалище неразбавленной спермы 0,15-0,20 мл, разбавленной и сохраняемой при 2-5°C спермы - 0,2 мл и замороженной спермы - 0,4 мл.

При цервикальном методе используют влагалищный расширитель с продольной прорезью сверху или металлическое влагалищное зеркало. Инструмент, обеззараженный и подогретый (металлическое зеркало), увлажняют 1%-ным раствором натрия хлорида и вводят во влагалище. После отыскания шейки матки кончик шприца-катетера направляют в канал шейки и вводят на максимальную глубину (1-3 см). Чтобы сперма не вытекала из влагалища, перед нажатием на поршень зеркало слегка оттягивают назад. При пользовании влагалищным расширителем перед введением спермы сначала извлекают расширитель, после чего осторожно надавливая на поршень шприца вводят необходимое количество спермы. При цервикальном осеменении вводят самке неразбавленной спермы 0,05 мл, разбавленной и охлажденной до 2-5°C - 0,1-0,15 мл и замороженной спермы - 0,2 мл. Если не удастся ввести инструмент в канал шейки матки, то сперму выдавливают на наружную часть шейки, увеличивая при этом дозу вдвое.

Перед осеменением каждой овцы катетер аккуратно обтирают тампоном, пропитанным 70%-ным спиртом, оберегая кончик инструмента от попадания в него спирта. После осеменения 3-4 овец необходимо капельку спермы из шприца нанести на предметное стекло, накрыть покровным и определить подвижность сперматозоидов. Если подвижность их резко понизилась, то эту сперму не используют.

После расходования всего зякулята микро-шприц промывают физиологическим раствором, а затем обеззараживают 70%-ным спиртом. Перед тем, как набрать новую порцию сперму от другого барана, микро-шприц 4-5 раз промывают физиологическим раствором из других баночек. Влагалищное зеркало после осеменения каждой овцы моют горячей водой, насухо вытирают полотенцем и обеззараживают на огне с не коптящим пламенем.

Осеменяют овец в манеже пункта искусственного осеменения. Для фиксации животных устанавливают станок (деревянный или металлический). Размещают его напротив окна или осветительной лампы. Маток поочередно фиксируют в станке или конвейерной установке для подачи их в манеж к рабочему месту оператора по искусственному осеменению. Во многих хозяйствах комната-манеж располагается в кошаре и проемом в стенке сообщается с другим не отапливаемым помещением, куда загоняют маток в охоте. В этом помещении имеется станок для фиксации овец. Осеменение их проводят через проем.

При осеменении в теплое время года нередко организуют временный (передвижной) пункт на пастбище. Осеменяют овец в загоне летнего лагеря. Обычно такой пункт работает с приобретаемой в племпредприятии спермой (замороженной или охлажденной до 2-5°C).

Оптимальным временем для осеменения овец является период в пределах 9-12 часов после начала охоты. Обычно же осеменяют овец дважды: первый раз сразу после выборки в охоте, второй раз спустя 8-10 часов. Маток с продолжительной охотой осеменяют и третий раз. Второе осеменение

через 24 часа допускается при использовании свежеполученной спермы высокого качества.

Осеменение овец сезонное: при планировании ягнения в январе осеменение маток проводят в августе, а при ягнении в феврале - осеменяют их в сентябре. Благоприятные условия осени способствуют повышению плодовитости по сравнению с другими периодами на 15-20%. Осеменение проводят на протяжении двух половых циклов (35-40 дней). По окончании работы пункта организуют вольную случку маток, не оплодотворившихся после искусственного осеменения. В племенных хозяйствах для этой цели в течение 15-25 дней используются бараны, по качеству не уступающие основным, а в других хозяйствах - не ниже 1 класса.

Осеменение коз проводят в сентябре - ноябре.

Вопросы:

1. Как проявляется течка и половая охота у овец, какова продолжительность их? Какими способами выявляют охоту?
2. Какие способы подготовки баранов-пробников применяют? Как их используют для выявления овец в охоте?
3. Какие способы искусственного осеменения овцематок и ярочек применяют в практике? В какой участок половых путей вводится сперма при осеменении?
4. В какой период охоты осеменяют овец? Кратность осеменения в одну охоту?
5. Как готовятся микро-шприц или шприц-полуавтомат для осеменения овец?
6. Какой объем спермы свежеполученной, разбавленной и сохраняемой при температуре 0-4 °С или минус 196 °С необходим для осеменения овцы? Сколько сперматозоидов подвижных должно содержаться в одной дозе для осеменения?
7. В какой период года проводится осеменение овец? Какова продолжительность периода осеменения?

Осеменение свиней.

Диагностика течки и половой охоты

У свиней в период созревания фолликулов вульва (петля) набухает и приобретает красный цвет, слизистая оболочка влагалища становится отечной, розоватого или ярко-красного цвета. Из половой щели может выделяться слизь. В начале охоты слизь светлая, а к концу охоты беловатая. Выделяется слизи немного. Четкие изменения вульвы в период эструса наблюдают только у 75% самок. Набухание и покраснение ее редко сохраняется до конца охоты и обычно исчезает во время спаривания или ранее.

За 3-12 ч до наступления стадии эструса происходят изменения в поведении свиньи. Она становится беспокойной, часто мочится, издает характерное хрюканье, мало ест, обнюхивает половые органы других животных, вспрыгивает на них и может позволять делать садку на себя другим свиньям, пытается выбраться из станка. Некоторые самки активно преследуют хряков за день до наступления эструса. В этой стадии явления течки и охоты усиливаются.

Характерным признаком половой охоты (готовности свиньи к спариванию с самцом) является неподвижность. В присутствии самца она настораживает уши, выгибает дугой спину и застывает в такой позе. Если в это время положить ей на крестец руку или сесть верхом, то она не уклоня-

ется, а продолжает стоять спокойно. Но без хряка такая реакция наблюдается только у половины животных.

Главными раздражителями рефлекса неподвижности являются обонятельные и слуховые. Внешний вид самца тоже имеет значение. Но наблюдения показывают, что если самка не видит хряка, но слышит хрюканье и воспринимает запах его, то влечение к нему ослабляется незначительно. Записанное на магнитофон хрюканье хряка вызывает рефлекс неподвижности более чем у половины свинок, которые не проявляли рефлекса без хряка. Очень сильные и обонятельные раздражители. Свыше 60% свинок в охоте, которые не реагируют на надавливание рукой, проявляют неподвижность при переводе их в станок хряка. Запах жидкости, взятой из препуция хряка и подогретой до температуры тела, дает такой же эффект, как и запах самого хряка. Реакция зависит от стероидного вещества, вырабатываемого в препуции и придающего характерный запах свинине. Оно синтезировано и используется при выявлении охоты (препараты суидор, феромаксин и др.). Достаточно 0,1-1 мг такого вещества смешать со 100 г инертного вещества и распылить или разбрызгать в виде жидкости (аэрозоли) в свинарнике, чтобы стимулировать половую активность у свиноматок в охоте. Спустя 1-2 мин. после применения его более половины свиной в охоте, у которых не были замечены признаки ее, проявляют рефлекс неподвижности и без хряка.

Использование хряков-пробников.

Наиболее точный способ выявления охоты у свиной - это использование хряка-пробника в группе из 4-8 самок. Целесообразно помещать в станок первым хряка, чтобы он привык к окружающей обстановке, а затем вводить маток. Если хряк обладает хорошей половой активностью, то бывает достаточно 5-минутного контакта с каждой самкой. Так как коитус у свиной длится долго, то можно использовать хряков без какого-либо хирургического вмешательства. После садки хряка можно столкнуть с матки. Надежно использование и вазэктомированных хряков. Существует несколько способов вазэктомии.

Способ Шитилова. Хряков, выдержав сутки на голодной диете, фиксируют в спинном положении и проводят резекцию спермиопроводов так же, как у быков.

Немецкая фирма "Шипперс" предложила механическое подвижное чучело, с дистанционным управлением. Помещено чучело на легкую тележку и поэтому его можно катать по проходу; оно имеет цвет, запах и форму живого хряка. В нем размещается устройство для воспроизведения звуковых раздражителей.

При выявлении охоты у свиной животноводы должны учитывать и такие признаки, как повышенную возбудимость, потерю аппетита, характерное хрюканье, припухание и покраснение вульвы и др. Отдельно взятый признак не является надежным показателем охоты, но по их совокупности

опытный работник, знающий всех животных индивидуально, легко может определить самок в охоте. Прогон хряка по проходу свинарника, где содержатся матки, существенно облегчает эту задачу.

Способы осеменения свиней.

При искусственном осеменении свиней сперма вводится в матку. В практике применяется два способа осеменения: фракционный и нефракционный. При обоих способах используется разбавленная сперма с содержанием подвижных сперматозоидов в 1 мл 30-50 млн., но объем вводимой спермы различный.

При фракционном способе сначала вводится разбавленная сперма в объеме 50 мл взрослым маткам и 40 мл молодым свинкам, а затем глюкозо-солевой раствор (1 л дистиллированной воды, 30 г глюкозы и 4,5 г натрия хлорида) соответственно 100 мл и 70-80 мл. Для осеменения используются универсальный термос-прибор, универсальный зонд УЗК-5 и упрощенный зонд УЗК-6.

Универсальный термос-прибор приспособлен для осеменения свиноматок и переноски спермы на ферме. Состоит из деревянного футляра, металлических колонок с горячей водой (обогревательного бачка), трех стеклянных ампул, спиртовки для сухого спирта, катетера (зонда), шаров Ричардсона, резиновых трубок, зажимов и термометра. Зонд состоит из двух частей: одна изготовлена из металлической нержавеющей трубки длиной 25 см, другая присоединяется к первой при помощи винтовой резьбы и представляет собой спираль из никелированной проволоки. Внутри металлической трубки и спирали вставляется резиновая трубка, задний свободный конец которой служит для соединения зонда с ампулами прибора. На конец металлической спирали плотно надевается резиновая головка зонда диаметром 20 мм. К заднему концу зонда прикрепляется ручка. Другая модель зонда представляет собой металлическую трубку длиной 55 см без спирали.

В комплект более современного, широко используемого прибора УЗК-5 (рис. 48) входит один полужесткий металлический катетер (зонд) с резиновой головкой и 10 пластмассовых катетеров в пластмассовых чехлах. В предохранительный колпак прибора помещается два флакона: один с разбавленной спермой, а другой - с глюкозо-солевым раствором. Стеклянные флаконы изготавливаются специально для прибора, но нередко их заменяют бутылочками для молочного питания детей или пластмассовыми флаконами из прибора ВИЖ. Содержимое флаконов выдавливается путем нагнетания в них воздуха при помощи шаров Ричардсона. В вариантах 2 и 3 прибора нет защитного колпака. К прибору прилагается термос-ящик для флаконов со спермой и раствором.

В упрощенном приборе УЗК-6 зонд состоит из прозрачной пластмассовой трубки длиной 40 см; на одном конце ее укрепляется резиновая головка диаметром около 20 мм, а на втором - резиновая ручка. В трубку-зонд вмещается до 50 мл спермы. Раствор (вторая фракция) находится в пласт-

массовом гофрированном флаконе, который присоединяется к резиновой ручке зонда при помощи специального наконечника. При сжатии флакона раствор через резиновую ручку поступает в зонд, надавливает на поршень и проталкивает содержащуюся там сперму. В конце зонда поршень не плотно прилегает к внутренним стенкам и способен пропускать вокруг себя раствор из гофрированного флакона. Через 20-30 с после введения спермы и раствора в матку животного извлекают зонд и удаляют остатки раствора.

Комбинированный прибор конструкции Е.Н. Анисько (рис. 48) можно было использовать для искусственного осеменения свиней фракционным и нефракционным способами.

При нефракционном способе осеменения разбавленную сперму вводят за один прием. Доза спермы - 100-150 мл. Для введения спермы применяют приборы УЗК-5 или конструкции ВИЖ и ПОС-5. Два последних прибора состоят из полиэтиленовых тонкостенных флаконов, емкостью 100-150 мл с навинчивающимися крышками, и катетеров с соединительными муфтами. Разница между ними состоит в том, что флаконы прибора ВИЖ плоскодонные, а флаконы от прибора ПОС-5 с округлым дном и имеют грубую градуировку (цена деления 25 мл).

Стерильные катетеры хранятся в полиэтиленовых чехлах. Перед осеменением ножницами отрезают часть чехла и извлекают конец катетера с соединительной муфтой и навинчивают на флакон вместо крышки. Чехол оставляют на катетере до момента введения в половые пути самки.

Маток в охоте перегоняют в манеж для осеменения и размещают в индивидуальных станках. Однако более удобно и надежно фиксировать животных во время осеменения в специальном устройстве. Такое устройство похоже на обычную клетку для взвешивания животного, но оборудовано лямками, которые не позволяют свиноматке лечь. Если манеж не оборудован станками или устройствами для фиксации, тогда осеменяют животных в станках, где их содержат. Однако это менее желательно, так как практически невозможно обеспечить необходимые санитарно-гигиенические условия в момент осеменения и надежно зафиксировать животное. Хотя свиньи в охоте проявляют состояние неподвижности, большинство из них (особенно молодые) не стоят во время осеменения, пытаются двигаться и это создает трудности для удержания оператором по искусственному осеменению катетера в нормальном положении.

Перед осеменением наружные половые органы матки обрабатывают ватным тампоном, смоченным лигнином или раствором фурацилина 1:5000. При сильном загрязнении половые органы сначала обмывают теплой водой или 1-2%-ным раствором натрия гидрокарбоната, а затем дезинфицирующим раствором. После этого усиливают состояние неподвижности матки надавливанием на крестец рукой или левым плечом (рис. 48), в то время как другой раздвигают половую щель и вводят в нее катетер. При осеменении крупных свиноматок техник может сесть на заднюю часть туловища

животного спиной к его голове. Присутствие в момент осеменения вблизи матки хряка усиливает проявление неподвижности. Катетер продвигают по верхней стенке влагалища до упора в шейку матки. В период половой охоты складки (выросты) шейки матки значительно расходятся и катетер с суживающегося кпереди влагалища может проскочить один-два "замка" шейки. Легче это происходит, если на конце катетера имеется утолщение в виде головки или оливообразное расширение, баллончик для воздуха, или же если конец сделан в форме полового члена хряка. При прохождении сначала первой, а затем второй складки ощущается небольшое сопротивление; слегка подталкивая катетер вперед удается преодолеть его. Расширение на конце катетера предупреждает вытекание спермы. Катетер со спиралевидным концом одновременно продвигают и вращают в левую сторону до столкновения со складками шейки матки. У молодых маток кончик катетера может упираться в начало цервикального канала.

После введения катетера в половые пути матки флакон со спермой приподнимают выше спины животного, переворачивают его вверх дном и, слегка нажимая рукой, начинают вводить сперму. При фракционном способе осеменения после введения катетера до упора в шейку матки техник открывает зажим флакона со спермой и начинает нагнетать во флакон воздух. Если канал шейки матки открыт, то сперма будет поступать в матку и уровень ее во флаконе заметно понизится. После введения дозы спермы (половина стеклянного флакона) техник закрывает этот зажим, одновременно открывает зажим другого флакона и вводит необходимое количество раствора. Сперму и раствор необходимо вводить медленно. У взрослых свиноматок благодаря интенсивным всасывающим движениям матки сперма часто поступает самотеком через открытый канал шейки матки, но у молодых свинок это бывает реже. При осеменении в оптимальное время для введения спермы требуется 3-4 минуты. Если канал шейки закрывается, то сперма начинает вытекать из влагалища. В этом случае давление на флакон (или давление воздуха) уменьшают, выжидают 10-20 секунд (иногда до 40 секунд), пока опять канал не расслабит, а затем продолжают введение.

Перед осеменением сперму, сохраняемую при 16-20°C, помещают в водяную баню (30-35°C) не менее чем на 10 минут. За это время флакон переворачивают несколько раз для того, чтобы сперма подогревалась равномерно. Не подогретая сперма, введенная в половые пути свиноматок, часто выталкивается обратно. Одновременно подогревают не более 5 доз спермы, чтобы использовать ее в течение получаса.

Время осеменения свиноматок. Осеменяют маток обычно в первую охоту после отъема поросят. Кормление подсосных маток должно быть полноценным, чтобы к этому моменту они имели хорошую упитанность и в течение последующих 4-7 дней проявили половую охоту. Маток слабо упи-

таных выделяют в отдельную группу, улучшают кормление. Не проявившим охоту в течение 8 дней маткам вводят ПГ-600.

Половая охота у свиней длится 40-60 часов, а овуляция происходит через 30-36 часов после начала охоты. Продолжается овуляция не более 4-7 часов. Введенные в половые пути свињи сперматозоиды сохраняют способность к оплодотворению не более 30 часов. Поэтому оптимальным временем для осеменения считается интервал в пределах от 12 до 16 часов перед овуляцией. Но это при условии использования свежеполученной спермы. Когда же осеменение проводится разбавленной или оттаянной после замораживания спермой, то оптимальное время для осеменения будет несколько ближе к овуляции - за 6-8 часов до нее. Обычно же при определении оптимального времени осеменения исходят не из срока овуляции, а из времени начала проявления рефлекса неподвижности. Наилучшим сроком для осеменения взрослых маток является конец первых и начало вторых суток, а для молодых - после 30 часов от начала половой охоты.

В практических условиях время осеменения определяется кратностью выборки животных в охоте. При четырехкратном контроле молодых свинок можно осеменять в течение 17-18 часов, а свиноматок - в течение 21-24 часов после определения состояния неподвижности. Если выборка проводится два раза в день (с промежутком в 10-12 часов), то требуется двукратное осеменение: после выборки свиноматок в охоте утром осеменение их проводят вечером, а после вечерней выборки - утром следующего дня. Второй раз животных осеменяют, как правило, через 10-12 часов после первого осеменения. Молодых свиноматок, выбранных утром, можно осеменять через 2-5 часов и повторно на другой день утром. Так поступают и при однократной выборке охоты у свиней. Если половая охота длится более 10 часов после повторного осеменения, то свиноматку целесообразно осеменить еще один раз.

Организация осеменения в хозяйствах

В нашей республике используется в основном хозяйственный способ. На крупных фермах и комплексах, в селекционно-гибридных центрах собственными силами и средствами создается пункт (станция) искусственного осеменения. Обслуживается пункт группой специалистов, в задачу которых входит подбор племенных хряков, использование их, обработка и хранение спермы, проведение осеменения. Сперму от хряков получают по мере необходимости, поэтому хранится она после разбавления не более суток. Сервисный способ может быть использован при обслуживании небольших ферм совхозов и колхозов, в которых содержится небольшое количество свиноматок, а также фермерских и индивидуальных хозяйств. По заказам владельцев животных оператор по искусственному осеменению с крупного пункта (или предприятия, если оно содержит хряков) может выезжать, везя с собой сперму и инструменты, и осеменять выявленных в охоте животных.

Вопросы:

1. В какой степени выражены изменения вульвы у свиней в период течки? Как долго они сохраняются?
3. Как проявляется половая охота? Какие признаки наблюдаются до начала охоты и во время охоты? Какова продолжительность ее?
4. Когда происходит у свиней овуляция относительно охоты? В какой период охоты осеменяют их? Кратность осеменения?
5. Способы и режим выявления половой охоты?
6. Какие способы подготовки хряков-пробников применяют? Возможно ли замена хряка-пробника искусственным манекеном?
7. Как используют хряков-пробников (искусственных пробников) для выявления свиней в охоте?
8. Как подготовить свиноматку для осеменения? Где проводится осеменение, нужна ли фиксация животного?
9. Какие способы искусственного осеменения свиней применяют в практике? Какой необходим инструмент? В какой участок половых путей вводится сперма при осеменении?
10. Какой объем спермы необходим для осеменения свиньи? Сколько сперматозоидов подвижных должно содержаться в одной дозе для осеменения?
11. При какой температуре и как долго храниться разбавленная сперма хряков?
12. Как стерилизуется инструмент для осеменения? Что делают с использованным инструментом?

Осеменение кобыл

Диагностика течки, половой охоты и овуляции

После выжеребки половая цикличность возобновляется с 8-10-го дня (от 5 до 14 дней). Первая охота короче - 2-4 дня, а последующие длятся в среднем 5-6 дней.

В стадии эструса вследствие гормонального влияния яичников усиливаются кровоснабжение и гиперемия половых органов, канал шейки матки приоткрывается и в него можно ввести сначала один, а затем и два пальца. Шейка матки укорачивается по длине и принимает по отношению к влажной центральной положение. Количество слизи увеличивается, она становится более водянистой и прозрачной. К концу этой стадии слизь приобретает мутноватый цвет и вязкую консистенцию.

Признаки охоты хорошо выражены, вульва набухает, отмечается мигание половой щели. При этом кобыла открывает и закрывает половую щель, поднимает хвост, выпячивает клитор и испускает небольшое количество мочи и слизи. Во время охоты кобылы сильно возбуждены, непослушны, щекотливы, часто ржут. Услышав или увидев жеребца, они принимают позу для спаривания (рис. 49). Во время садки жеребца стоят спокойно.

На протяжении всего этого периода степень проявления признаков охоты прогрессирующе увеличивается. Поэтому различают несколько степеней охоты. *Охота первой степени:* при приближении жеребца кобыла стоит спокойно, однако не проявляет других признаков. *Охота второй степени:* кобыла допускает жеребца, поднимает хвост, отмечается мигание половой щели. *Охота третьей степени:* те же признаки и выделение мочи и слизи в момент мигания половой щели. *Охота четвертой степени:* в дополнение к перечисленным признакам - при обнюхивании жеребцом кобыла клонится в его сторону, раскидывает тазовые конечности, во время садки стоит спокойно.

По мере нарастания признаков охоты в яичниках происходит созревание фолликулов. Ректальной пальпацией можно определить степень их зрелости. *Вначале созревания* фолликула (диаметр 1-1,5 см) яичник принимает форму неправильного боба за счет увеличения одной его стороны; эта часть проявляет признаки незначительного размягчения. *Созревающий* фолликул приводит к увеличению яичника и изменению его формы до грушевидной; в самом фолликуле заметна флюктуация жидкости. *Почти зрелый* фолликул шарообразный, хорошо флюктуирует и придает яичнику явную грушевидную форму. *Полностью созревший* фолликул имеет форму шара, стенки его истончены, флюктуация легко ощущается. *При овуляции* напряженность стенок фолликула ослабевает, уменьшается его размер и изменяется форма. После окончания овуляции сильно уменьшается в размерах и яичник. Происходит овуляция примерно за одни-двое суток до окончания охоты.

В период осеменения необходимо у всех кобыл охоту выявлять не реже, чем через день, но лучше ежедневно, чтобы не пропустить тех животных, у которых она продолжается всего 2-3 дня. Для выявления охоты используют жеребца-пробника. Пробу проводят под контролем человека. Для этого раскованную на задние конечности кобылу выводят в открытый двор, держат ее под уздцы. Пробника (не имеющего племенной ценности здорового энергичного жеребца) подводят на двух длинных поводках к кобыле спереди. Если кобыла стоит спокойно, то пробника постепенно допускают к паху, а затем и к крупу кобылы. При отсутствии охоты кобыла уже при первом контакте с жеребцом проявляет агрессивность, поворачивается быстро к нему задом и стремится ударить его ("отбивает"). Кобыла в охоте проявляет характерные признаки, соответствующие степени охоты.

Пробу подсосных кобыл целесообразнее проводить через деревянный барьер длиной 2,5 м и высотой 1,2-1,3 м. Жеребца ставят с одной стороны барьера, а кобылу - с другой.

Для выявления половой охоты без жеребца-пробника используют акустические (звуковое подражание заигрывания жеребца) и тактильные стимулы (пальпация области холки, боков и половых органов). Они позволяют определить состояние эструса (спокойное поведение, поднятие хвоста, мигание половой щели и выделение слизи, раскидывание задних конечностей) или диэструса (нервозность, лягание и ржание).

Оптимальное время осеменения. После выявления признаков охоты проверку продолжают ежедневно, чтобы определить оптимальное время осеменения. Осеменяют первый раз кобыл при ярком проявлении признаков охоты (3 и 4-я степени) и затем повторяют осеменение через каждые 36-48 часов до затухания признаков охоты. Такие длительные промежутки между осеменением возможны благодаря тому, что сперматозоиды жеребца сохраняют способность к оплодотворению в половых путях кобылы до 140 часов. Если пальпацией определяют степень зрелости фолликула, то первое

осеменение проводят при наличии почти зрелого или полностью созревшего фолликула; повторно осеменяют через 1-2 дня, если овуляция не наступила.

Способы осеменения.

При осеменении кобыл сперму вводят в матку (маточный метод осеменения). В практике применяют два способа введения спермы: мануальный и визуальный.

При *мануальном* способе (рис. 49) используют резиновый катетер И.И. Иванова и шприц емкостью 30-50 мл или ампулу. Катетер представляет собой толстостенную мягкую резиновую трубку с узким внутренним каналом. Передний конец его сужен, а задний имеет выступ в виде кольца и расширенное отверстие канала для соединения с канюлей шприца. Катетер вводят рукой во влагалище кобылы. Указательным пальцем находят устье шейки матки и под контролем пальца продвигают катетер в канал шейки матки на глубину 10-12 см. К катетеру присоединяют шприц со спермой и, нажимая на поршень, вводят сперму в матку.

При *визуальном* способе используют стеклянный или эбонитовый катетер длиной 50 см, шприц и влагалищное зеркало. Обеззараженное влагалищное зеркало вводят в половые пути и размещают его так, чтобы хорошо видна была шейка матки. Под контролем зрения катетер через зеркало направляют в цервикальный канал. После введения в матку к стеклянному катетеру присоединяют посредством резиновой муфты шприц. Эбонитовый катетер с канюлей шприца соединяют заранее при помощи металлического хомутика с резиновой прокладкой.

Перед осеменением кобылу заводят в специальный станок или же фиксируют с помощью случной шлеи. Спокойных животных удерживают за повод и поднимают переднюю ногу, чтобы они не могли ударить оператора по искусственному осеменению. Конюх забинтовывает хвост кобылы и отводит в сторону; вульву обмывает теплой водой и вытирает насухо ватой. После этого оператор при участии помощника, который подает ему инструменты для осеменения, проводит осеменение кобылы.

Для осеменения одного животного используют от 20 до 40 мл спермы. Крупным, старым, а также ожеребившимся кобылам следует вводить максимальную дозу спермы.

Организация осеменения в хозяйствах.

В хозяйствах осеменение кобыл практикуется редко, хотя каких-либо особых условий для его проведения не требуется. Государственные заводские конюшни, которые содержат высококлассных племенных жеребцов-производителей, могут организовывать основные пункты искусственного осеменения, получать сперму и разбавлять ее для хранения при 4°C в течение 48 часов, или же замораживать и хранить в жидком азоте. Заготовленная сперма может быть использована для осеменения кобыл в хозяйствах по их заявкам.

Вопросы:

1. В какой период года проявляется половая цикличность у кобыл? Когда после родов наступает первая охота?
2. Какова продолжительность охоты? Одинаково ли проявление признаков охоты всем протяжении ее? Когда происходит у кобыл овуляция относительно охоты?
3. Способы и режим выявления половой охоты? Каким способом можно определить время приближения овуляции?
4. Как подготовить кобылу для осеменения? Где проводится осеменение, как зафиксировать животное? В какой период охоты осеменяют их? Кратность осеменения?
5. Какие способы осеменения кобыл применяют в практике? Какой необходим инструмент? В какой участок половых путей вводится сперма при осеменении?
6. Какой объем спермы необходим для осеменения кобылы? Сколько сперматозоидов подвижных должно содержаться в одной дозе для осеменения?
7. Какие способы хранения разбавленной спермы жеребцов применяют в практике?

Осеменение сельскохозяйственных птиц

Цель занятий: ознакомление с техникой получения спермы от самцов птиц и оценкой качества ее, составом сред для разбавления спермы, организацией и техникой осеменения самок.

Объекты исследований, материалы и оборудование: петухи, индюки, гусаки, куры, индейки, гусята; станок с металлической сеткой для фиксации индейки, столик передвижной; электрический спермосборитель, вакуумные и обычные спермоприемники; стеклянные флаконы емкостью 15-20 мл с резиновыми пробками; микроскопы, обогревательные столики, предметные и покровные стекла; дозаторы пипеточные (глазные пипетки) или стеклянные палочки; инструмент для осеменения (стеклянные и полиэтиленовые пипетки с полиэтиленовыми или резиновыми баллончиками, микро-шприц или шприц полуавтомат для осеменения овец с укороченным катетером; стерильный физиологический раствор, раствор фурацилина, 70%-ный спирт, натрия хлорид, калия хлорид, кальция хлорид, магния хлорид, натрия ацетат, натрий двузамещенный фосфорнокислый, калия цитрат, натрий глютаминовокислый, фруктоза, глюкоза, дистиллированная вода; спиртовые тампоны, сухие ватные тампоны; полотенце, стерильные марлевые и бумажные салфетки; анатомический пинцет.

Методические указания. Занятие проводят в лаборатории кафедры, в учебном пункте или на одной из близлежащих птицефабрик. Сначала преподаватель объясняет студентам технику получения спермы, знакомит с методами оценки качества ее и инструментом для осеменения, демонстрирует технику осеменения самок птиц. Затем студенты небольшими группами (2-4 человека) самостоятельно готовят инструмент, среду для разбавления спермы, получают сперму и разбавляют ее, выполняют процедуру осеменения птиц. При проведении занятия на птицефабрике студенты знакомятся со всеми технологическими процессами метода последовательно в составе производственных групп.

Искусственное осеменение птиц применяют для уменьшения числа самцов при получении яиц для инкубации и повышения выводимости цыплят (индюшат, гусят), для снижения распространения инфекций половым путем, а также для предупреждения повреждений самок в процессе естественного спаривания, при котором отход маточного поголовья, например индеек, в течение года вследствие нанесения травм самцами достигает 20-30%. При искусственном осеменении, кроме того, можно замораживать сперму самцов и длительное время сохранять отдельные линии и породы птиц.

Получение спермы. Для получения спермы от самцов птиц предложены различные методы (спермосборителя, электроэякуляции, искусственной вагины), однако наиболее удобным и эффективным оказался метод массажа живота.

Получение спермы от петухов. Петухов изолируют от самок и через 15-20 дней начинают приучать к ручному массажу. Перед получением спермы клоаку освобождают от каловых масс и протирают ее стерильной марле-

вой салфеткой. Затем помощник ставит петуха на стол, придерживая левой рукой в области груди. Одновременно ладонью правой руки поглаживает несколько раз спину его от последних шейных позвонков до корня хвоста. На поглаживание петух реагирует подниманием хвоста. После этого левой рукой фиксирует конечности петуха и берет его под мышку. Правой рукой нажимает на заднюю часть брюшной стенки петуха, что приводит к выпячиванию клоаки. Техник подставляет стерильный спермоприемник (флакон, широкоую короткую пробирку) к клоаке петуха, а другой рукой слегка надавливает на нее с обеих сторон и делает массирующие движения. Это вызывает эрекцию копуляторного органа и эякуляцию. Сперма медленно стекает в подставленный спермоприемник.

Получают сперму от петухов один раз в день или через день. Объем эякулята у самцов различных пород колеблется от 0,2 до 0,9 мл, чаще 0,2-0,5 мл. Концентрация сперматозоидов в сперме 3,0-3,5 млрд. в мл.

Получение спермы от индюков. Подготовку самцов начинают за 1,5 месяца до намеченного срока осеменения. Их переводят на рационы племенного периода; продолжительность светового дня увеличивают с 7-8 ч. до 14 ч. в сутки. Используют индюков с 8-месячного возраста. Получают сперму методом ручного массажа. Индюка помещают на специальный столик (станок) в горизонтальном положении. Оператор-массажист левой рукой фиксирует его так, чтобы кисть руки была свободной; потом кистями обеих рук в течение нескольких секунд делает легкий двусторонний массаж вдоль лонных костей по направлению от грудной клетки к хвостовой части. Техник по взятию спермы в это время при помощи анатомического пинцета проводит обработку клоаки и области вокруг нее стерильным ватным тампоном, смоченным 0,02%-ным раствором фурацилина, а после - сухим тампоном. Затем оператор-массажист ребром правой ладони делает 8-10 легких ударов по задней мягкой части живота. Техник в это время большим и указательным пальцами правой руки поглаживает вокруг клоаки самца, а затем сжимает с боковых сторон кольцо клоаки до появления копуляторного органа и извержения спермы.

На ряде птицефабрик сперму получают на специальном столике, который на роликах передвигается вдоль рядов клеток, где содержатся самцы. Плоскость столика находится на уровне пола клетки. Перед взятием спермы индюка извлекают из клетки и ставят на стол. При легком поглаживании мягкой части живота у приученного, натренированного индюка появляется половое возбуждение, эрекция и эякуляция. Чтобы получить большие эякуляты, техник по взятию спермы должен производить пальцами движения вокруг копуляторного органа, имитирующие выдавливание. На получение спермы от одного самца затрачивается около одной минуты.

Более часто для получения спермы от индюков используют специальные станки (рис. 50). В станке, используемом на птицефабриках СНГ, имеется углубление длиной 25 см, шириной 22 см, глубиной 12 см. В углубле-

нии фиксируют индейку и накрывают ее щитком (30x30 см, высотой 12 см), изготовленным из проволочной сетки. Щиток прикреплен к столу одной из боковых сторон и свободно откидывается. Он предохраняет индейку от травм, которые может нанести самец в момент проявления рефлекса топтания. На столик помещают индюка. При виде самки индюк возбуждается и делает попытку к спариванию. После этого у него слегка массируют мягкую часть живота или вокруг клоаки. Это способствует подготовке половых органов к эякуляции (рис. 50). В момент эрекции и появления копуляторного органа техник большим и указательным пальцами левой руки надавливает на него с боков. В правой руке он удерживает вакуумный или обычный стеклянный спермоприемник, в которые собирается сперма при эякуляции. Выделение спермы происходит обычно через 35-40 секунд после начала подготовки самца.

Вакуумный спермоприемник состоит из термостабильной пробирки (сосуда), резиновой пробки с двумя отверстиями, двух термостабильных стеклянных трубок, изогнутых под углом 90°, резинового шланга длиной 70 см и стеклянного мундштука.

После 2-3 процедур у самцов вырабатывается условный рефлекс на массаж и для получения спермы достаточно манипуляций, связанных с обработкой клоаки. Сначала от самца получают 0,05-0,15 мл спермы, а после выработки условного рефлекса - 0,3-0,4 мл. Максимальный объем одного эякулята достигает 1,25 мл.

Индюков, у которых не удается выработать условного рефлекса на массаж, стимулирующего эякуляцию (3-5%), а также выделяющих сперму низкого качества, выбраковывают. Сперму получают не более двух раз в неделю.

Сперму у гусаков получают также, как и у индюков. Гусаки выделяют 0,1-1,3 мл спермы с концентрацией 0,3-0,9 млрд. сперматозоидов в 1 мл.

Оценка качества спермы. Для оценки спермы определяют ее внешние свойства (цвет, консистенцию), объем, густоту, подвижность и концентрацию сперматозоидов. Объем эякулята определяют по верхнему мениску градуированного спермоприемника или градуированной пипеткой. Цвет и густоту спермы определяют визуально.

У индюка *густая сперма* имеет консистенцию сметаны; в 1 мл содержит 8 млрд. сперматозоидов или более. Она почти не стекает по желобку копуляторного органа, в массе своей имеет выпуклую форму. *Средняя сперма* с консистенцией густых сливок, медленно стекает по желобку толстым слоем; в 1 мл 6-8 млрд. клеток. *Редкая сперма* с консистенцией густого молока или редких сливок, тонким слоем стекает быстро по желобку; в 1 мл содержит 3-5 млрд. сперматозоидов.

Подвижность сперматозоидов оценивают под микроскопом, нередко в смешанных эякулятах (от 7-10 самцов), а концентрацию - путем подсчета в счетной камере и с помощью ФЭК или спектрофотометра. Вследствие высокой концентрации оценка подвижности сперматозоидов по 10-балльной сис-

теме затруднена. Н. Канарейкин (1975) использовал 6-балльную систему оценки качества спермы индюков: 1 балл - движение сперматозоидов настолько энергично, что едва можно различить отдельные клетки; 2 балла - движение сперматозоидов энергичное, но можно различить отдельные клетки; 3 балла - движение спокойное поступательное; 4 балла - слабое (ленивое) замирающее движение; 5 баллов - слабое колебательное движение; 6 баллов - сперматозоиды неподвижные. Для осеменения рекомендует использовать сперму индюков с оценкой 1 и 2 балла.

Разбавление спермы. Оплодотворяющая способность свежеполученной спермы птиц сохраняется не долго. Сперму петухов и индюков можно использовать в течение 30 мин., а чтобы обеспечить стабильно высокие результаты выводимости цыплят и индюшат - ее используют в течение 15-20 минут. После разбавления сперму можно хранить до 2-3 часов. Для разбавления используют несколько сред (табл. 6). Разбавляют сперму 1:1 - 1:3.

Таблица 6

Состав сред для разбавления спермы птиц

Наименование реактива	ВИРГЖ-2	Лейка	Тироде
Натрия хлорид	-	-	0,8
Калия хлорид	-	-	0,02
Кальция хлорид	-	-	0,02
Магния хлорид	-	0,0676	0,01
Натрия ацетат	-	0,613	0,1
Натрий двузамещенный фосфорнокислый	-	-	0,005
Калия цитрат	-	0,128	-
Натрий глутаминовокислый	2,8	1,92	-
фруктоза	-	1,0	1,0
Глюкоза	1,8	-	-
Дистиллированная вода	100 мл	100 мл	100 мл

Искусственное осеменение кур. Осеменяют кур, как правило, во второй половине дня, после яйцекладки. Для введения спермы используют индивидуальные стеклянные или полиэтиленовые пипетки с полиэтиленовым или резиновым баллончиком, длиной 100-150 мм и диаметром 6-7 мм. Удобен и микрошприц (шприц-полуавтомат) для осеменения овец с укороченным напополам катетером. Осеменение обычно проводят вдвоем. Помощник берет курицу и не вынимая из клетки фиксирует левой рукой за хвост, несколько отгибая его к спине. Правой рукой надавливает на левую сторону живота между лонными костями и задним концом грудной кости. После того как клоака курицы начнет выпячиваться, техник левой рукой слегка растягивает ее, надавливает вокруг, пока не покажется отверстие яйцепровода. Затем вводит пипетку со спермой в канал яйцепровода на глубину 4-5 см. В этот момент помощник прекращает давление на живот курицы и убирает руку.

Для осеменения используют свежеполученную или разбавленную сперму в дозе 0,025-0,03 мл, с содержанием в дозе не менее 100-150 млн. сперматозоидов и подвижностью не ниже 7 баллов. При первом осеменении вводят двойную дозу

(0,05 мл), чтобы создать хорошую насыщенность яйцепровода сперматозоидами. Повторно осеменение проводят через каждые 5 дней.

Искусственное осеменение индеек. Осеменяют индеек при помощи шприца-полуавтомата, который применяют для осеменения овец, или индивидуальных пипеток из стекла или полистирола. Повторно употреблять пипетки можно после тщательного промывания их и стерилизации. Для осеменения индейки помощник техника прочно фиксирует ее левой рукой за обе ноги и надавливает на живот. Правой рукой заворачивает хвост на спину; при этом голова птицы должна находиться внизу. Техник левой рукой выворачивает клоаку до появления отверстия яйцепровода и вводит пипетку со спермой в канал его на глубину 4-5 см. В момент введения спермы помощник отпускает хвост индейки и несколько ослабляет общее фиксирование. Сперму выдавливают из инструмента только после того, как яйцепровод втянется в брюшную полость. Затем не разжимая пальцев на резиновом наконечнике пипетки извлекают ее из клоаки индейки. Индейку осторожно опускают на пол.

Первое осеменение индеек в стаде проводят через 14-17 дней после начала подготовки к яйцекладке и затем осеменяют еще дважды через 3-4 дня. После этого в течение 3-х месяцев яйцекладки осеменяют самок через 10-14 дней. В течение 4-5-го месяца интервалы между осеменением уменьшают до 9-10 и 8-10 дней, а в течение 6-го месяца осеменяют еженедельно. Оптимальная доза разбавленной 1:1 или неразбавленной спермы - 0,025 мл.

Осеменение гусынь проводят в специальном станке (табуретка с широким желобом) во второй половине дня. Помощник держит птицу левой рукой у основания крыльев, а правой рукой слегка отгибает хвост. Техник вводит в клоаку гусыни указательный палец правой руки в перчатке и нащупывает отверстие яйцепровода, которое расположено левее и ниже входа в клоаку на 2-4 см. Затем вводит в его канал пипеткой 0,05 мл неразбавленной спермы с содержанием в ней 30-50 млн. подвижных сперматозоидов. Осеменение проводят каждые 6 дней.

Сперматозоиды у птиц размещаются в складках яйцепровода и сохраняют способность к оплодотворению у кур в течение 12-14 дней, у индюшек - 30-40 дней.

Учет и отчетность на племпредприятиях и пунктах искусственного осеменения сельскохозяйственных животных

Цель занятий: ознакомиться с формами учета производственной деятельности племпредприятий, районных станций и пунктов искусственного осеменения.

Объекты исследований, материалы и оборудование: инструкция по взятию, оценке и замораживанию спермы быков-производителей на племпредприятиях (1998 г., РБ), инструкция по организации и технологии работы предприятий и пунктов по искусственному осеменению сельскохозяйственных животных; инструкция по искусственному осеменению и воспроизводству стада в скотоводстве (1999 г., РБ); инструкции по искусственному осеменению коров, овец, свиней, кобыл; журналы и бланки форм учета на племпредприятиях и пунктах искусственного осеменения животных; календари оператора по искусственному осеменению, другие формы оперативного учета и контроля воспроизводительной функции животных и результатов осеменения их; персональный компьютер, оснащенный соответствующими программами для ведения учета.

Методические указания.

Занятие проводится в лаборатории кафедры или учебном пункте. Студентов обеспечивают бланками форм учета и отчетности. Преподаватель знакомит студентов с содержанием журналов, бланков и пра-

вилами заполнения их и внесения соответствующих данных в компьютер. Затем студентам выдается задание и они заполняют под руководством преподавателя необходимые данные по учету и отчетности. С отдельными документами и правилами оформления их студентов знакомят во время посещения племпредприятия.

Документы, которые отражают производственную деятельность племпредприятия и пунктов искусственного осеменения животных в зоне его деятельности, хранятся в отдельных папках. Данные основных документов вносятся в память компьютера и записываются на дискеты.

В папке индивидуального учета производителя находятся: фотография производителя; племенное свидетельство; заводская карточка; журнал учета использования производителя и показателей спермопродукции (форма № 1-ио); ветеринарный паспорт производителя (форма № 13-ио); акты перевода производителя из младшей в старшую группы, о выросте и выкупе, результаты испытания по качеству потомства. В ветеринарном паспорте отражаются данные о состоянии здоровья животного, ветеринарных диагностических исследованиях, обработках и др.

По каждому производителю предприятие ведет лабораторный журнал учета качества спермы (форма № 2-ио) с приложением ведомостей на отправку спермы в хозяйства. В этот журнал заносят данные по всем эякулятам не зависимо от их качества, а также о времени взятия их. Данные журналов №№ 1 и 2-ио заносятся также в компьютер.

На пункты хозяйств сперму производителей доставляют с сопроводительным документом - *ордером* (накладной) на отправку спермы (форма № 3-ио), который составляют в двух экземплярах. На лицевой стороне ордера приводятся сведения о производителе, количестве и качестве спермы. На обратной стороне документа оператор по искусственному осеменению вносит данные о животных, осемененных этой спермой, а также о ее качестве. Такие сведения обычно представляются на отдельных листах в районную станцию.

Форма № 4-ио - *график доставки спермы* производителя на пункты искусственного осеменения. Обычно используется в случае краткосрочного хранения спермы и необходимости регулярной доставки ее на пункт осеменения. В отдельности по каждому хозяйству племпредприятие (районная станция) ведет *ведомость учета использования спермы* производителя (форма № 5-ио), в которой указывается число осемененных животных и общий расход спермы на осеменение. На каждого производителя в конце года составляется *сводная ведомость учета искусственного осеменения маток по оплодотворяющей способности спермы* (форма № 6-ио). Данные ведомости являются основанием для оценки производителя по плодовитости (воспроизводительной способности). По данным, предоставляемым пунктами искусственного осеменения, районные станции по племенной работе и искусственному осеменению ведут *картотеку* искусственного осеменения коров и телок по каждому обслуживаемому хозяйству.

Оплодотворяемость коров и телок определяют путем ректального исследования животных, по результатам которого составляется специальный акт (форма № 8-ию) с приложением списка животных. Данные проверки сводят в ведомости (форма № 9-ию).

Племпредприятие ведет также: *папку с документами по закреплению производителей за хозяйствами* и сроками их использования; *папку с договорами*, заключаемыми между племпредприятием и сельхозпредприятиями, отдельными фермерами; *папку с планами искусственного осеменения животных* в хозяйствах зоны обслуживания племпредприятия; *папку с ведомостями учета использования спермы* производителей и вторыми экземплярами ордеров на сперму; *папку с результатами анализов* кормов, воды, крови, бактериальной загрязненности спермы, смывов из препуция и др.

Ежегодно племпредприятие (районная станция) заключает с каждым хозяйством своей зоны *договор на проведение искусственного осеменения*, который подписывают директор племпредприятия (районной станции) и руководитель хозяйства. В договоре излагаются обязательства каждой из сторон. Племпредприятие обязуется организовать в хозяйстве искусственное осеменение животных, своевременно обеспечивать пункты спермой закрепленных за ними производителей и снабжать их хладагентом (жидким азотом), инструментами и оборудованием для осеменения; оказывать содействие хозяйству в приобретении (или поставлять) термосов и сосудов Дьюара, в подготовке и переподготовке операторов по искусственному осеменению, организации зооветеринарного контроля воспроизводства животных; осуществлять систематический контроль за результатами осеменения животных и ведением племенной работы.

Хозяйство обязуется подготовить и оборудовать помещение для пункта (лаборатории); выделить (подготовить) специалиста для работы на пункте и снабдить его транспортным средством; вести точные записи осеменения животных и своевременно представлять отчеты о результатах осеменения; приобретать необходимые инструменты, материалы, оборудование; своевременно выплачивать племпредприятию названную в договоре сумму за каждую дозу спермы (за осемененную и оплодотворенную самку).

На каждом пункте искусственного осеменения крупного рогатого скота необходимо иметь *книгу учета осеменений* (журнал искусственного осеменения). Оператор по осеменению животных обязан ежедневно, сразу же после осеменения самки сделать в книге (журнале) соответствующую запись. Эти записи могут дублироваться на компьютере. О результатах своей работы оператор должен отчитываться ежемесячно.

На пункте искусственного осеменения овец и коз помимо *журнала искусственного осеменения*, в который ежедневно вносятся данные об осеменении всех овец по каждой отаре в отдельности, должна быть *ведомость прикрепления маток к производителю*, *карточки по учету использования баранов-производителей* с регистрацией качества полученной спермы, ор-

дера на отправку спермы, бланки отчета о ходе искусственного осеменения.

На пункте искусственного осеменения свиней также ведется журнал искусственного осеменения, в который вносятся данные о всех выявленных в охоте и осемененных животных, в том числе и повторно. В лабораторный журнал учета качества спермы вносятся сведения о времени получения, качестве, степени разбавления и использовании спермы производителя, а также об осемененных свиноматках.

Аналогичные журналы и документы ведутся на пунктах искусственного осеменения кобыл (случной журнал, форма № 3; карточка кобылы, форма № 2 и журнал использования жеребца, форма № 1).

Для своевременного выявления охоты у коров и осеменения их операторы по искусственному осеменению используют специальный календарь. Вместо календаря можно рекомендовать по каждой хозяйственной группе коров вести ведомость отелов и осеменения их на листах бумаги или в компьютере.

Календарь оператора можно сделать из брезента, полотна, фанеры или плотного картона размером 100x55 см. На лист такой величины нашивают (прикрепляют) 32 кармана размером 12x12 см. Можно календарь сделать из дерева или пластика (рис. 51). В верхних трех рядах делают по 7 передвижных, а в четвертом нижнем ряду устанавливают 15 неподвижных ящичков. Двенадцать неподвижных ящичков рассчитаны на месяцы в году, тринадцатый - для карточек ветврачу, четырнадцатый - для карточек выбраковываемых коров и пятнадцатый - контрольный.

На каждую корову и телку изготавливают карточку. Ежедневно оператор вносит в карточки сведения об отелившихся животных. Такие карточки он помещает в ящичек календаря, который будет соответствовать дате предполагаемой охоты (можно с 18 дней после отела). Например, коровы № 824 и 2400 отелились 26 марта, их карточки оператор помещает в передвижной ящичек с цифрой 13 (13 марта). Если наблюдением в этот день охота у животных не выявлена, карточки перекадывают в следующий карманчик (14) и т.д. Если корова не проявит половую охоту в течение 20-22-х дней (т.е. до 40 дней после отела), ее карточку помещают в карманчик "Ветврачу". В этот ящичек помещают и карточки коров с акушерскими и гинекологическими болезнями. Карточки животных осемененных и не проявивших повторно охоту в течение 50-75 дней помещают в контрольный ящичек (для диагностики стельности). Карточки стельных коров помещают в ящички по месяцам года исходя из предполагаемого срока отела.

Широко практиковалось ранее ведение специальных карточек, в которых отражались данные об отеле и приплоде, продуктивности коров, о заболеваниях и лечении их, датах осеменения и результатах исследования на стельность. Данные легко можно было перенести в ведомость. Многие фермеры за рубежом и ныне предпочитают такие ведомости более сложным

формам учета. Правильно и постоянно заполняемая ведомость позволяет не только контролировать сроки осеменения, но и быстро и в любой момент определить основные показатели плодовитости по каждому животному и в среднем по стаду.

Нами (Медведев Г.Ф., Экхорумвен О.Т., Блохин Н.Г., 2001) приспособлены и успешно используются такие ведомости для анализа и контроля воспроизводительной функции коров в племсовхозе им. Чкалова.

Племсовхоз им. Чкалова

Доярка: Автоменко

Оператор по искусственному осеменению Капустин В.Н.

Корова	Лактация	Дата отела	Дата наблюдения охоты	Производитель	Планируемое осеменение	От отела до 1-го осеменения, дней	Дата 1-го осеменения	Интервал между осеменением	Дата 2-го осеменения	Интервал между осеменением
824	1	13.10.99	07.11.99		27.11.99	47	29.11.99	44	12.01.99	39
2400	9	28.12.99			11.02.00	52	18.02.00	21	10.03.00	

Дата 3-го осеменения	Интервал между осеменением	Дата 4-го осеменения	Интервал между осеменением	Дата 5-го осеменения	Интервал между осеменением	Дата 6-го осеменения	Число осеменений	Сервис период	Дата запуска	Заболевания, осложнения, назначаемое лечение
20.02.99	20	12.03.99					4	150		Эндометрит
							2	73		

ТРАНСПЛАНТАЦИЯ ЗАРОДЫШЕЙ

Оплодотворенная яйцеклетка попадает в матку и развивается там до состояния зрелого плода. Развитие яйцеклетки при удачной трансплантации (пересадке) может происходить и в матке другого животного (реципиента), если в момент пересадки стадии полового цикла коровы - донора эмбрионов и реципиента совпадают.

Впервые пересадка зародышей была осуществлена Хиппом в 1890 году у крольчих. С тех пор работы в этом направлении проводились и на других видах животных и это сделало трансплантацию зародышей одним из фундаментальных методов исследования воспроизводительной функции, в частности, процессов оплодотворения и беременности. В настоящее время трансплантация зародышей имеет огромное практическое значение. Во многих странах функционируют коммерческие центры по трансплантации зародышей крупного рогатого скота и других животных.

Цель занятий: познакомить студентов с основными приемами (процессами) метода трансплантации зародышей сельскохозяйственных животных.

Объекты исследований, материалы и оборудование: коровы-доноры зародышей и телки реципиенты (другие животные); станки для фиксации животных; оборудование и инструменты для извлечения и пересадки зародышей; микроскопы МБС-9 или МБС-10, инвертированный микроскоп “Labovert” или стереомикроскопом “Nikon”; микроманипулятор ПМ-2 или манипулятор французской фирмы “JMV” марки REF-4080; стеклянная микропипетка-игла; термостат, бытовой холодильник, сушильный шкаф, автоклав, бактерицидные лампы, шприцы для инъекций; сосуд Дьюара, жидкий азот, замораживатель эмбрионов ЗЭМ 4; среда Дюльбекко, фетальная сыворотка, глицерин, этиленгликоль; пенициллин, ампициллин, гентамицин или другие антибиотики; гонадотропины (FSG-P, ФСГ-СУПЕР, фоллигон и др.), простагландины, миорелаксанты, 2%-ный раствор новокаина, этиловый спирт 96%-ный, спиртовые тампоны, стерильный вазелин; чашки Петри одноразовые различного диаметра, стекла часовые, соломины для замораживания зародышей.

Методические указания.

Проводится два занятия: одно в лаборатории кафедры, другое в биотехнологическом центре (на пункте трансплантации зародышей) или на ферме.

На первом занятии преподаватель знакомит студентов с методом трансплантации зародышей у крупного рогатого скота и других животных, его основными технологическими элементами (приемами), значением для селекции и воспроизводства животных, масштабами применения в Республике Беларусь и других странах. Демонстрирует инструменты, оборудование, материалы, применяемые при трансплантации зародышей, и объясняет правила их подготовки и использования. Затем знакомит с методами вызова суперовуляции у коров-доноров и подготовки реципиентов. После этого вместе со студентами определяется место и план работы, назначаются ответственные студенты за выполнение каждого технологического элемента.

Второе занятие планируют так, чтобы оно совпало с 7 или 8-м днем после осеменения коровы-донора. Для этого заранее вне занятий назначенные студенты под контролем специалиста или преподавателя инъецируют отобранной корове гонадотропин и простагландин согласно схемы их применения, вызывая суперовуляцию. Одновременно проводят работу по отбору телок-реципиентов и синхронизируют у них охоту. В процессе занятия преподаватель объясняет студентам правила подготовки коровы-донора и телок реципиентов к соответствующим процедурам, знакомит их с методикой извлечения зародышей, отыскания их и оценки качества, условиями кратковременного хранения или замораживания, техникой пересадки реципиентам. После этого определяют у коровы-донора степень реакции яичников на гонадотропины и выполняют все процедуры метода трансплантации зародышей.

Вопросы:

1. Как используется трансплантация зародышей в разведении крупного рогатого скота? Каково значение, масштабы использования этого метода и какие достижения?
2. Какие гормональные препараты используются для стимуляции суперовуляции у коровы?
3. Кратность введения и дозы ГСЖК и ФСГ при стимуляции суперовуляции?
4. Как синхронизировать половые циклы коровы-донора эмбрионов и животного реципиента?
5. Какие инструменты используются для извлечения и пересадки зародышей у коров?
6. Сущность нехирургического способа извлечения и пересадки зародышей? На какой день после осеменения коровы-донора производят извлечение зародышей? Объяснить.
7. Как оценивают зародыши? В течение какого срока их можно хранить до пересадки?
8. Как можно сохранить зародыши в течение длительного срока?

9. Как часто можно вызывать у коровы-донора суперовуляцию?

10. Сколько телят трансплантатов можно получить за год от одной коровы-донора?

Стимулирование суперовуляции у коров-доноров

Трансплантация зародышей может быть эффективной в том случае, когда за один прием от донора будет получено по крайней мере несколько половых клеток. А это возможно только в результате искусственного стимулирования суперовуляции.

Вызвать суперовуляцию можно путем применения гонадотропина СЖК или очищенного ФСГ. Эти гормоны применяют в отдельности или в комплексе с гонадотропин-рилизинг гормоном, простагландином, эстрогенами, хорионическим гонадотропином.

Существуют два основных способа вызова суперовуляции с помощью ГСЖК (фоллигон, сергон, прегмагон и др. препараты).

Ирландский способ (по Т. Greve, 1977).

Дни цикла:

16 или 17	1500-3000 ЕД ГСЖК внутримышечно (в/м);
19 или 20	10 мг эстрадиола-бензоата в/м;
21	Половая охота; 1500-3000 ЕД хорионического гонадотропина (ХГТ) в/м.
1	Первое осеменение
2	Второе осеменение
5	Хирургическое извлечение зародышей
6-8	Нехирургическое извлечение зародышей

Датский способ (по N.O. Rasbech, 1976)

Дни цикла:

8-12	1500-3000 ЕД ГСЖК в/м;
10-14	25 мг ПГ Ф2 альфа или 500 мкг клопростенола в/м. Через 48 часов:
0	половая охота.
1	Первое осеменение
2	Второе осеменение
6-8	Нехирургическое извлечение зародышей.

Будевич И.И., Н.Ф. Жук и А.И. Будевич* рекомендуют вводить сергон или прегмагон в середине цикла (11 или 12-й день) в дозе 2500-3000 МЕ, а эстрофан через двое суток в дозе 3 мл (750 мкг клопростенола). Через 48 час. (т.е. в день охоты) инъектировать диригистран (гонадорелин) в дозе 200 мкг при использовании сергона или через 56 час. - анти-СЖК 600 МЕ при использовании прегмагона. Осеменять животных в 20 и 19 час. в день охоты и в 8 и 7 час. на следующий день. Извлекать зародыши на 7-й день. (*Эти и ниже цитируемые сведения предоставлены лично авторами).

Гонадотропин СЖК оказывает более продолжительное действие, чем эндогенный или экзогенный ФСГ, а соотношение ФСГ и ЛГ в различных сериях препарата неодинаково. В результате гормональной обработки нередко отмечается увеличение массы яичников, образование после овуляции различного числа и разной величины желтых тел. Высока изменчивость числа овуляций, иногда низкий выход качественных эмбрионов. Для предотвращения нежелательных явлений вводят дополнительно антисыворотку

на СЖК. Эстрогены вводятся для повышения оплодотворяемости, а ХГТ и простагландины для ускорения овуляции.

Главное достоинство применения ГСЖК для вызова суперовуляции - однократное введение животному всей дозы препарата. Однако более стабильные результаты получают при использовании очищенного ФСГ, получаемого из гипофиза свиней или кобыл. Общая доза на обработку препарата ФСГ-П (США) - от 32 до 50 мг или более. Инъецируют гормон два раза в день с промежутком 12 часов.

Дни цикла:				
8...12	утро	(8 ⁰⁰)	ФСГ-П	7 мг
	вечер	(20 ⁰⁰)	ФСГ-П	7 мг
9...13	утро	(8 ⁰⁰)	ФСГ-П	6 мг
	вечер	(20 ⁰⁰)	ФСГ-П	6 мг
10...14	утро	(8 ⁰⁰)	ФСГ-П	4 мг + клопростерол 500 мкг (эстрофан 2 мл)
	вечер	(20 ⁰⁰)	ФСГ-П	4 мг + клопростерон 500 или 250 мкг (эстрофан 2 или 1 мл)
11...15	утро	(8 ⁰⁰)	ФСГ-П	3 мг
	вечер	(20 ⁰⁰)	ФСГ-П	3 мг
12...16				
(1)			Половая охота.	Осеменение в 20 ⁰⁰
(2)				Осеменение в 8 ⁰⁰ и 20 ⁰⁰

Используют и другие схемы гормональной обработки коров-доноров эмбрионов (в течение 5 дней по 10 мг ФСГ-П, простагландин на 4-й день, начало обработки на 8-й день полового цикла; в течение 4-х дней: 15 мг, 12 мг, 10 мг и 5 мг ФСГ-П, простагландин на 3-й день и т.д.). Дозу гормона регулируют в зависимости от серии препарата, срока его хранения, индивидуальной чувствительности животных и других факторов. Препарат "ФСГ-СУПЕР" (Россия) применяют в течение 3-х дней: вводят по 7 мг (8 мг) два раза в день. Простагландин инъецируют на 3-й день. Будевич И.И., Жук Н.Ф. и Будевич А.И. рекомендуют 7 или 8 инъекций этого гонадотропина: в первый день по 9 ЕД., во второй день - по 8 ЕД., в третий день по 5 ЕД и в четвертый день одна инъекция 6 ЕД или две инъекции по 3 ЕД; эстрофан необходимо инъецировать на третий день дважды по 2 и 1 мл.

В результате применения гонадотропинов не все крупные фолликулы завершают развитие овуляцией. Присутствие в яичниках таких фолликулов может привести к нарушениям гормонального статуса доноров. С целью исключения длительной стимуляции роста фолликулов и наступления синхронной овуляции И.И. Будевич, Н.Ф. Жук и А.И. Будевич рекомендуют инъецировать в день охоты донора утром и вечером сурфагон по 20 мкг. Этот аналог ГнРГ способствует выделению ЛГ и овуляции фолликулов в фиксированное время. При 4-х дневной обработке (ФСГ-П, ФСГ-супер, ФСГ-Б) на 6-9% увеличивалось количество овуляций и на 11-19% число эмбрионов, пригодных к пересадке.

У обработанных животных число овуляций варьирует от 0 до 91, чаще 10-15. Это зависит от дозы и качества гормональных препаратов, индивидуальных особенностей животных и ряда других факторов. Увеличение дозы ГСЖК увеличивает число зрелых фолликулов, но процент овуляций

может снижаться. Большие дозы препарата нередко вызывают образование кист яичников, геморрагических фолликулов или их лютеинизацию. Некоторые животные совершенно не реагируют на введение гонадотропных гормонов; процент таких коров может достигать 20-40. В Беларуси (Брестский центр трансплантации, В.Ю. Бабенков, С.К. Буткевич) от коровы Королева черно-пестрой породы, продуктивностью более 8 тыс. кг молока после обработки ФСГ-П получено 44 зародыша, в т.ч. 42 пригодных.

В качестве коров-доноров эмбрионов отбирают ценных в генетическом отношении животных, хорошо реагирующих на введение гонадотропинов и дающих биологически полноценные зародыши. Молочная продуктивность донора за ряд лет должна быть выше стандарта данной породы в среднем на 50-60 %, а содержание жира в молоке - на 20 % и более. Используют обычно коров, имеющих не менее двух - трех лактаций, в возрасте не более 8-9 лет. После родов гормональную обработку не следует начинать ранее, чем через 2-3 месяца. До обработки животное должно проявить один-два половых цикла.

Извлечение эмбрионов.

При нехирургическом извлечении зародышей у коров катетер вводят поочередно в рога матки через шейку матки под ректальным контролем. Оптимальное время для извлечения - 7-8-й день от начала половой охоты. К этому времени большинство зародышей будет находиться в верхушках рогов матки на протяжении около 10 см от соединения матки с яйцепроводом. Используют двух- или трехходовые катетеры Фоллея (рис. 52) из латексной резины или телескопический комбинированный трехходовой инструмент с внутренним выдвигающимся эластическим катетером фирмы IMV.

Перед извлечением зародышей путем ректального исследования подсчитывают число желтых тел в яичниках коровы-донора. Наличие 10 или более желтых тел указывает на хорошую ответную реакцию животного на гормональную обработку, а менее 5 желтых тел - на слабую реакцию. Для проведения операции корову фиксируют в станке в положении стоя. Желательно, чтобы тазовые конечности животного находились несколько выше передних. Для предупреждения частой дефекации и снятия мышечного напряжения делают сакральную анестезию. В эпидуральное пространство между крестцовой костью и первым хвостовым позвонком вводят 5 мл 2 %-ного раствора новокаина. Строптивым коровам вводят внутримышечно миорелаксант (рампунь) 0,5 - 0,7 мл или маточный релаксант комбилен 0,7-1,0 мл, или ханегиф 10 мл, или аминазин 5 мл. Теплой водой с мылом моют наружные половые органы и корень хвоста, вытирают бумажными салфетками или ватными тампонами.

Металлический катетер и переходники стерилизуют кипячением, а латексный катетер обеззараживают в 96%-ном спирту, после чего промывают средой Дюльбекко. В латексный катетер затем вставляют стерильный

металлический стилет и фиксируют в замковом узле катетера. Предварительно стилет смазывают стерильным вазелином или вазелиновым маслом. Снаружи катетер также можно слегка смазать вазелиновым маслом, после чего его помещают в защитный полиэтиленовый чехол.

Катетер в чехле вводят во влагалище и направляют в канал шейки матки. Придерживая инструмент в таком положении, сдвигают полиэтиленовый чехол назад, а катетер проводят через шейку матки и направляют в один из рогов матки. При этом металлический стилет вынимают из катетера постепенно, по мере введения катетера в рог матки. Важно правильно разместить катетер в роге матки. В большинстве моделей инструментов из латексной резины баллончик для воздуха находится на расстоянии около 5 см от кончика его. На этом участке в катетере проделано с различных сторон на различных уровнях четыре отверстия для выхода и входа промывной жидкости. Желательно, чтобы кончик катетера находился на расстоянии около 6 см от соединения яйцепровода с маткой (рис. 52). В этом случае расстояние от тубо-маточного соединения до баллончика составит приблизительно 10 см. Это как раз тот участок, за пределы которого зародыши еще не вышли. Нагнетают воздух в баллончик в количестве 10-20 см³ или дистиллированную воду - 5-6 мл. При этом обязательно контролируют рукой степень наполнения его и расширение рога матки, чтобы не допустить разрыва маточной стенки.

Как только баллончик будет наполнен воздухом (водой), приступают к промыванию перекрытого (баллончиком) участка рога матки. Для этого полиэтиленовый шприц емкостью 50 мл с фосфатно-буферной средой присоединяют к катетеру и вводят осторожно 30-35 мл среды. Затем шприц отсоединяют и жидкость из матки собирают в подготовленный сосуд; при этом открытый конец катетера оберегают от загрязнения. Можно отсасывать жидкость шприцем, после чего отсоединить от катетера. Затем присоединяют другой шприц и вводят столько же среды. В момент присоединения и отсоединения шприца катетер впереди металлического замкового устройства сдавливают пальцами. С каждым последующим введением количества среды увеличивают, доводя до 50-60 мл. А всего для промывания рога матки используют 500 мл среды. Обычно пользуются несколькими шприцами, что при быстром заполнении и смене их значительно уменьшает затраты времени на промывание. Для предотвращения контакта жидкости для промывания матки с внешней средой и обеспечения асептики при извлечении зародышей при помощи двухходовых катетеров нами включен в систему: катетер - шприц дополнительно трехходовой переходник фирмы IMV, из которого предварительно извлекаются клапана и отсоединяется передняя канюля. К боковому патрубку переходника присоединяют эластичную трубку с зажимом. Свободный конец трубки помещают в сосуд для сбора поступающей из матки среды. После введения катетера в матку подготовленный переходник передним концом соединяют с замковым устройством

катетера. Задний конец переходника служит для присоединения шприца со средой. В процессе промывания при открытом зажиме на эластичной трубке среда из рога матки поступает в сосуд, не контактируя с воздухом; шприц в таком положении должен оставаться присоединенным с переходником. После закрытия зажима и сдавливания пальцами катетера производят замену освобожденного шприца другим, заполненным средой. Такое усовершенствование процедуры обеспечивает стерильность среды для промывания и предупреждает потери зародышей, что возможно при собирании поступающей из матки жидкости через открытый задний конец катетера. Можно сделать и совершенно замкнутую систему, если емкость со средой соединить трубкой (с зажимом) с задним концом переходника. В этом случае емкость должна быть расположена выше тазовой части животного, чтобы среда поступала в матку самотеком.

После использования всего объема среды (500 мл) в рог матки можно ввести шприцем 30-40 мл воздуха. Иногда вводят воздух два-три раза. Это необходимо для более полного возвращения вводимой в матку среды. При этом имеет значение и умение специалиста контролировать состояние матки рукой через прямую кишку. Отсутствие больших потерь среды (из 500 мл не более 10-15 мл) и примесей в ней крови указывает на достаточно техническое проведение операции.

Когда будет завершено промывание одного рога матки, воздух (воду) из баллончика выпускают и катетер извлекают из половых путей. Другой подготовленный катетер вводят в другой рог матки и всю процедуру повторяют заново. Можно пользоваться и одним катетером, переводя его из одного рога в другой.

В качестве среды для промывания матки используют фосфатно-солевой буфер (ФСБ) Дюльбекко. Непосредственно перед употреблением в ФСБ вводят следующие компоненты (в расчете на 1 л): фетальная сыворотка телят - 10-20 мл, пенициллин (калиевая соль) - 100 тыс. ЕД, глюкоза 1 г., натрия пируват - 0,036 г. После этого выдерживают в термостате при температуре 37,5°C в течение одного часа и используют для промывания матки.

Завершив промывание, катетер полностью не извлекают и через него вводят в тело матки в 35-50 мл ФСБ пенициллина и стрептомицина по 1 млн. ЕД и тетрациклина 500 тыс. ЕД. Это необходимо для предупреждения эндометрита. Если корову донора используют неоднократно, то целесообразно в день половой охоты перед началом гормональной обработки (т.е. за 8-12 дней до нее) также ввести в матку противомикробные средства. Это будет хорошей гарантией нормального состояния эндометрия в день извлечения зародышей.

Отбор и подготовка животных-реципиентов

В момент трансплантации зародыша организм реципиента должен находиться в той же стадии полового цикла, что и донора - эмбрионов. У

крупного рогатого скота разница во времени проявления половой охоты у донора и реципиента не должна превышать 12 часов. Если разница составляет более 24 ч, то приживаемость пересаженных эмбрионов резко снижается.

При наличии многочисленной группы реципиентов (телок) в день трансплантации можно подобрать животных с желательной стадией полового цикла. Однако чаще половые циклы донора и реципиента искусственно синхронизируют. Достигается это инъекцией простагландина $\Phi_{2\alpha}$ животным-реципиентам в тот же срок, что и коровам-донорам.

В качестве реципиентов могут быть как телки, так и коровы. Телок используют чаще, так как приживаемость зародышей у них выше, чем у коров. Телки-реципиенты должны иметь хорошее развитие, живую массу 350 кг или более и проявлять естественную половую цикличность. Отбирают их на второй день после начала гормональной обработки коров-доноров эмбрионов. Выбирают только животных с хорошо пальпируемыми желтыми телами в яичниках. После введения простагландина за животными наблюдают и регистрируют время начала половой охоты. В день трансплантации зародышей их исследуют ректально и используют только тех телок, у которых в яичниках будут обнаружены хорошо сформированные, нормальные по величине желтые тела.

И.И. Будевич, Н.Ф. Жук и А.И. Будевич для синхронизации охоты у доноров и реципиентов рекомендуют комплексное использование в лютеиновой фазе полового цикла инъекций гонадотропина с простагландином $\Phi_{2\alpha}$ и ГнРГ. Животным с хорошо выраженным желтым телом вводят ФСГ-супер в общей дозе 10 Арм.ед. для телок и 15 Арм.ед. для коров двукратно по 5 и 7,5 Арм.ед. через 12 часов. На следующий день однократно инъецируют эстрофан по 2 мл, а затем через 60 ч - сурфагон по 25 мкг. Начало обработки осуществляется не параллельно: доноров за 15 дней до стимуляции суперовуляции, а реципиентов – на второй день после начала обработки доноров.

Ввиду слабой выраженности охоты и течки у мясных животных, а также высокой частоты гипофункции яичников авторы рекомендуют комплексное применение ПГ $\Phi_{2\alpha}$ с ФСГ-П в дозе 10 мг для коров и 7 мг для телок, или с сыворотчным гонадотропином (сергон, Чехия) в дозе 1000 ИЕ для коров и 700 ИЕ для телок. Внутримышечное введение гонадотропина осуществляется соответственно за 24 или 48 часов до инъекции ПГ $\Phi_{2\alpha}$. В отдельных случаях для точного установления охоты у мясных коров необходимо ректальное исследование половых органов.

Оценка качества зародышей

После завершения промывания матки емкости со средой помещают на 20 минут в термостат при 37°C. Можно оставить их и при комнатной температуре (20-25°C). За это время зародыши, находящиеся в верхних слоях жидкости, оседут на дно. С помощью шприца и короткой эластичной трубки осторожно собирают пузырьки воздуха, которые располагаются по бокам сосуда на поверхности жидкости. Затем верхний слой жидкости удаляют с помощью сифона. Удобно при этом пользоваться специальной металлической трубкой. Нижняя часть такой трубки на протяжении 1-1,5 см не имеет просвета, а сбоку на этом уровне в ней проделано отверстие. Вверху трубка изогнута под прямым углом. К этой части ее присоединяется эластичная трубка со шприцем. Длина эластичной трубки должна превышать высоту емкости, чтобы свободный конец ее опускался ниже дна емкости.

Металлическая трубка помещается через отверстие в пробке (для устойчивости) до самого дна емкости. Шприцем слегка засасывают жидкость, чтобы она заполнила эластичную трубку, и затем отсоединяют шприц. Жидкость самостоятельно вытекает из емкости. Остается только нижняя часть ее высотой 1-1,5 см. Эту жидкость разливают в маркированные чашки Петри (2-4), дно которых расчерчено на полосы шириной около 1 см для удобства поиска зародышей. Содержимое чашек просматривают под биноклярным микроскопом МБС-9 или МБС-10 при 15-25-кратном увеличении. В качестве источника освещения лучше использовать лампу дневного света.

В настоящее время во многих лабораториях для отыскания зародышей не деконтируют промывную жидкость, а фильтруют ее через специальный фильтр.

Обнаруженные зародыши микроманипулятором или короткой пипеткой Пастера с резиновой трубкой или присоединенным к ней шприцем (рис. 52) переносят в среду для краткосрочного хранения (ФСБ+20% фетальной сыворотки). Такую среду готовят заранее и разливают по 2,5 мл в небольшие полиэтиленовые чашки Петри (2 мл ФСБ со всеми компонентами +0,5 мл фетальной сыворотки) или наносят на часовые стекла по 0,5-1 мл.

Оценивают качество зародышей в проходящем свете под микроскопом МБС-9 (или специальным инвертированным микроскопом) при 100-160-кратном увеличении. Часовые стекла или чашки Петри осторожно покачивают с целью осмотра зародышей со всех сторон. К моменту извлечения (7-8-день) нормально развитые зародыши находятся на стадии развития поздней морулы, ранней или поздней бластоцисты. Они имеют неповрежденную равномерную по ширине опалесцирующую прозрачную оболочку и цитоплазму в состоянии дробления, соответствующем возрасту эмбриона. Морула ранняя (Мо 1) или поздняя (Мо 11) представляют собой скопление бластомеров, не всегда одинаковых по размеру из-за асинхронности дробления. Цитоплазма бластомеров гомогенная, а связь их полигональная. В пространстве прозрачной оболочки не имеется гранул или других включений. У бластоцисты ранней (Бл 1) хорошо различимы группы зародышевых клеток (эмбриобласт) и поверхностных клеток (трофобласт), которые разделены полостью (рис. 53). Пространство прозрачной оболочки почти целиком заполнено. Поздняя (8-суточная) бластоциста (Бл П) имеет большую полость; клетки трофобласта уплощены, соприкасаются с прозрачной оболочкой, которая истончена и растянута; клетки эмбриобласта сгруппированы на одном полюсе. На 9-й день прозрачная оболочка разрывается и бластоциста полностью высвобождается из нее. Морула ранняя с признаками дегенерации характеризуется несимметричным расположением бластомеров, различной величиной их, наличием в пространстве прозрачной оболочки гранул и других включений. Отдельные бластомеры могут быть

разрушенными, но другие продолжают дробиться, достигая стадии поздней морулы или бластоцисты ("частичный" зародыш). У бластоцист также отмечается частичное разрушение клеток (в основном трофобласта), сжатие полости и увеличение пространства прозрачной оболочки. Сама оболочка может иметь небольшие трещины. Дегенерированные зародыши отстают на 3-4 деления от нормально развивающихся. Для них характерен распад бластомеров, смещение или фрагментации цитоплазмы (рис. 53). Прозрачная оболочка имеет значительные дефекты, а в пространстве ее находятся фрагменты разрушенных бластомеров.

Морфологическую оценку морул и бластоцист проводят по 5-балльной шкале. Для трансплантации отбирают морфологически нормальные зародыши с оценкой *отлично* и *хорошо*. При наличии свободных реципиентов допускается использование зародышей с оценкой *удовлетворительно* и *условно-годные*. У морул и бластоцист с оценкой *хорошо* отмечается наличие в пространстве прозрачной оболочки гранул и включений, некоторые различия в величине бластомеров, слабо выражена полость бластоцисты. С оценкой *удовлетворительно* - у морул разрушены единичные бластомеры, "частичный" зародыш, у бластоцист полость не выражена, нет дифференциации между клетками трофобласта и эмбриобласта; у морул и бластоцист увеличено пространство прозрачной оболочки и в нем находятся гранулы и другие включения. С оценкой *условно-годные* - сжатие и частичное разрушение бластомеров и нарушение связи между ними, фрагментация цитоплазмы, дефекты прозрачной оболочки и наличие в ее пространстве гранул, других включений. Выбраковывают неоплодотворенные яйцеклетки и зародыши с оценкой *непригодные* (несоответствие стадии развития возрасту зародыша, значительные дефекты прозрачной оболочки, распад бластомеров, сильное сжатие их).

Оттаянные после замораживания зародыши оценивают по тем же морфологическим признакам, что и свежеполученные.

Микрохирургическое деление эмбрионов

(по И.И. Будевичу, Н.Ф. Жук и А.И. Будевичу, БелНИИЖ)

Для деления отбираются зародыши как свежеполученные, так и замороженные, только хорошего или отличного качества на стадии поздней морулы или бластоцисты. Микроманипуляции на эмбрионах проводятся с помощью микроманипулятора ПМ-2 или манипулятора французской фирмы "JMV" марки REF-4080 в чашке Петри под инвертируемым микроскопом "Labovet" или стереомикроскопом "Nikon".

В качестве рабочего инструмента для деления используется стеклянная микропипетка-игла, изготавливаемая из стандартных капилляров с внутренним диаметром 0,8 мм и внешним 1,2 мм на пуллере отечественного производства по методу Никитина В.А. Оптимальными являются следующие размеры: длина плеча 2,5 мм, конусная часть - 10 мм. Рабочей поверхностью служит чашка Петри с обрезанным краем. Для фиксации клетки на дно чашки наносятся металлической иглой штрихи в разных направлениях.

Перед началом работы приготавливаются рабочие среды. Среда на основе фосфатно-солевого раствора Дюльбекко с добавлением 20% эмбриональной сыворотки и антибиотиков (100 ед./мл ампициллина и 12 мкг/мл гентамицина) используется для деления зародышей. Культивирование половинок проводят в среде TC-199 с добавлением 20% эмбриональной сыворотки плодов коров, антибиотиков (100 ед./мл ампициллина или 12 мкг/мл гентамицина), лактата кальция (0,6 мг/мл), пирувата натрия (0,2 мг/мл) и глутамина (0.15 мг/мл).

Деление эмбрионов осуществляют следующим образом. После оценки пригодные для микрохирургии зародыши переносятся в среду Дюльбекко. Затем клетка в капельке среды помещается на подготов-

ленную чашку Петри над штрихами. Над ней размещают нож таким образом, чтобы плечо ножа не касалось чашки. Угол наклона ножа составляет 5° - 25° к рабочей поверхности. Эмбрионы рассекаются опусканием ножа в медиальную плоскость клетки, одновременно разделяя оболочку и внутреннюю клеточную массу. При делении бластоцист необходимо разделять как эмбриобласт, так и трофобласт строго по середине. При проведении микрохирургической операции соблюдаются следующие правила: 1 - микроигла на эмбрион опускается постепенно, с паузами (нажим, пауза, нажим, пауза и т.д.); 2- после начала деления нельзя резко поднимать нож, т.к. клетка находится в напряженном состоянии и резкое поднятие ножа вызывает отрицательное давление, что приводит к гибели клетки. Эмбрионы делят двумя методами. В первом случае они рассекаются полностью, полученные половинки в дополнительные зоны пеллюцида не пересаживаются. Во втором случае деление прозрачной оболочки проводится частично, а внутренняя клеточная масса делится полностью. Полученные полуэмбрионы остаются в собственной оболочке. Критерием успешного деления считают минимальное повреждение бластомеров и получение симметричных половин.

Затем полуэмбрионы переносятся в среду для культивирования и помещаются в термостат при температуре $+38^{\circ}\text{C}$ во влажную атмосферу, содержащую 5% CO_2 на 0,5-24 часа. Если в результате культивирования эмбрионы округлились, приняв обычную форму, считается, что деление прошло успешно. Их направляют в пайетты и пересаживают реципиентам.

Пересадка прокультивированных половинок эмбрионов проводится нехирургическим методом по одной половинке в разные рога матки реципиента или обе половинки в один рог матки.

Деление зародышей с последующей пересадкой половинок является наиболее эффективным биотехнологическим методом получения телят-двоен у крупного рогатого скота. Этот метод, прежде всего, позволяет обеспечить билатеральное (т.е. в обоих рогах) размещение эмбрионов в матке реципиента, способствующее благоприятному течению стельности и отелов.

Отличительными особенностями является то, что в качестве реципиентов необходимо использовать полнозрелых коров живой массой 550-600 кг. При проявлении признаков половой охоты параллельно проводится искусственное осеменение коров-доноров и реципиентов. На 7-8 день после осеменения в случае наличия в яичнике хорошо выраженного желтого тела реципиентам пересаживают один эмбрион в контрлатеральный рог матки (т.е. в противоположный рог, смежный с яичником, имеющим желтое тело).

В целом, данный биотехнологический прием позволяет получить до 63,1% стельных коров, из которых 66,6% - стельных двойнями.

Результативность повышается, если осеменение коров-доноров проводить семенем быков не родственных быкам, семенем которых осеменяют реципиентов. В этом случае, трансплантация реципиентам гетерозиготных (неодинаковых по генетическим задаткам) эмбрионов относительно собственных обеспечивает стельность в 72,2% случаев, при этом двойневые стельности составляют 70,8%.

Следует учитывать тот факт, что отелы двойней в 2-3 раза чаще, чем одиноком, требуют оперативного вмешательства, главным образом, из-за одновременного вступления плодов в родовые пути коровы. Отёлы у коров должны проходить в родильном отделении под наблюдением ветспециалистов.

Хранение и культивирование зародышей

В среде для краткосрочного хранения зародыши можно выдерживать при комнатной температуре не более 5-6 часов до момента использования. Однако наиболее высоких показателей приживаемости достигают при трансплантации их реципиентам в первые 1-1,5 часа с момента извлечения.

Глубокое замораживание и хранение зародышей в жидком азоте позволяет сохранить ценный генетический материал при отсутствии животных-реципиентов, в течение длительного периода поддерживать жизнеспособность зародышей, а также проводить трансплантацию их в строго определенные сроки с максимальной эффективностью. Технология длительного хранения зародышей предусматривает: выбор криопротектора и приготовление растворов различной концентрации; оценку зародышей, насыщение их криопротектором и постепенное охлаждение с помощью программных замораживателей; перенос зародышей в жидкий азот и их хранение; оттаивание и освобождение зародышей от криопротектора; морфологическую

оценку зародышей по пригодности к трансплантации, заправку их в пайетты и катетеры и пересадку реципиентам.

Для замораживания используют только свежеполученные зародыши с оценкой отлично и хорошо. От момента получения до замораживания должно проходить как можно меньше времени. Замораживание проводят в растворах глицерина на ФСБ с добавлением пенициллина и 20% фетальной сыворотки. Работу проводят в стерильных боксах. Растворы наливают в стерильные часовые стекла или чашки Петри. Перед замораживанием зародыши последовательно помещают на 5 мин. в заранее приготовленные растворы криопротектора с концентрацией 0,25 М (1 мл 0,5 М раствора + 1 мл ФСБ); 0,5 М (2 мл 1,0 М раствора + 2 мл ФСБ); 0,75 М (1 мл 1 М + 1 мл 0,5 М раствора глицерина) и 1,0 М (0,74 мл глицерина + 9,26 мл ФСБ). После выдержки в последнем растворе глицерина (10 мин.) зародыши забирают в соломинки (по 1-2 зародыша в каждую). При наличии эмбрионов отличного качества можно помещать зародыши сразу в 1,0 или 1,4 М раствор глицерина и выдерживают в нем до 30 мин.

Будевич И.И., Н.Ф. Жук и А.И. Будевич (2001) рекомендуют рабочие растворы криопротектора готовить на основе ФСБ, содержащей 4% фетальной сыворотки, 100 ед./мл ампициллина и 12 мкг/мл гентамицина. Одномомментное насыщение зародыша криопротектором осуществлять в 1,4 М растворе глицерина (1 мл глицерина + 9 мл среды), или 1,5 М растворе этиленгликоля (0,84 мл этиленгликоля + 9,16 мл среды) в течение 10 и 5-10 мин соответственно.

Заправку соломинок проводят в такой последовательности: раствор глицерина 1,4 М ($\frac{2}{5}$ объема соломинки), пузырек воздуха, зародыш в 1,4 М раствора глицерина ($\frac{1}{5}$ объема соломинки), пузырек воздуха, 1,4 М раствор глицерина ($\frac{2}{5}$ объема). Столбик раствора криопротектора должен коснуться пробки из поливинилового спирта. Свободный конец соломинки закрывают пластмассовой пробкой и подвергают замораживанию с помощью программных замораживателей: ЗЭМ-4 (Украина), Минукул АС-25 (Франция), ЭМБИ-К (Россия). Хранят в кассетах с держателем в сосудах Дьюара.

Таблица 7.

Режим замораживания эмбрионов (по Будевич И., Жук Н. и Будевич А.)

Этапы работ при замораживании	ЗЭМ-4		ЭМБИ-К	
	1,4 М глицерин	1,5 М этиленгликоль	1,4 М глицерин	1,5 М этиленгликоль
1. Время эквilibрации в криопротекторе, мин.	10	5-10	10	5-10
2. Начальная температура охлаждения	+20°C	+20°C	+20°C	+20°C
3. Скорость охлаждения эмбрионов до сидинга	1°C/мин	1°C/мин	1°C/мин	1°C/мин
4. Сидинг	-7°C	-7°C	-5°C	-5°C
5. Время выдержки после сидинга, мин.	2	2	0,2	0,2
6. Скорость охлаждения эмбрионов после сидинга	0,3°C/мин	0,3°C/мин	0,3°C/мин	0,3°C/мин
7. Конечная температура	-36°C	-36°C	-36°C	-36°C
8. Стабилизация температуры, мин	30	30	-	-
	Погружение в азот (-196°C)		Погружение в азот (-196°C)	

Оттаивают зародыши: а) в водяной бане при 37°C в течение 10-12 с до полного исчезновения льда, или же б) на воздухе при +25°C в течение 10-12 с, а затем в водяной бане при +25°C также 10-12 с. Отогретые пайетты освобождают от маркерной пробки, верхний конец с пыжом отрезают и ее содержимое помещают на часовое отекло. Под микроскопом проводят подсчет количества оттаянных эмбрионов и предварительную морфологическую оценку. После этого эмбрионы отмывают от криопротектора. Перенос эмбрионов из одного раствора в другой проводят стерильными микропипетками под микроскопом при 12-16-кратном увеличении. Зародыши помещают последовательно в растворы глицерина с концентрацией 1,0 М, 0,75 М, 0,5 М и 0,25 М, после чего трижды промывают в свежих порциях ФСБ и оставляют в такой же среде на 10-20 минут. По окончании промывки оценивают качество зародышей. Пригодные используют для трансплантации, а зародыши сомнительного качества инкубируют в течение 2 часов и оценивают по морфологическим признакам.

Будевич И.И., Н.Ф. Жук и А.И. Будевич рекомендуют использовать сахарозу для выведения глицерина из клеток зародышей, что повышает сохранность и приживляемость эмбрионов. Приготавливают сначала 1,4 М раствор сахарозы (4,792 г сахарозы + 10 мл среды), а затем 0,7 М раствор (для этого исходный раствор сахарозы смешивают 1:1 со средой). Сначала смешивают раствор глицерина 1,4 М 1:1 с 1,4 М раствором сахарозы. В таком растворе выдерживают оттаянные зародыши 5 мин., затем на 5 мин. переносят их в 0,7 М раствор сахарозы, после чего выдерживают по 5 мин. дважды в среде Дюльбекко.

Нередко морфологическая оценка свежеполученных зародышей также не дает полной уверенности в их жизнеспособности. Особенно это касается зародышей с значительными повреждениями прозрачной оболочки, разрушением бластомеров, сжатием полости бластоцисты (оцененных как условно-годные). В таких случаях зародыши культивируют в среде для кратковременного хранения в небольших чашках Петри, на часовых стеклах или в закрытых соломинах. На часовые стекла наносят 0,2 мл среды, помещают в нее зародыши и средой покрывают слоем стерильного вазелинового масла (25 капель). Стекла помещают в чашки Петри и содержат их в эксикаторе при 37°C в термостате. До начала и в процессе культивирования через эксикатор пропускают увлажненную газовую смесь (90% азота, по 5% кислорода и углекислого газа). В соломинку зародыши вводят с помощью специального микроманипулятора или шприца емкостью 1 мл с соединительным устройством. Сначала набирают в соломинку столбик среды (0,03 мл), затем столбик воздуха (0,01 мл), после этого средой с зародышем (0,03 мл), опять столбик воздуха и средой (0,02 мл). После соприкосновения среды с пробкой (поливиниловым спиртом) и затвердевания ее шприц отсоединяют, а соломинку с этой стороны закрывают пластмассовой пробкой и оставляют в термостате при 37°C на время инкубации. Возможна ин-

кубация зародышей и в малых чашках Петри в 2,5 мл среды без помещения их в эксикатор. Крышка чашки почти герметично закрывает среду, доступ воздуха ограничен и это обеспечивает удовлетворительные условия для непродолжительной выдержки их (до 24 часов).

После культивирования проводят оценку жизнедеятельности зародышей. Продолжающие развитие зародыши с оценкой отлично и хорошо считают пригодными для пересадки.

Трансплантация зародышей реципиентам.

У крупного рогатого скота в практике обычно используется нехирургический способ трансплантации зародышей реципиентам. Для пересадки применяют инструменты, предназначенные для ректо-цервикального способа осеменения (ШО-3 и ШО-4 или другие инструменты для введения расфасованной в соломинах спермы). В соломину зародыши помещают таким же способом, как и при культивировании их. Подготовленную соломину стерильным пинцетом вставляют в инструмент и надевают на него полиэтиленовый одноразовый чехол.

Животное - реципиента фиксируют в станке в манеже центра (пункта) трансплантации зародышей или в помещении непосредственно в стойле. Наружные половые органы обмывают водой и дезинфицируют 0,2%-ным раствором фурацилина, 2%-ным раствором диоксида или 70%-ным этиловым спиртом. Сильно возбуждимым животным вводят комбилиен внутримышечно в дозе 0,5 мл или ханегиф 10 мл. Затем делают сакральную анестезию 2%-ным раствором новокаина (5 мл). Подготовленный к пересадке инструмент вводят во влагалище до шейки матки, сдвигают назад защитный полиэтиленовый чехол и пользуясь теми же приемами, что и при ректо-цервикальном способе осеменения, проводят его через канал шейки матки. После этого инструмент направляют в рог матки, соответствующий яичнику с желтым телом (ипсилатеральный). Осторожными движениями руки через прямую кишку расправляют рог матки и натягивают его на инструмент так, чтобы кончик инструмента был ближе к верхушке рога матки. Удерживая инструмент в таком положении, оператор дает команду помощнику, который медленным надавливанием на стилет вводит зародыш с содержимым в матку.

Все манипуляции с введением инструмента в половые пути должны быть выполнены в течение 1,5-2 минут. Если затрачивают больше времени, то это может стимулировать сокращения матки и привести к изгнанию зародыша. Следует отметить, что с 6-го дня матка проявляет слабо сократительную функцию, но длительные манипуляции с ней могут стимулировать эту функцию.

Приживаемость при нехирургической трансплантации свежеполученных зародышей составляет 50-60%, а при использовании сохраняемых в жидком азоте зародышей - 45-55%. С учетом этого, а также процента извлекаемых и бракуемых зародышей, от одной коровы-донора за одну проце-

дуру извлечения можно получить в среднем два-три теленка. А поскольку донора можно использовать для получения зародышей каждые 2,5-3 месяца, то в течение года от такой коровы можно получить в среднем 10-12 телят.

ЧАСТЬ 2. ВЕТЕРИНАРНОЕ АКУШЕРСТВО

МОРФОЛОГИЯ ПОЛОВЫХ ОРГАНОВ БЕРЕМЕННЫХ ЖИВОТНЫХ. ПЛОД И ОКОЛОПЛОДНЫЕ ОБОЛОЧКИ. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВОЗРАСТА ПЛОДА

Цель занятий: изучение строения и топографии половых органов самок на различных стадиях беременности; изучение строения и взаимоотношения околоплодных оболочек; приобретение студентами навыков определения возраста плода.

Объекты исследований, материалы и оборудование: половые органы (в их естественной связи) небеременных и беременных животных, которые должны быть получены на мясокомбинате сразу же после убоя здоровых животных; музейные препараты, муляжи и рисунки околоплодных оболочек и плаценты; схемы развития околоплодных оболочек и кровообращения плода; бытовой холодильник (для краткосрочного хранения препаратов); спиртовые тампоны, раствор йода, коллодий; клеенчатые фартуки, нарукавники, перчатки хирургические и анатомические; полотенце, бумажные салфетки; анатомические и хирургические пинцеты, зонды пуговчатые, ножницы прямые и Купера; градуированные цилиндры или мензурки на 100, 500 и 1000 мл; весы, измерительные линейка и лента; большие кюветы, тазы, ведра.

Методические указания. Занятия проводят в лаборатории кафедры. Используя плакаты и схемы преподаватель знакомит студентов с развитием зародыша и оболочек, а также с изменениями величины и топографии половых органов в течение беременности. После этого группу студентов разделяют на 2-3 небольших группы и обеспечивают их необходимыми препаратами и инструментами. Преподаватель с двумя-тремя помощниками демонстрирует препараты половых органов небеременных, а затем беременных животных, измеряет диаметр беременного и небеременного рогов матки и проводит препарирование их. Другие студенты (по 3-4 человека), наблюдая за действиями преподавателя, в такой же последовательности самостоятельно выполняют работу. При морфометрическом исследовании половых органов целесообразна такая последовательность: осмотр яичников и матки, сопоставление величины ее рогов, осмотр наружных половых органов. Если имеются препараты различных видов животных, то сначала исследуют половые органы крупного рогатого скота, затем мелкого рогатого скота, свиней, лошадей и других видов.

После осмотра и измерения половых органов начинают препарирование их. Используя острые прямые ножницы и скальпель сначала отделяют наружные половые органы от прямой кишки. Затем разрезают по верхнему краю стенку преддверия влагалища и влагалища до верхнего свода, осматривают слизистую

оболочку и наличие на ней слизи, ее внешние свойства. Особое внимание обращают на состояние устья шейки матки и характер слизи (слизистой пробки беременности). После этого разрезают осторожно ножницами стенку шейки матки до тела так, чтобы не нарушить целостность оболочек плода. Осматривают канал шейки матки и разрезают по большой кривизне небеременный рог матки; при этом постепенно отделяют котиледоны от карункулов и осторожно извлекают плодный мешок из полости рога. Также поступают и с беременным рогом и полностью высвобождают плодный мешок. Целесообразно эту работу выполнять непосредственно на столе, застланным клеенкой или полиэтиленовой пленкой. После высвобождения плодного мешка осматривают слизистую оболочку матки, делают ножницами или обушком скальпеля соскоб с ее поверхности и рассматривают маточное молоко (эмбриотроф), подсчитывают карункулы, измеряют их величину в различных участках беременного и небеременного рогов матки.

Завершив исследование матки приступают к осмотру и препарированию оболочек. Сначала измеряют диаметр плодного мешка в наиболее широкой части его. Затем осторожно захватывают анатомическим пинцетом небольшую складку хориона (в области амниона), надрывают его и отделяют от подлежащих под ним амниона и затем аллантаиса на всем протяжении плодного мешка. Действуют только рукой (в перчатках или без них) с коротко остриженными ногтями. Хорион легко отделяется от других оболочек. В области верхушек плодного мешка оставляют небольшую часть хориона неотделенной, чтобы не повредить выступающие за пределы хориона верхушки аллантаиса. Отделив хорион рассматривают расположение аллантаиса и постепенно, не нарушая целостности его, отделяют от амниона вплоть до вхождения в пуповину. Немного жидкости оставляют в узкой части аллантаиса и перевязывают его толстой нитью. Остальную часть отрезают и жидкость собирают в сосуд, затем измеряют объем ее. При наличии долей (хлебов) в жидкости рассматривают их и делают острым скальпелем срез. Далее приступают к осмотру амниона с плодом, измеряют диаметр в наиболее широкой части его; после этого вскрывают амнион, определяют консистенцию и другие внешние свойства жидкости, измеряют количество ее.

Завершив эту работу осматривают пуповину, производят измерение величины и массы плода, а затем препарирование его. Сложенный пинцет осторожно вставляют между оболочкой, сосудами и урахусом внутри пуповины и постепенно разъединяют их; находят в начале пупочных артерий анастомоз, а после вскрытия брюшной полости плода - соединение вен и венозный проток (не всегда обнаруживается у теленка). Две пупочные артерии и мочевой пузырь слегка приподнимают и осматривают место отхода артерий от аорты. Несколько сдавливая остаток аллантаиса с жидкостью наблюдают за наполнением мочевого пузыря через мочевой проток. У лошадей в пуповине находят желточный пузырек. Вскрыв грудную полость плода отделяют сердце от сосудов, вскрывают левое предсердие и находят овальное отверстие между ним и правым предсердием.

При исследовании половых органов кобылы осматривают слизистую оболочку матки, ее многочисленные небольшие углубления (крипты), а на сосудистой оболочке - небольшие ворсинки, которые создают вид бархатистости. У них нельзя разъединить хорион и аллантаис или аллантаис и амнион. Поэтому следует рассмотреть сначала строение алланта-хориона, затем алланта-амниона.

Половые органы животных на различных стадиях беременности.

Во время беременности в половых органах происходят существенные морфологические изменения; величина и масса их прогрессирующе увеличиваются. Так, у небеременных коров весь половой тракт (включая влагалище, матку, яйцепроводы и яичники) имеет массу до 1,5 кг, масса матки - 0,9 кг. В период стельности масса воспроизводительных органов с содержимым увеличивается 6-кратно; форма матки становится асимметричной в результате большего увеличения беременного рога, по сравнению с небеременным (рис. 53). При развитии плодов в обоих рогах увеличение их может быть одинаковым. На втором месяце стельности масса матки с содержимым составляет 1,6 кг, на пятом мес. - 10,1 кг, на седьмом - 23,8 кг, в конце беременности - 67,8 кг (Swett W.W. et al., 1948). Около 40% массы приходится на плод, 15,4% - на околоплодные жидкости, 5,4% - на плодные оболочки и 13% - на матку.

У овец и коз форма и величина рогов матки в период беременности изменяется аналогично матке коров. Однако у них чаще бывает несколько

плодов и это определяет различия формы и величины матки и соотношение массы компонентов содержимого ее. На пятом месяце суягности в плодном мешке овцы содержится 369 мл амниотической и 834 мл аллантоисной жидкости; всего - 1203 мл. При двойнях общее количество жидкости примерно вдвое больше (Arthur, 1956).

Длина рогов матки беременных свиней достигает 2-3,5 м, а диаметр их - 17-18 см. В местах нахождения плодов она расширена в виде ампул. В конце беременности масса матки без содержимого составляет 2,7 кг, а у небеременных животных - менее 0,4 кг.

У кобыл плод находится в теле и роге матки; у них матка принимает форму двурогого мешка.

Оболочки плода. К концу эмбрионального периода зародыш окружают три оболочки: амнион, аллантоис и хорион.

Амнион (amnion) непосредственно окружает плод со всех сторон и в области пупочного кольца смыкается с кожей плода. При многоплодной беременности для каждого плода имеется отдельная оболочка. У животных она прозрачна и через нее можно видеть плод. С внутренней стороны, преимущественно возле пуповины, на оболочке имеются беловато-сероватые наложения - эпителиальные бляшки. У зародышей крупного рогатого скота они существуют до шести месяцев.

Аллантоис (allantois) начинается от верхушки мочевого пузыря, идет в составе пуповины в виде мочевого протока (урахуса) и затем расширяется. У кобыл и мясоядных аллантоис в виде слепого мешка располагается между амнионом и хорионом. Наружный листок аллантоиса срастается с хорионом, образуя *алланто-хорион*. Внутренний листок тесно срастается с амнионом, образуя *алланто-амнион*; в стенке его на поздней стадии жеребости имеется два крупных сосуда: артерия и вена, которые берут начало от пупочных сосудов. У лошадей и собак плод вместе с алланто-амнионом может свободно перемещаться в полости аллантоиса.

У жвачных и свиней аллантоис после выхода из пуповины разделяется на два постепенно суживающихся мешка, которые заполняют полость сосудистой оболочки, а у свиней значительно выступают за ее пределы. У основания аллантоис имеет Т-образную форму и лежит на одной стороне амниона, прилегая одним листком к нему, а другим - к хориону. У этих видов животных сращения оболочек не наблюдается и их можно сравнительно легко разъединить.

В полости амниона и аллантоиса находится жидкость. Общее количество ее увеличивается по мере нарастания срока беременности. Однако соотношение *амниотической* (околоплодной) и *аллантоисной* (мочевой) жидкости в различные периоды беременности неодинаково.

У *крупного рогатого скота* быстрое увеличение жидкости наблюдается в периоды между 40 и 60 днями, 3 и 4 месяцами и между 6,5 и 7,5 месяцами. В первый и третий периоды увеличивается, главным образом, моче-

вая жидкость, а во второй период - околоплодная. В связи с этим зародышевый пузырь в начале беременности представляет собой удлинённый алланта-хорион с центральным сферическим амнионом и сравнительно небольшим эмбрионом. Матка при пальпации через прямую кишку также имеет удлинённую форму. В течение второй трети беременности доминирует амниотическая жидкость и зародышевый пузырь имеет более округлую форму.

У овец в первые три месяца количество мочевой жидкости небольшое (до 130 мл), количество же амниотической жидкости быстро увеличивается и достигает 0,6 л. На четвертом месяце происходит резкое увеличение мочевой жидкости, а увеличение амниотической жидкости очень слабое. В течение пятого месяца количество мочевой жидкости почти удваивается, а амниотической - даже несколько уменьшается.

У лошадей аллантаисная жидкость доминирует в первую и последнюю треть беременности и к концу ее достигает 7-15 л. Амниотическая жидкость быстро накапливается в середине беременности; в этот период количество ее примерно такое же, как и аллантаисной, и составляет 3-5 л. Общее количество жидкости - 10-20 л.

У свиней аллантаисная жидкость накапливается быстро в первый месяц, значительно медленнее во второй месяц и к концу его достигает 200 мл. Затем объем жидкости уменьшается до 100 мл или меньше, а порой она почти отсутствует. Амниотической жидкости на протяжении первых двух месяцев немного (до 20 мл), но в последующем количество ее увеличивается до 75-200 мл.

В начале беременности амниотическая жидкость прозрачная, водянистая, затем становится мутной, желтоватой, и в конце беременности вследствие примеси муцина приобретает слизистый характер.

Мочевая жидкость в начале беременности также прозрачная, светло-желтая, но в дальнейшем становится буроватой и мутной. Со второй трети беременности в ней находят лепешкообразные тела желтовато-серого или желтовато-бурого цвета (доли, хлеба). Снаружи они гладкие, блестящие, с закругленными краями, а на разрезе - слоистые или гомогенные.

Хорион (chorion) - наружная оболочка плода. В начале беременности эта оболочка имеет вид тонкой пленки. В дальнейшем, по мере развития на ней ворсинок внешний вид и цвет оболочки изменяются в зависимости от вида животных.

С начала имплантации хорион принимает соответствующую строению тела и рогов матки животного форму.

У кобыл хорион имеет тело и два ответвления - рога. Вся поверхность его равномерно покрыта небольшими (около 1,5 мм), слегка ветвящимися ворсинками.

У крупного и мелкого рогатого скота форма хориона двурога. Ворсинки расположены в виде отдельных скоплений (котиленонов) четырьмя рядами на всей его поверхности. На стороне беременного рога котиленоны

развиты сильнее. Ворсинки сильно ветвящиеся, снабжены обильно кровеносными сосудами; ворсинки у этих животных в углубления на карункулах. У крупного рогатого скота котиледоны по периферии сужены, образуют кольцо, которое плотно охватывает ножку карункула. При многоплодной беременности хорионы двух плодов могут срастаться и сосуды одного плода образуют анастомозы с сосудами другого, что обуславливает рождение телочек - фримартинов.

У свиней хорион имеет форму удлинённого, суживающегося к концам мешка. В середине беременности на поверхности каждого плодового мешка можно видеть 5 зон: центральную плацентарную зону, две параплацентарные и две концевых ишемических зоны, которые состоят, главным образом, из двух некротических верхушек. Для небольшой параплацентарной зоны характерно наличие продольных кровеносных сосудов, которые в ишемической зоне запустевшие. В области плацентарной зоны имеются короткие, едва заметные ворсинки, которые расположены маленькими группами. Сосудистые оболочки поросят тесно соединены плацентарными или параплацентарными зонами, но их можно разъединить.

Пуповина состоит из двух пупочных артерий, одной или двух вен, мочевого протока (урахуса) и остатка желточного пузырька. Центральная часть пуповины заключена в амнион. На этом участке все пространство между сосудами и мочевым протоком заполнено вартоновым студнем. Ближе к периферической части между артериями имеется анастомоз. Периферическая часть пуповины простирается от околоплодной до сосудистой оболочки. Она состоит из делящихся на периферические ветви сосудов, остатка желточного пузырька и расширенной части урахуса. Периферическая часть пуповины имеется только у тех животных, у которых амнион полностью окружен аллантоисом.

У телят длина пуповины 30-40 см. Оболочка пуповины густо покрыта мелкими эпителиальными ворсинками, придающими ее поверхности бархатистый вид. Вены после вхождения в брюшную полость соединяются в общий ствол. Длина пуповины у ягнят и козлят - 7-12 см; у поросят - 20-36 см; в пуповине их одна вена и две артерии. У жеребят длина пуповины от 36 до 83 см; в ней имеется две артерии и одна вена. До конца жеребости сохраняются остатки желточного пузырька. У собак длина пуповины варьирует в зависимости от породы и составляет в среднем 1:2,4 по отношению к длине плода.

В период плода быстро изменяется величина зародыша, происходит дифференциальный рост его различных частей и органов, сформировавшихся в эмбриональный период. В ранний период у плода образуются веки и кости, начинается окостенение скелета, изменяется внешний вид и размеры конечностей, появляется волосяной покров.

В практике нередко приходится по наружному виду плода определять его возраст. В первой половине беременности наиболее важными крите-

риями является длина плода, в меньшей мере его масса и количество околоплодных вод, а во второй половине - появление волос на отдельных местах и затем степень развития волосяного покрова. Величина плода (особенно масса) сильно разнится в зависимости от породы животных, их возраста, условий кормления и содержания. Длина плода измеряется от темени до хвоста.

У крупного рогатого скота. В 28 дней длина эмбриона 0,8 см. Закладаются все органы, появляются зачатки конечностей. Сосудистая оболочка без ворсин. Амнион сферической формы, 2 см в диаметре. Располагается в свободной (не связанной с другим рогом) части беременного рога. Аллантоисный мешок 18 см длиной, заполняет почти целиком беременный рог, но количество жидкости незначительное.

В 35 дней длина зародыша 1,8 см; величина амниона с жидкостью и зародышем 3 см. Жидкости в нем немного - около 1 мл. Аллантоис хорошо развит и содержит 55-60 мл жидкости.

В 58-60 дней длина плода около 6 см, масса 17-20 г. Видны зачатки молочной железы. Полости тела закрыты. Живот сильно увеличен. Амнион овальной формы и растянут, около 5 см в поперечнике, содержит 65-80 мл жидкости. В полости аллантоиса жидкости 125-150 мл. Всего околоплодных вод более 200 мл.

В 80 дней длина плода 12 см. Количество амниотической жидкости 340 мл, аллантоисной - 420 мл. В 3 месяца длина плода 14-15 см, масса 150-210 г. У самцов оформляется мошонка. Околоплодных жидкостей всего 800-870 мл.

В 4 месяца длина плода 27-28 см, масса 1,4-1,5 кг. Редкие волоски на верхней губе и бровях. У самцов семенники опущены в мошонку. У самок хорошо выражены соски вымени. Амниотической жидкости 2150 мл, аллантоисной - 950 мл.

В 5 месяцев длина плода - 35-40 см, масса 3-3,5 кг. Появляются "усы" и "брови", отдельные волоски на краях и кончиках ушных раковин. Амниотической жидкости 2,7 л, аллантоисной - 1,2-3 л, всего 4-5 л.

В 6 месяцев длина плода 48-52 см, масса 4,5-6 кг. Густые волосы на губах и надбровных дугах. Появляются ресницы и редкие волоски вокруг зачатков роговых отростков, на периферических участках конечностей до скакательных и запястных суставов. Амниотической жидкости - 2,4-4,5 л, аллантоисной - 2,3-5 л, всего 6-8 л.

В 7 месяцев длина плода 48-70 см, масса 9,8-13 кг. Хорошо развит волосяной покров на губах, надбровных отростках, на периферических участках конечностей, на кончике хвоста. Появляются редкие волосы на коже вдоль позвоночника. Амниотической жидкости 1,5-2,4 л, аллантоисной - 5,5-7 л, всего 9-10 л.

В 8 месяцев длина плода 70-60 см, масса 15,8-21 кг. На всей поверхности тела густой волосяной покров. Амниотической жидкости 2-2,5 л, аллантаоисной - до 9 л, всего 10-11.

В 271-284 дня длина зрелого плода 80-105 см, масса 18-45 кг (редко до 65). Вся поверхность тела покрыта густой шерстью. На нижней и верхней челюстях прорезались премоляры; на нижней челюсти все резцы хорошо выражены. Амниотической жидкости от 2,8 до 7,5 л, аллантаоисной - от 8 до 15 л, а всего жидкости 14-20 л.

У овец. В 1 месяц длина эмбриона 10 см. Все органы заложены, полости тела закрыты; хорошо заметны жаберные щели. Длина околоплодного мешка достигает 40-60 см.

В 2 месяца длина плода 5-7 см, масса около 50- г. В костях конечностей начинается отложение солей.

В 3 месяца длина плода 16 см, масса 0,8-1,2 кг. В 3,5 месяца длина плода 20-22 см; в области головы и шеи появляются шерстные волокна.

В 4 месяца длина плода 25-32 см, масса 1,5-2,65 кг. вся поверхность плода покрыта волосками, но они еще короткие.

В 5 месяцев длина зрелого плода 30-50 см, масса до 4,9 кг, двоен (общая) -7,9 кг, троен -9,1 кг (Р. Rattray). Из двоен массой 1,8-2,5 кг погибает после родов 37,9%, а из ягнят массой 3-3,5 кг гибнет не более 8,8 % их. При рождении одного плода случаи гибели во время родов увеличиваются по мере повышения массы ягнят (А.П. Студенцов, В.С. Шипилов, Л.Г. Субботина, О.Н.Преображенский,1986).

У лошадей. В 30-36 дней зародышевый пузырек диаметром около 9 см, ближе к цилиндрической форме, сильно растянут аллантаоисной жидкостью. Хорион без ворсинок. Длина зародыша 13 мм. Головка его не имеет очертаний, свойственных лошади. Печень хорошо выражена и в виде неровных выступов лежит под позвоночником. Имеются зачатки конечностей.

В 2 месяца длина эмбриона 7-7,5 см, масса 70 г. Головка оформлена, на конечностях заметна конфигурация копытца. Полости тела закрыты. Пупочный пузырек содержит 8-15 мл слегка мутноватой жидкости. величина всего зародышевого пузырька 23x13 см. Амниотической жидкости немного (30-40 мл), а всего околоплодных жидкостей 500-900 мл.

В 3 месяца длина плода 12-15 см. Хорошо выражены копытца. Заложена молочная железа, соски хорошо развиты. Начинается отложение солей в костной ткани. Околоплодных вод около 2 л.

В 4 месяца длина 20-22 см, масса 1-1,65 кг. Наружные половые органы развиты, но у самцов семенники в мошонку не опущены. на верхней и нижней губе видны первые зачатки волос.

В 5 месяцев длина плода 30-35 см, масса 3-4 кг. Губы густо покрыты волосами. отдельные волоски появляются вокруг бровей, на кончике хвоста.

В 6 месяцев длина плода 45-73 см, масса 4-5,5 кг. Появляются ресницы, отдельные волоски на дорсальном крае шеи (грива) и верхушках ушных раковин.

В 7 месяцев намечается значительная разница в росте плода у различных пород. Длина плода варьирует от 40 до 70 см. Волосы гривы становятся хорошо различимы, появляются мелкие волосы по всему краю ушных раковин.

В 8 месяцев длина плода 65-70 см, масса 9-15 кг. На хвосте волосы располагаются двумя полосами. Сильное обрастание наблюдается в области гривы и спины. Заметны отдельные волоски на боках вдоль позвоночника.

В 9 месяцев длина около 80 см, масса 12-30 кг. Все туловище покрыто мелкими волосами. Появляется волосяной покров на коже венчика.

В 10 месяцев длина около 90 см, масса 18-30 кг. Черепная полость проявляет сильную выпуклость. У самцов хорошо развит препуций. Все тело покрыто длинной шерстью. На подошвах копыт заметен нарост рога.

В 11 месяцев - зрелый плод. Длина 1-165 м, масса 30-50 кг; густой шерстяной покров. У самцов семенники выступают из брюшной полости, иногда опущены в мошонку. Околоплодных вод -7-15 л.

У свиней. Длина зародыша *в 3 недели* 5 мм, *в 4 недели* - 18 мм, *в 5 недель* - 3 см. К концу первого месяца все органы заложены и плод приобретает характерные для вида очертания; брюшная полость закрыта.

В 2 месяца длина плода около 8 см, масса 90-190 г. Хорошо проявляются видовые очертания; глаза закрыты. Завершена половая дифференциация, начинается окостенение трубчатых костей. На нижней челюсти видны закладки клыков.

В 3 месяца длина плода 15 см, глазные щели открыты. Появляются волоски на губах, бровях, хвосте и ушах. На нижней челюсти имеются клыки, на верхней челюсти они только начинают прорезываться, показываются резцы и первые коренные зубы.

В конце беременности зрелый плод покрыт щетиной, длина 20-25 см, масса 0,8-1,2 кг, имеются острые резцы и клыки. Окостеневают кости черепа.

У собак, несмотря на большие различия в росте карликовых и крупных пород, на протяжении почти всей беременности, особенно в первые 4-5 недель, не наблюдается значительных различий в развитии плодов. Однако количество их у карликовых собак значительно меньше, чем у особей крупных пород.

В 3 недели длина зародыша 1 см. Все органы заложены, проявляются видовые очертания. Брюшная полость закрыта, хорошо различим желтоватый пузырек.

В 4 недели длина плода - 4-4,5 см.

В 6 недель длина плода около 8 см; на коже появляются отдельные волоски.

В 2 месяца длина плода у собак средних по величине пород достигает 16-20 см, масса зависит от породы - у крупных она составляет 1-2%, у мелких 5-7% от массы матери. Все тело покрыто волосами. Кости черепа не срослись, и поэтому голова может изменять конфигурацию. Веки слипшиеся, зубов нет.

ДИАГНОСТИКА БЕРЕМЕННОСТИ И БЕСПЛОДИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

В период беременности в организме животных происходят существенные морфологические и функциональные изменения в половой, эндокринной и других системах, а также в общем обмене веществ. Знание изменений в половых органах, легко обнаруживаемых клиническим исследованием, дает возможность выбрать наиболее подходящий метод диагностики беременности на той или иной стадии. При этом, могут быть использованы, кроме клинических, и лабораторные методы.

Цель занятий: освоить современные методы диагностики беременности и бесплодия у коров, кобыл, овец и коз, у свиней.

Объекты исследований, материалы и оборудование: животные - коровы, кобылы, козы, овцы, свиньи; муляжи, рисунки, слайды половых органов беременных и небеременных самок; половые органы небеременных и беременных убитых животных; аппараты для ультразвукового исследования; установки для радио иммунного исследования, наборы реактивов для определения содержания прогестерона, сывороточного гонадотропина, эстрогенов; дозаторы пипеточные, центрифуга с горизонтальным ротором, пробирки

центрифужные, бытовой холодильник; микроскопы, предметные стекла, красители, гепарин; спиртовые тампоны, раствор йода, коллодий, вазелин, дистиллированная вода; клеенчатые фартуки, наплечники, нарукавники, перчатки полиэтиленовые пятипалые, гинекологические перчатки резиновые; полотенце, вата серая и вата белая, марлевые и бумажные салфетки; анатомические и хирургические пинцеты, ножницы изогнутые, ножницы прямые и Купера; кюветы, тазы, кружка Эсмарха, ведра.

Методические указания.

Эта тема имеет исключительно важное значение в обучении студентов факультетов ветеринарной медицины и зооинженерного. Проводится несколько занятий в лаборатории, акушерской (ветеринарной) клинике, на мясокомбинате и затем обязательно на ферме.

Сначала в клинике преподаватель знакомит студентов с наиболее существенными изменениями, которые происходят в организме беременных самок, и которые можно использовать в качестве признаков при диагностике этого состояния. После этого рассказывает о существующих способах диагностики беременности и бесплодия, выделяя из них те, которые не требуют специального оборудования (клинические), затем способы основанные на использовании специальных приборов или установок и, наконец, лабораторные, которые требуют определения в биологических жидкостях гормонов или других веществ; объясняет сущность и методику применения этих методов. При рассмотрении клинических методов используются рисунки, муляжи, другие наглядные пособия, половые органы убитых животных и непосредственно животных. В этой части занятия необходимо познакомить студентов с подготовкой акушера для исследования, с правилами обращения с животными, фиксацией их, соблюдением техники безопасности при исследовании.

Для практического освоения различных способов диагностики беременности и бесплодия у различных видов животных проводится несколько занятий. Целесообразно сначала в клинике (в специально оборудованном помещении мясокомбината) на нескольких животных каждого вида продемонстрировать все клинические методы и дать возможность каждому студенту под контролем преподавателя исследовать животное. При проведении занятий на мясокомбинате до клинического (ректального) исследования коров желательнее, чтобы студенты еще раз осмотрели половые органы убитых животных небеременных и с различными сроками беременности.

На последующих занятиях на фермах студенты закрепляют приобретенные навыки диагностики беременности и бесплодия животных клиническими методами и, в то же время, изучают организацию этой работы в хозяйствах. Целесообразно одному преподавателю работать с небольшой группой - не более 8-10 студентами. В начале таких занятий преподаватель на месте уточняет объем работы, выясняет у студентов знания признаков, необходимых для точной диагностики бесплодия, беременности и сроков ее. После этого студенты готовятся к исследованию животных. При стойловом (привязном) содержании животных преподаватель вместе с зоотехником (ветеринарным работником) фермы или специалистом по искусственному осеменению намечают животных, которых необходимо исследовать и к каждому животному прикрепляют студента. Два соседние студента могут помогать друг другу при фиксации и исследовании животного. После завершения студентом исследования животного преподаватель уточняет правильность диагноза, дает соответствующие советы для дальнейшей работы и отправляет студента для исследования очередного животного (в конце группы), а сам переходит к следующему студенту. За 1-2 часа непрерывной работы можно исследовать 50-150 коров, причем каждый студент исследует 10-20 животных. При беспривязном содержании коров (нетелей) студенты вместе с преподавателем работают поочередно, исследуя животных в специально оборудованных станках между двумя смежными загонами (в расколе). В конце занятия подводятся итоги, рассматриваются ошибки и возможности избежать их.

На последнем занятии можно применить лабораторные методы и подвести итог.

Диагностика стельности и бесплодия у коров

Изменения в половых органах у коров.

Яичники. В яичниках у коров на протяжении всей беременности присутствует желтое тело. Отличить его от желтого тела цикла практически невозможно. Поэтому этот признак не может быть использован при постановке диагноза. Если есть возможность исследовать яичник на 10-12-й, 17-, 22-, и 40-й день после осеменения и каждый раз будет обнаруживаться желтое тело в одном яичнике, величина которого не изменялась, а половой охоты в этот период не было, это является важным признаком наступившей стельности.

Содержание прогестерона в периферической крови в течение первых 14 дней такое же, как и в период полового цикла; однако на 18-й день у

стельных животных падение уровня гормона слабое. В последующем содержание его медленно увеличивается, а за 20-30 дней до родов начинает уменьшаться. Содержание эстрогенов в начале и середине беременности менее чем 100 пкг./мл; начиная с 250 дней уровень их повышается, достигая пика за 2-5 дней до родов (76 нг./мл эстрогена сульфата и 1,2 нг./мл эстрогена, W.W. Thatcher et al., 1980). За 8 ч до родов начинается быстрое падение содержания эстрогенов.

Яичники в первые 100 дней стельности располагаются на уровне переднего края лонных костей или несколько ниже и достигаемы для исследования. В последующем в связи с увеличением массы матки и смещением ее в брюшную полость яичники передвигаются вперед (в пределах 8-10 см на стороне беременного рога) и несколько ниже лонного сочленения. У некоторых животных их можно пальпировать в течение первых 5 месяцев беременности.

Матка. У небеременных коров весь половой тракт (включая влагалище, матку, яйцепроводы и яичники) имеет массу до 1,5 кг. У телок и коров крупных пород величина шейки и рогов матки (в среднем) следующая: ширина начальной части обоих рогов (непосредственно впереди шейки матки) равна соответственно 2,5 и 4 см, каждого рога возле бифуркации 2 и 3,5 см, длина связанной части рогов 9 и 14 см и свободной части - 15 и 20 см; длина шейки матки 5 и 10 см и ширина ее 3 и 5 см.

В период стельности масса воспроизводительных органов с содержимым увеличивается 6-кратно. Причем свыше 85% ее приходится на плод, жидкости и плодные оболочки. Для диагностики большое значение имеет не масса, а величина и степень расширения рогов матки жидкостью и плодом (рис. 54).

В 35 дней амнион с зародышем шарообразной формы, диаметром около 3 см, расположен в свободной части рога матки. Эта область рога наполнена жидкостью (величиной с куриное яйцо), что дает возможность поставить положительный диагноз. Однако при пальпации нельзя сдавливать рог в месте расположения амниона, чтобы не вызвать нарушение кровообращения у зародыша и разрыв его сердца. Связанная часть беременного и свободная часть (от бифуркации) небеременного рогов почти не растянуты.

В 60 дней амнион принимает овальную форму и имеет поперечное сечение до 5 см. Это вызывает расширение свободной части рога матки до 6,5 см по сравнению с 2,5-3,5 см у телок и молодых не стельных коров (рис. 55). Такое расширение рога хорошо выявляется. Однако более целесообразно пальпировать верхушку беременного рога: в этом месте ощущение наличия жидкости воспринимается наиболее хорошо.

В 90 дней четко выявляется расширение обоих рогов матки, особенно беременного. Связанная часть беременного рога шириной около 9 см, небеременного - 4-5 см. У многих коров матка расположена у входа в тазовую полость и рука обычно скользит по большой кривизне расширенного рога.

Но нередко у многоорожавших животных матка опускается в брюшную полость и форму ее рогов определить труднее. Нередко пальпируется плод в виде твердого тела.

В период с 120 по 160-й день стельности плод пальпируется более чем в 50% случаев. Результаты пальпации зависят от расположения его к уровню дна тазовой полости. Иногда первыми движениями руки плод отталкивается глубоко в матку и пальпировать его становится труднее. Между 5,5 и 7,5 мес возможность обнаружения плода уменьшается до 40-50% случаев. При благоприятных обстоятельствах пальпируются за передним краем лонного сращения головка или согнутые конечности. Прикосновение рукой нередко вызывает у плода рефлекс движения. Если плод не пальпируется, то учитывают другие признаки - опущенная неподвижная матка, карункулы на ее стенке и увеличение маточных артерий. С 7,5 мес. во многих случаях плод обнаруживается легко, хотя у ряда многоорожавших коров с глубоко опущенным желудочно-кишечным трактом плод при первом исследовании не удается пальпировать.

Изменения величины небеременного рога на протяжении стельности зависят от степени заполнения его аллантоисом. У многих коров эта оболочка располагается только в небольшой части рога, в других случаях занимает $\frac{2}{3}$ его или полностью, а в исключительных случаях совершенно отсутствует в нем.

Важным признаком стельности является нахождение карункулов. Однако величина их сильно колеблется, что зависит от числа и месторасположения в матке. В середине беременного рога величина карункулов наибольшая, в основании и особенно в верхушке рога - наименьшая; в соответствующих местах небеременного рога они значительно меньше.

Впервые карункулы пальпируются между 3,5 и 4 мес. стельности. Обнаруживаются они примерно на 8-10 см впереди и несколько ниже лонного сращения. Для пальпации их энергично поглаживают всей ладонью по верхней стенке матки или же собирают рукой складку. Пальпируются 3-4 карункула диаметром с грецкий орех. По мере нарастания стельности величина карункулов прогрессирующе увеличивается до размера куриного яйца и более, но вследствие опускания матки с 5-го по 7-й мес стельности возможность пальпации их уменьшается.

В период беременности увеличивается диаметр маточных сосудов и изменяется характер пульса и тока крови в них. При умеренном сдавливании артерий вместо обычного пульсового толчка ощущается глубокая вибрация их стенок. Нередко вибрация обнаруживается начиная с 100-го дня. К концу стельности артерии становятся сильно гипертрофированными (толщиной с карандаш) и извилистыми. Раньше такие изменения проявляются на стороне беременного рога матки.

Для определения состояния маточных артерий пальпацию следует начинать с аорты. Средняя маточная артерия (a. uterina media) отходит от пу-

почной артерии (a. umbilicalis), иногда от тазовой (a. iliaca externa). При пальпации руку ладонью вверх продвигают до задней брыжеечной артерии (a. mesenterica caudalis, s. posterior), а затем возвращают по телам позвонков кзади, пропускают тазовую артерию и пальпируют горизонтально расположенный участок средней маточной артерии (впереди края подвздошной кости). Эта артерия в отличие от близлежащих сосудов отличается большей подвижностью. Пальпируют ее, отступив на 2-3 см от места отделения от пупочной артерии.

При наличии двоен в большинстве случаев плоды располагаются в обоих рогах матки и в каждом яичнике имеется желтое тело. Нередко при наличии двух желтых тел в одном яичнике плоды размещаются в двух рогах матки, хотя возможно расположение в одном роге. Встречаются случаи, когда при наличии одного желтого тела в яичнике в соответствующем роге матки имеется два плода (монозиготные близнецы).

При одноплодной беременности плод размещается чаще в правом роге (в 60-68% случаев) и реже в левом (32-40%). У коров мясных пород более равномерное размещение плода в обоих рогах матки.

Методы диагностики стельности

Наиболее ранние сроки использования различных признаков для диагностики беременности клиническим и лабораторными методами показаны в табл. 8.

Наружное исследование включает три диагностических приема: осмотр, пальпацию и аускультацию. *Осмотром* можно установить у стельной коровы более сильное выпячивание правой брюшной стенки, иногда вздрагивание ее вследствие движения плода. В конце стельности обнаруживаются

Таблица 8.

Признаки и методы диагностики стельности

Метод (признак)	Ранний срок диагностики
Ультразвуковой (непосредственное отображение бластоцисты)	13-й день
Отсутствие охоты и наличие в яичнике желтого тела предыдущего цикла	21-й день
Высокое содержание прогестерона в молоке или крови	21-24-й день
Выявление специфического (трофобластного) протеина беременности	24-й день
Пальпация алланта-хориона с жидкостью (скольжение)	33-й день
Увеличение одного рога матки, истончение маточной стенки, флюктуация жидкости в увеличенном роге	35-й день
Пальпация зародыша в напряженном амнионе	45-60-й день
Пальпация плацентом (карнукулов/котиледонов)	80-й день
Увеличение и вибрация средней маточной артерии	85-й день
Обнаружение эстрогена сульфата в крови (молоке)	105-й день
Пальпация плода	120-й день

прогрессирующие отеки вымени и наружных половых органов, иногда - нижней стенки живота (впереди вымени). У первотелок в 4 мес. стельности заметно увеличение сосков; в 6 мес. вымя становится плотным на ощупь и хорошо заметно его увеличение. *Пальпацией* обнаружить плод удастся с 5-6-месячного срока. Обычно пальпацию проводят справа по линии, идущей от

коленного сустава вперед, к подреберью, параллельно позвоночнику. Исследуемый становится лицом к заду коровы (нередко удобнее лицом к голове) и левой ладонью с расправленными или согнутыми пальцами осторожным энергичным надавливанием пальпирует указанный участок брюшной стенки. Нахождение плода является основанием для постановки положительного диагноза на стельность. Прослушать сердцебиение плода у коров удается редко.

Влагалищный метод заключается в мануальном или визуальном исследовании влагалища. *Визуальное* исследование проводится с помощью влагалищного зеркала. Поверхность слизистой оболочки не проявляет каких либо признаков, которые бы были характерными только для стельности. Определенная сухость и бледность ее могут быть в такой же степени выражены в период стельности, как и в период ди-эструса. Но в течение беременности секрет шейки матки становится подобным желатину, формирует пробку, которая закупоривает канал. Во многих случаях она выступает из устья шейки. Это наблюдается обычно после 60 дней. При *мануальном* исследовании обнаружение липкого тягучего секрета, в отличие от слизистого влажного у не стельных животных, может быть важным показателем беременности. При этом в канал шейки матки трудно ввести палец.

Ректальное исследование является самым эффективным методом определения у коров бесплодия и беременности, особенно в первой ее половине. Оно дает возможность безусловно ставить положительный или отрицательный диагноз на беременность и достаточно точно определять ее сроки. *Положительный диагноз* ставят на основании обнаружения характерных изменений матки и маточных сосудов во время беременности, пальпации самого плода и его оболочек, а также длительного сохранения в одном и том же месте в яичнике желтого тела. *Отрицательный диагноз* основан на констатации отсутствия изменения матки, особенно если имеется возможность многократных исследований, наличия изменений в яичниках в соответствии со стадией полового цикла (табл. 8).

Следует отметить, что увеличение матки и маточных артерий, присутствие в яичниках длительное время желтого тела может быть и при ряде патологических состояний и это сказывается на результатах исследований. Точность исследования определяется стадией беременности, состоянием и поведением животного в момент исследования, степенью наполнения его пищеварительного тракта, опытом и квалификацией специалиста.

Техника исследования. Исследование проводят правой или левой рукой. Ногти на руке обрезают и заравнивают подходящим для этой цели инструментом. Если на коже имеются повреждения, то их смазывают раствором йода и клеивают коллодием. Исследуемый надевает резиновые сапоги, водонепроницаемый халат с завязками сзади (или обычный халат, клеенчатый фартук и наплечник); в зимнее время при работе в холодных помещениях используется теплая безрукавка. Затем на руку надевают одноразовую

полиэтиленовую перчатку. При массовых исследованиях коров в хозяйствах, благополучных по заразным заболеваниям, одной перчаткой можно пользоваться для исследования нескольких животных. Если используется резиновая акушерско-гинекологическая перчатка, то после исследования каждого животного необходимо ополаскивать ее теплой водой. В начале исследования перчатку слегка намыливают, чтобы рука легче входила в анальное отверстие.

Животных желательно перед исследованием не кормить в течение 6-10 ч. Обычно же на фермах исследование приурочивают к такому периоду, когда после очередного кормления прошло достаточно много времени. Переполнение пищеварительного тракта затрудняет исследование. При исследовании большого числа животных необходим помощник. Он оказывает помощь при фиксации и записывает результаты, так как помнить всю информацию после исследования 2-3 животных практически невозможно. Если работу проводят на ферме с привязным содержанием, то дополнительной фиксации коров не требуется. Но в процессе исследования, и особенно в момент введения руки в прямую кишку, помощник должен находиться возле коровы, положив ей руку на спину или захватив складку кожи в области холки или коленной складки. При исследовании строптивых животных применяют дополнительные методы фиксации. Во всех случаях исследующий должен помнить, что корова может ударить взад тазовыми конечностями.

Исследующий обхватывает корень хвоста рукой и отводит его в сторону. Другую руку (сначала указательный и средний, а затем все пальцы, сложенные в виде клина) вводит в анальное отверстие. Введение руки не должно быть внезапным. После попадания кисти руки в расширенный отрезок прямой кишки отодвигают руку несколько назад и, разводя пальцы, раскрывают более широко анальное отверстие. При этом воздух заходит в прямую кишку, что обычно вызывает акт дефекации. Дефекацию можно ускорить поглаживая мякишами пальцев верхнюю стенку прямой кишки вблизи анального отверстия. Если дефекация не происходит, а каловых масс много в прямой кишке, то их необходимо удалить рукой. После этого следует выбрать момент, когда впереди расположенный узкий участок прямой кишки расслабится и его можно будет приблизить четырьмя пальцами (большой палец всегда должен оставаться в заднем расширенном участке кишки) и через него проводить пальпацию половых органов. Исследовать через задний участок кишки невозможно, так как он почти полностью связан соединительно-тканной прослойкой с тазовыми костями, преддверием влагалища и влагалищем. Затруднения при исследовании могут быть связаны с узостью анального отверстия и сдавливанием руки, отчего она быстро устает, а также с расширением и напряжением стенки кишки вследствие скопления газов, наличия каловых масс или по другим причинам.

Рука вводится вначале до предплечья, так как необходимо пальпировать в тазовой области, а потом можно вводить и до плеча. Придвинув ее

ближе к переднему краю лонного сращения и смещая вправо, влево, вперед и назад, находят шейку матки. Располагается она вдоль тазового сочленения в виде плотного валика. Впереди шейки находят мягкое тело матки и связанные участки рогов. Эти участки пальпируют обычно средним, указательным и безымянным пальцами. В зависимости от возраста животных, состояния пищеварительного тракта и наполнения мочевого пузыря, стадии полового цикла и срока беременности шейка матки может находиться в середине тазовой полости, на переднем конце лонного сращения или она опущена в брюшную полость. Для определения состояния шейки матки необходимо отодвинуть ее в сторону и полностью обхватить рукой. Нередко это можно сделать только после подтягивания ее с брюшной в тазовую полость.

Можно исследование начинать и с матки. У небеременных или оплодотворенных недавно животных матка расположена в тазовой полости, на лонных костях или в ложбине лонного сращения. Но если мочевой пузырь наполнен мочой, то матка отодвинута вверх или в сторону. В этом случае следует опасаться допустить ошибку, приняв мочевой пузырь за беременную матку. Для пальпации рогов матку приближают путем надавливания на дорсальную поверхность (указательный или средний палец можно ввести в углубление между рогами) и подтягивания ее назад. Пальпируют связанную и свободные части рогов, сравнивая их величину. Для этого, удерживая матку в тазовой полости, четырьмя пальцами отводят в сторону и обхватывают левый рог снизу, а большим пальцем надавливают сверху и пальпируют его до верхушки. Также пальпируют и правый рог матки, однако расположение четырех пальцев (правой руки) должно быть обратным: указательный палец обращен вниз, мизинец находится сверху спереди, а большой палец обхватывает рог снизу, сзади. Кисть руки при этом сильно поворачивают вокруг продольной оси влево.

У многорожавших коров матка обычно смещена в брюшную полость. Переместить ее в тазовую полость можно путем подтягивания за шейку матки. В других случаях кистью руки обводят матку сверху спереди, прижимают к задней части брюшной стенки и постепенно сдвигают (как бы подгребают) в тазовую полость. Нередко для этого требуется сделать несколько глубоких введений руки в прямую кишку, каждый раз все больше и больше смещая матку кзади. В крайних случаях для подтягивания матки используют хирургический инструмент (щипцы). Вводят их во влагалище, фиксируют шейку матки и оттягивают назад. В этих случаях необходимо иметь точные сведения о времени осеменения животного.

После исследования матки находят яичники. У животных небеременных или на ранних стадиях беременности яичники располагаются в тазовой полости или на границе тазовой и брюшной полостей. После 3 мес. стельности они смещаются в брюшную полость вперед на 5-8 см и опускаются несколько ниже края лонного сочленения. Для отыскания их у небеременных животных распрямленную руку кладут на стенку расслабленной кишки и

двигают назад несколько левее или правее сагиттальной линии. Яичники ощущаются подвижными узловатыми телами. Для пальпации сначала обхватывают яичник всеми пальцами сверху и затем поворотом руки влево фиксируют так, чтобы он связанным краем оказался между безымянным и средним пальцами. В таком положении удерживают его и пальпируют сверху и с боков указательным и большим пальцами, а остальными пальцами - снизу. Правой рукой легче пальпировать левый яичник. Для первоначальной фиксации правого яичника руку необходимо повернуть сильно в лево, но после захвата всеми пальцами сверху в дальнейшем поступают также, как и с левым яичником. Все эти манипуляции удаются только после полного расслабления стенки прямой кишки.

При пальпации яичников обращают внимание на их величину, форму, консистенцию, бугристость поверхности. При наличии в яичнике желтого тела величина его будет больше другого (величиной со сливу) и, как правило, обнаруживается выступ. Если корова стельная, то зародыш будет располагаться в роге на стороне этого яичника. Иногда в одном из яичников обнаруживается фолликул, а в редких случаях - киста. Если яичник маленький, гладкий, то в этом роге нет зародыша. Если оба яичника маленькие, то животное небеременное, или же оно осеменено недавно, или находится в состоянии охоты.

У *нестельной* коровы матку можно захватить между ладонью и пальцами руки (забрать в кисть руки). В первые дни и в конце полового цикла при поглаживании матка сокращается и ощущается в виде полушаровидного гладкого образования, разделенного на две половины межроговой бороздой. В расслабленном состоянии место расхождения рогов и межроговая борозда хорошо выявляются. При пальпации рогов устанавливают одинаковую их консистенцию и величину. Но у многорожавших коров правый рог может быть несколько больше левого, а в первые 50-60 дней после отела у всех коров и особенно у первотелок бывший беременный рог заметно больше другого.

В *35 дней стельности* шейка матки в тазовой полости, рога располагаются на крае лонного сращения или свешиваются в брюшную полость. Сократительная функция матки сильно ослаблена. Рог матки с зародышем несколько больше другого, консистенция его более мягкая; при скольжении по нему руки ощущается перемещение жидкости в аллантоисе.

В *2 месяца стельности* шейка матки на лонных костях, рога матки опущены в брюшную полость. Рог-плодовместилище вдвое больше свободного рога матки; в нем ощущается жидкость (проявляется флюктуация). Нередко наличие жидкости хорошо определяется в небеременном рогу. Сократительная функция матки не выражена. Межроговая борозда сглажена.

В *3 месяца стельности* рог-плодовместилище в 2-3 раза больше свободного рога, межроговая борозда слабо пальпируется. Вся матка представ-

ляется флюктуирующим пузырем, величиной с голову взрослого человека. Яичники несколько смещены в брюшную полость.

Примечание:

При исследовании в период до 3 мес. после осеменения возможно одно из следующих заключений:
животное не стельное;

животное, вероятно, стельное, но признаки пока нечетко выражены для постановки точного диагноза;

животное стельное;

невозможность постановки диагноза вследствие затруднений при исследовании.

В 4 месяца стельности шейка матки у входа в таз, матка в брюшной полости, ощущается в виде наполненного жидкостью флюктуирующего тонкостенного мешка; величина и форма определяются с трудом. Иногда флюктуация не ощущается. На стенке матки обнаруживаются карункулы. При исследовании молодых животных этих признаков бывает достаточно, чтобы с уверенностью поставить точный диагноз. У многорожавших коров стремятся обнаружить плод. Если он размещается высоко, то это удается сделать. Если не находят плод, тогда пытаются пальпировать 2-3 карункула впереди края таза (на 8-10 см). Определяют и состояние маточных сосудов; в этот срок ощущается вибрация средней маточной артерии на стороне беременного рога.

Иногда при исследовании животного не обнаруживаются плод, карункулы и изменения в состоянии маточных сосудов. В таких случаях заключение делают на основании следующих признаков: отсутствие в течение 4 мес и более охоты и осеменения; отсутствие небольшой матки и яичников в тазовой полости или вблизи таза; наличие шейки матки на краю таза или в брюшной полости и ограниченной подвижности ее при попытке переместить в тазовую полость.

В 5 месяцев стельности признаки те же, что и в 4 мес, однако четче выявляются карункулы, яснее ощущается вибрация средней маточной артерии, а шейка матки почти полностью смещена в брюшную полость. Плод пальпируется не всегда.

В 6 месяцев стельности матка опущена глубоко в брюшную полость, шейка матки также смещена в брюшную полость. Свободно выявляются карункулы величиной с небольшое куриное яйцо. Сильно выражена вибрация средней маточной артерии на стороне беременного рога, и слабо - на противоположной стороне. Плод обнаруживается редко.

В 7 месяцев стельности признаки те же, что и в 6 мес. Хорошо выражена вибрация обеих средних маточных артерий. При пальпации плода легче распознаются отдельные части его тела.

В 8 месяцев стельности шейка матки перемещается в тазовую полость или расположена у входа в таз. Легко пальпируются предлежащие органы плода.

В 9 месяцев стельности шейка матки и подлежащие органы плода находятся в тазовой полости или вблизи ее. Выявляются предвестники родов.

Дифференциальный диагноз. Ошибки при диагностике беременности могут быть связаны с наличием у животного пиометры, которая нередко является следствием заболевания трихомонозом или же развивается после гибели плода в результате ошибочного осеменения коровы на 3-4-ом месяцах стельности. При пиометре расположение и величина матки оказываются почти такими же, как и у беременных животных в 3 месяца. Однако матка тестообразной консистенции, менее вибрирующая, стенки ее более напряжены и толще, при скольжении руки не ощущается перемещение жидкости как в алланта-хорионе. Часто при пиометре оба рога матки расширены в одинаковой степени, однако имеются случаи, когда больше расширен рог на стороне яичника с желтым телом. На основании однократного исследования ставить диагноз нельзя. Требуется несколько повторных исследований с промежутком 7-10 дней. Но если животное было осеменено 4-5 месяцев назад, а величина матки как в 90 дней стельности и на ее стенке не пальпируются карункулы, то это дает основание сделать точное заключение. В других случаях при повторных исследованиях констатируют отсутствие изменений в величине матки и карункулов, отсутствие плода, наличие периодических выделений.

При мумификации гибель плода происходит в возрасте 5-7 месяцев и величина его после рассасывания жидкости оказывается значительно меньше, чем на такой стадии развития.

Диагностирование многоплодной стельности ректальным методом необходимо проводить спустя 50-70 дней после осеменения (эмбриопересадок). При наличии у коров флюктуации околоплодной жидкости в обоих рогах матки и относительно равных их размерах велика вероятность стельности двумя плодами.

Лабораторные методы диагностики стельности и бесплодия. Наиболее точным и широко применяемым в мировой практике является тест, основанный на определении содержания прогестерона в крови или молоке. Этот тест обеспечивает ранний диагноз стельности или бесплодия. Он заключается в количественном определении гормона у осемененной самки в строго определенное время.

У животного после охоты содержание прогестерона повышается в первые дни цикла и остается высоким до 17-18-го дня. В конце цикла уровень его резко снижается, что совпадает с началом регрессии желтого тела. У стельной коровы желтое тело не регрессирует и высокий уровень гормона поддерживается в течение всей беременности. Для исследования можно использовать сыворотку или плазму крови, или же молоко. Причем вследствие хорошей растворимости прогестерона в молочном жире, концентрация его в молоке выше, чем в крови.

Для проведения исследования у коровы или телки берут кровь через 20-23 дня, а молоко - через 21-24 дня после осеменения. Молоко (около 20 мл) выдаивают в стеклянную или пластиковую пробирку. Предварительно в нее добавляют 0,1 мл насыщенного раствора калия бихромата. Молоко желательно брать во время послеобеденного доения, так как в это время суток оно имеет более высокое содержание жира. Взятые образцы молока следует предохранять от воздействия ультрафиолетовых лучей и высокой температуры.

После взятия крови как можно раньше отделяют путем центрифугирования форменные элементы и плазму хранят в замороженном состоянии до исследования. Для получения сыворотки кровь помещают на несколько часов в холодильник, после чего центрифугируют и полученную сыворотку также хранят в мо-

розильной камере. Длительное хранение цельной крови до получения сыворотки или плазмы при комнатной температуре нежелательно, так как содержание прогестерона при этом снижается.

Содержание прогестерона определяют непосредственно на ферме методом ELISA, основанным на использовании наборов для энзим-иммуносорбентного исследования или в специальных лабораториях радиоиммунным методом. У стельного животного уровень прогестерона в крови не менее 2 нг/мл, а в молоке - 11 нг/мл, у небеременных животных более низкое содержание гормона. Диагноз очень точен для небеременных животных (около 100%). Точность положительных диагнозов менее высока (80-88%).

Наиболее вероятные причины *фальс-отрицательного диагноза*:

- низкий уровень секреции прогестерона желтым телом;
- низкое содержание жира в отобранном образце молока;
- нарушение условий хранения исследуемой пробы молока;
- ошибки в нумерации проб на ферме или в лаборатории.

Причины фальс-положительного диагноза:

- короткий половой цикл; при взятии пробы молока на 24-й день у небеременной коровы в это время будет сформировано желтое тело очередного полового цикла, который остался незамеченным;
- гибель эмбриона после взятия пробы молока;
- наличие в яичнике лютеиновой кисты;
- осеменение не в период охоты; если корова была осеменена в начале или середине ди-эструса, оплодотворение не происходит и при взятии образца молока для исследования на 24-й день в яичнике может присутствовать желтое тело следующего пропущенного цикла.

Главное преимущество этого метода состоит в том, что он, как и ультразвукография, позволяет раньше других методов выявить бесплодие, выяснить причины и при необходимости провести лечение и осеменить животное в очередной цикл. А при исследовании молока на 19-й день после осеменения в случае низкого содержания прогестерона можно выявить очередную охоту и повторно осеменить животное.

Диагностика суягности и бесплодия у овец и коз

Беременность и бесплодие у овец и коз можно диагностировать путем систематического применения самцов-пробников, а с 3,5 мес беременности - наружным исследованием. Точные результаты в ранние сроки можно получить путем ультразвукового исследования или применения других методов.

Выявление охоты с большой вероятностью указывает на отсутствие суягности, а отсутствие ее в течение 16-19 дней после осеменения - на наличие беременности. Однако 10% или более овец, не проявивших в этот срок охоту, вследствие эмбриональной смертности оказываются небеременными, а 20-30% животных проявляют охоту в ранние сроки беременности.

Наружное исследование проводят начиная с 100-го дня суягности. Животное выдерживают на полусуточной голодной диете. В момент исследования матку желателно приподнять за тазовые конечности. В этом случае желудочно-кишечный тракт сместится к диафрагме, и давление в задней части брюшной полости станет слабее. Исследующий становится справа, обхватывает с обеих сторон животное и периодически приподнимает брюшную стенку под поясничными позвонками (непосредственно впереди вымени). В этот момент можно ощущать рукой перемещение плода.

Исследование с помощью ультразвуковых приборов основано на выявлении сердцебиения плода или шумов в сосудах пуповины, а при графическом отображении - на обнаружении жидкости в полости рогов матки, плацентом или самих плодов.

Для прослушивания сердцебиения или шумов с помощью детектора пульса (Doppler) сканируют область живота впереди вымени; до начала пробы тщательно удаляют волос и смазывают подготовленный участок вазелином. Во время пробы учитывают, что частота сердцебиения у плода превышает частоту сердцебиения матери. Но в конце беременности у матери частота пульса может быть выше. В период между 40 и 80 днями точность диагноза не выше 60%, а после 80 дней - свыше 90%.

При использовании приборов с графическим отображением и сканировании через прямую кишку с 35-го дня (не ранее 20-25 дней) устойчиво выявляются жидкость, плацентомы и эмбрионы, а при сканиро-

вании через брюшную стенку (бок живота, область паха) - с 35-50-го дня. Идеальное время для ультразвукографии - с 45-го по 50-й день.

Возможно использование для диагностики беременности у овец и коз радиографии (с третьего месяца; после 96 дней точность 100%), гистологического исследования слизистой оболочки влагалища (с 40-го дня; с 80-го точность 100 %), определения содержания прогестерона в молоке или плазме крови (на 18-22-й день 3,7 нг/мл у беременных и 1 нг/мл у небеременных; точность 82-84%), пальпации задней маточной артерии через стенку влагалища (точность низкая) и др.

Диагностика жеребости и бесплодия у кобыл

Изменения в половых органах у кобыл

Жеребость до 40 дней. В конце половой охоты в яичниках находится до 10-12 крупных фолликулов, но большинство из них непосредственно перед овуляцией уменьшается в величине. Созревшие фолликулы имеют в диаметре в среднем 41 мм. Овуляция происходит в течение 40-45 с. За это время фолликул быстро уменьшается в величине и жидкости в нем почти не остается. В первый день после овуляции формирующееся желтое тело небольшое и имеет такую консистенцию, как и наполненный жидкостью фолликул. Различить желтое тело пальпацией от других тканей яичника можно в течение 1-2-х дней. Ультразвуковым исследованием желтое тело распознается в любое время независимо от расположения в яичнике. Этим способом выявляется два типа желтых тел: устойчивый экзогенный, наиболее часто встречающийся, и с не экзогенной центральной частью. Второй тип желтых тел имеет место в 9-10% случаев при одиночных и до 36% - при двойных овуляциях.

До 40-го дня в яичниках выявляются только первичные желтые тела (одно или два). К 18-20-му дню обнаруживается несколько фолликулов диаметром 10-40 мм. Затем они подвергаются регрессии и новая волна роста фолликулов наблюдается около 40 дней. Наличие желтого тела после 20-го дня при отсутствии эмбриона возможно в случае развития ложной беременности.

Матка в течение ди-эструса и эструса мягкая, эндометрий тонкий. После овуляции тонус матки увеличивается и она становится более цилиндрической (напоминает батон колбасы). Такие изменения почти незаметны у небеременных животных и совершенно исчезают у них после начала регрессии желтого тела на 10-14-й день; у беременных кобыл желтое тело остается и тонус матки увеличивается до 19-21-го дня, что вызывает характерные изменения формы матки и рогов. Затем зародыш вызывает появление мягкой припухлости истончающейся части рога, примыкающей к телу матки.

В большинстве случаев (64%) зародыш размещается в правом роге, хотя овуляция чаще происходит в левом яичнике. Но у лошадей внутриматочная

точная миграция зародыша - явление обычное. У пони частота размещения зародыша в правом роге незначительно больше, чем в левом. При двойнях зародыши располагаются в обоих рогах матки. Расширение рога зародышем распространяется внизу в переднем и заднем направлениях и оно слабо возрастает до 30 дней. Затем рост зародыша усиливается и припухание прогрессивно увеличивается до верхушки беременности рога матки. На 35-40-й день начинают развиваться эндометриальные чаши, которые продуцируют ГСЖК.

Зародыш на 10-й день находится в теле матки не в фиксированном состоянии, имеет сферическую форму и величину 0,6 мм в диаметре. Обладает способностью к перемещению; эта способность увеличивается до 15-го дня. После 17-го дня внутриматочная миграция зародыша прекращается. Быстрый рост зародышевого пузырька наблюдается до 17-го дня; после этого он приобретает неправильную форму. Резко повышается тонус матки, утолщается стенка. Ультразвуковым методом зародышевый пузырек можно обнаружить с 9-го дня. Эмбрион в пузырьке впервые выявляется на 20-25-й день. Сокращения сердца обнаруживаются на 22-й день. Ультразвуковой метод позволяет определить и частоту эмбриональной смертности. С 10 по 50 день погибает от 5 до 30% эмбрионов (в среднем 13,4% при осеменении кобыл свежеполученной спермой и 13,3% - при хирургической трансплантации эмбрионов; E.L.Sguires et al., 1988). Гибели предшествует уменьшение частоты сердечных сокращений и полное их прекращение, уменьшение плацентарной жидкости, разрушение оболочек).

Влагалище после оплодотворения прогрессирующе становится бледным и сухим и покрыто тонким слоем густой липкой слизи. Шейка матки небольшая и плотно закрыта. Наружное отверстие постепенно заполняется слизистой пробкой и размещается эксцентрично.

Жеребость с 40 по 140 день. Повышается фолликулярная активность яичников, происходит овуляция созревших или лютеинизация неразорвавшихся фолликулов, образование дополнительных желтых тел, которые обеспечивают необходимую концентрацию прогестерона в организме до начала секреции гормона плацентой. Вследствие созревания фолликулов один или оба яичника сильно увеличиваются и становятся больше, чем в период охоты. Спадает фолликулярная активность на четвертом месяце жеребости.

Эндометриальные чаши с 38-42-го дня продуцируют ГСЖК. Уровень гонадотропина повышается максимально до 50-200 ИЕ в мл сыворотке крови на 50-70-й день, затем постепенно снижается до 0 к 110-140 дням.

Зародышевый мешок в 2 месяца жеребости полностью занимает беременный рог матки. В последующем алланта-хорион внедряется в тело и затем в небеременный рог матки. Беременный рог начинает изменять положение в брюшной полости от поперечного до продольного.

В период около 100 дней наполненная жидкостью матка слабо напряжена и давит на вход в тазовую полость. Плод в это время небольшой, плотно окружен амнионом и плавает в относительно большом объеме аллантоисной жидкости. Плацента начинает продуцировать огромные количества эстрогенов, которые в конъюгированном виде выделяются с мочой.

Жеребость после 140 дней. В это период отмечается постепенная регрессия желтых тел и фолликулов; яичники становятся все меньше и меньше в величине, твердыми и оттягиваются беременной маткой в брюшную полость вниз вперед. Матка постепенно расширяется плодом и жидкостью и увеличивается в объеме и массе. За весь период беременности масса ее (без содержимого) увеличивается в 4-5 раз. Небеременный рог увеличивается в меньшей мере. Вследствие увеличения в объеме и массе матки с содержанием (в 5-20 раз) и смещения ее вниз сильно возрастает напряжение на маточно-яичниковые связки. Матка оттесняется толстым отделом кишечника влево и прилегает к левой брюшной стенке; со второй половины беременности левая брюшная стенка заметно выпячивается, а в конце плодотворения нижняя часть ее отвисает. Плод после восьмого месяца принимает в матке устойчивое продольное положение. Содержание эстрогенов в моче достигает максимума на 200-250-й день, затем медленно уменьшается к концу ее.

Методы диагностики жеребости

Клинические методы основаны на сборе анамнеза, наружном и внутреннем исследовании животного.

Путем собирания анамнестических данных и наблюдения можно выявить только вероятные признаки жеребости. Отсутствие половой охоты в течение 16-22-х дней после осеменения является наиболее существенным из таких признаков. Достоверность этого признака более высока, если после осеменения ежедневно начиная с 8-10 дня проверяют кобылу пробником: в течение 20-30 мин. содержат ее вблизи жеребца или вместе со стреноженным жеребцом. Однако точность диагностики по отсутствию охоты не слишком велика, так как некоторые кобылы могут не оплодотвориться, но затем проявить состояние анэструса или же "тихую овуляцию"; у других после оплодотворения происходит ранняя гибель зародыша с последующим развитием состояния ложной беременности, когда половые циклы также отсутствуют; некоторые беременные животные, напротив, проявляют половую охоту в это время.

При наружном осмотре животного со второй половины беременности можно установить ряд вероятных признаков (изменение контуров живота, увеличение и отек молочной железы, отек брюшной стенки и одной или обеих тазовых конечностей) и истинный признак - движение плода. Пальпацией брюшной стенки после 6 месяцев обнаруживается плод, а при благоприятных анатомо-топографических условиях прослушивается и его серд-

цебиение, которое отличается большей частотой (120-130 ударов в минуту), по сравнению с сердцебиением матери.

Наружное исследование должно проводиться натошак. Кобылу ставят на ровную площадку и путем поворота ее головы налево ослабляют напряжение брюшной стенки. Помощник поднимает левую переднюю ногу. Исследующий становится лицом к крупу животного, левой рукой берется за холку, а правой ладонью (удобнее с согнутыми пальцами) осторожным коротким надавливанием пальпирует различные участки брюшной стенки по линии от коленного сустава к пупку. Ощущение ответного толчка твердого тела после начала ослабления давления руки связано с возвращением отодвинутого вглубь брюшной полости плода. Если не нащупали твердое тело, то нужно попытаться уловить рукой движения плода (удар, трение, скольжение, вращение). Прослушивание проводится с помощью фонендоскопа в тех же участках, что и пальпация. Нередко не удается пальпировать плод (или прослушать его сердцебиение) даже у глубоко жеребых кобыл. Но это не может расцениваться как отрицательный результат.

Влагалищный метод диагностики включает *визуальное* и *мануальное исследование*. Для проведения диагностики этим методом кобылу заводят в станок или фиксируют с помощью случной шлеи. При необходимости дополнительно поднимают переднюю конечность. Наружные половые органы и промежность тщательно моют. *При визуальном исследовании* стерильное прогретое влагалищное зеркало слегка смазывают вазелином. Исследующий и помощник касаясь пальцами половых губ с обеих сторон приоткрывают половую щель, после чего подготовленное зеркало вводится во влагалище. Проводится быстрый осмотр слизистой оболочки; при этом определяют цвет ее, наличие и характер слизи, состояние шейки матки и наружного отверстия. *У небеременных животных* зеркало вводится относительно свободно. Слизистая оболочка влажная, блестящая, покрыта небольшим количеством слизи. Шейка матки расположена в центре, неглубоко, иногда вдается в просвет раскрытого зеркала. В канале шейки матки отсутствует слизистая пробка. *У беременных кобыл* отмечается значительное сопротивление при введении влагалищного зеркала вследствие сухости стенок влагалища и наличия липкой слизи. Отмечается бледность слизистой оболочки. В устье шейки матки имеется слизистая пробка. *При мануальном исследовании* руку в перчатке вводят во влагалище. Определяют физическое состояние его стенок и консистенцию слизи, а также наличие или отсутствие слизи в устье шейки матки.

Дополнительно к влагалищному исследованию рекомендуется провести микроскопическое исследование цервикальной слизи (метод Курасова, 1931). Слизь берут деревянной палочкой с ватным шариком или корнцангом, делают мазок и окрашивают краской Романовского (3 капли на 1 мл дистиллированной воды). В мазках у жеребых кобыл выявляются клетки реснитчатого эпителия и единичные клетки плоского эпителия, редко ней-

трофилы; слизь в виде гомогенных голубых шаров. У небеременных животных в мазках находят клетки плоского эпителия, нейтрофилы и единичные клетки реснитчатого эпителия.

Влагалищный метод диагностики не дает абсолютной уверенности в наличии или отсутствии жеребости и не позволяет устанавливать сроки ее. Микроскопическое исследование слизи на 20-40-й день дает 77,6% точных результатов, а после 70 дней - 94,8% (W.C. Miller and F.T. Day, 1938).

Ректальное исследование кобыл следует проводить осторожно, желательнее натошак, в просторном теплом помещении с ровным полом, а в теплое время года на открытой площадке. Животное фиксируют с помощью случной шлеи или вожжей. Фиксируют обе тазовые конечности и приподнимают голову; хвост можно забинтовывать. В момент введения руки в прямую кишку у строгих кобыл приподнимают левую переднюю конечность. Исследовать целесообразно двумя руками. На руки одевают длинные полиэтиленовые перчатки или специальные гинекологические резиновые перчатки; можно исследовать и незащищенными руками, предварительно хорошо смазав их вазелином. Сначала освобождают прямую кишку от каловых масс. Затем продвигают правую руку (достаточно четыре пальца) в узкую часть кишки до уровня 4-5-го поясничного позвонка, сгибают пальцы под прямым углом и прижимают их к левой брюшной стенке в области голодной ямки. Двигая руку спереди назад в области маклока находят яичник, а несколько ниже напряженный тяж - передний край маточно-яичниковой связки. Так как яичник не имеет постоянного положения, то нередко приходится исследовать всю верхнюю часть тазовой полости и примыкающую к ней область брюшной полости. Отыскав яичник, захватывают его между большим пальцем, ладонью и кончиками остальных пальцев исследуют его, а потом в согнутом положении кисть руки опускают вниз назад. Рука должна скользить по маточно-яичниковой связке, при этом четыре пальца поддерживают ее снизу и обращены вниз назад, а большой палец располагается сверху и также обращен назад. Со связки рука попадает на верхушку рога матки. Пальпируя его смещают руку вправо и достигают места расхождения рогов. Не изменяя положения кисти руки пальпируют переднюю часть тела матки (дно матки). Затем распрямив пальцы отодвигают кисть руки назад по телу матки до шейки и пальпируют ее. Опять руку возвращают вперед к месту расхождения рогов, придают кисти руки согнутое положение, смещают ее вправо и пальпируют правый рог матки до верхушки, при этом постепенно поворачивая руку вокруг продольной оси влево, достигают маточно-яичниковой связки и правого яичника. Однако делать это правой рукой затруднительно. Удобнее правый рог и соответствующий яичник пальпировать левой рукой.

В период беременности в связи с увеличением кровообращения матки увеличивается диаметр маточных сосудов и изменяется характер тока крови в них. Начиная с 4-5-го месяца жеребости при сдавливании средней

маточной артерии, а в более поздние сроки - двух других маточных сосудов вместо обычного пульсового толчка ощущается протяжная вибрация их стенок. Сосуды можно обнаружить непосредственно в широкой маточной связке или же в месте отделения их от аорты. У кобыл средние маточные артерии отходят от наружных подвздошных артерий (aa. iliaca externa), а эти сосуды от брюшной аорты под пятым поясничным позвонком. Для ощущения вибрации маточных артерий необходимо сдавливать их не в месте отделения, а несколько ниже. Переднюю маточную артерию находят в связке относительно средней артерии. Задние маточные артерии отходят от геморроидальных (aa. haemorrhoidalis media), а эти артерии от внутренних подвздошных (a. iliaca interna), которые являются двумя конечными ветвями делящейся брюшной артерии на уровне 6-го поясничного позвонка.

У небеременных кобыл рога матки одинаковой величины, плоские, дрябловатые, в виде ленты или тесьмы. При пальпации в первые 10-12 дней после овуляции иногда рога матки сокращаются и на непродолжительное время (до 7-10 секунд) приобретают цилиндрическую (колбасовидную) форму. Шейка матки на уровне лонных костей и несколько приподнята над дном тазовой полости. Если прижать ее пальцами к тазовому сочленению то ощущается в виде продольного валика длиной 4-8 см. Впереди без резких границ переходит в тело матки, а сзади в виде втулки вдается во влагалище.

У жеребых кобыл впервые зародыш можно пальпировать на 17-21-й день, когда выявляется мягкий, маленький, припухший участок рога матки величиной 2,4-2,8 см (с маленькое куриное или голубиное яйцо, мячик для гольфа) или же проявляется ощущение небольшой брешки (провала) в напряженном, округлом роге. Более легко такой участок ощущается между 21 и 30 днями, но только в передне/нижней его части; в 25 дней флюктуирующая припухлость имеет величину 3-3,4 см (с яйцо молодки).

В 30 дней припухание распространяется не только на нижнюю, но и верхнюю стенки; диаметр ее 3-4 см (с куриное яйцо). В последующем такой характер припухлости сохраняется и величина ее равномерно возрастает до 60-го дня; в 35 дней - с теннисный мяч, в 40 дней - с апельсин или яйцо индейки (6-7 см в диаметре), в 45-50 дней - с грейпфрут и в 60 дней - с крупный грейпфрут. Свободный рог в 2 месяца жеребости цилиндрической формы и почти не изменен в величине. В это время может быть распознана двойня. Позднее оболочки с жидкостью одного плода внедряются в оба рога матки и флюктуация становится диффузной, поэтому определить, один или два плода развивается в матке, оказывается невозможным.

В 3 месяца беременности матка прощупывается в виде раздваивающегося впереди пузыря величиной с детский футбольный мяч, а в 110 дней - с продолговатый мяч регби. Располагается этот пузырь на лонном сращении. Рога матки, в виде двух ответвлений пузыря, смещаются вперед в брюшную полость. Цилиндрическую форму имеет только верхушка свободного

рога. В 70-100 дней можно ошибочно принять наполненный мочевой пузырь за беременную матку, а в 90-120 дней - наполненную большую ободочную кишку. Распознают матку по месту расхождения рогов и связи с яичником посредством маточно-яичниковой связки.

Следует отметить, что величина плодового мешка до 110 дней строго зависит от срока беременности и величины животного. Если величина кажется меньше, чем должна быть, то необходимо провести повторное исследование в более позднее время, чтобы исключить гибель зародыша. Около 100 дней в теле матки часто пальпируется свободно плавающий в аллантоисной жидкости плод. Яичники оттягиваются опускающейся маткой и располагаются близко один от другого на уровне 3-4-го поясничных позвонков. Оба или один из них могут быть увеличены вследствие развития фолликулов и образования желтых тел.

В 4 месяца беременности яичники сближены и глубоко опущены брюшную полость, обычно не пальпируются или же обнаруживаются на уровне 2-3-го поясничных позвонков и дна тазовой полости. Тело матки в виде продолговатого, слабо напряженного флюктуирующего мешка величиной с большой арбуз пальпируется в брюшной полости. Начиная с конца четвертого месяца вследствие уменьшения напряжения плодного мешка и заметного роста плода легко пальпируется та часть плода, которая размещается в теле матки.

Между 5-м и 8-м мес беременности матка прогрессирующе опускается в брюшную полость и становится трудно достигаемой для исследования. Широкие маточные связки напряжены. С 5-го месяца начинает проявляться вибрация средней маточной артерии со стороны рога-плодовместилища. С 5-го по 7-й мес отмечаются затруднения в пальпации плода, особенно у крупных многоорожавших кобыл. Шейка матки к 8-му мес полностью опущена в брюшную полость; хорошо проявляется вибрация стенок обеих средних маточных артерий и начинается вибрация задней маточной артерии со стороны рога-плодовместилища.

С 9-го по 10-й мес матка значительно увеличивается в размерах и начинает смещаться в тазовую полость. Плод достигаем для пальпации. Все маточные артерии вибрируют.

В 11 мес в тазовой полости пальпируются предлежащие части плода. Но иногда у кобыл перед родами могут быть затруднения в пальпации плода. Однако отсутствие вблизи тазовой полости небеременной матки и напряжение связок убеждают в наличии беременности.

Оптимальное время для исследования кобыл - 35-40 дней. В этот период легко дифференцируется припухшая часть рога матки от остальной напряженной его части; диагностируется двойня; может быть установлена ложная беременность и предприняты меры для стимулирования цикличности и осеменения; можно выявить кобыл, которые не оплодотворились и у которых был пропущен второй половой цикл. Исследование до 30 дней, а

затем повторное в более позднее время, позволяет выявить случаи эмбриональной смерти. Установлено, что осторожная пальпация матки не является причиной гибели зародыша.

Диагностика беременности и бесплодия у свиней

В свиноводстве особое значение имеет ранняя диагностика беременности. Важно знать уже к концу третьей недели, что матка или свинка не беременны, чтобы своевременно осеменить их повторно или же отправить на убой.

Рефлексологический метод. Проявление или отсутствие половой охоты у свиней на 17-22-й день после осеменения указывает на бесплодие или возможную беременность. Для выявления охоты ежедневно начиная с 15-го дня в группы свиноматок пускают на 0,5-1,5 ч хряка-пробника. Точность диагноза бесплодия (выявление охоты) приближается к абсолютной, а беременности не превышает 80-85%. Отсутствие охоты может быть связано со слабым проявлением признаков ее, с анэструсом или кистами яичников.

Ультразвуковой метод. При использовании ультразвуковых эхолокаторов с переносным зондом-передатчиком (приборы модели А, внешний датчик, 2 МГц, рис.) в период с 30 до 90 дней после осеменения в 99% случаев достигается точность диагноза беременности и в 98% - бесплодия; подобные результаты можно получить при исследовании в период от 30 до 60 дней. Точность исследования в первые 30 дней ниже.

Модели приборов (тип В), которые дают непосредственное отображение исследуемой области, наиболее эффективны. Датчик прибора прикладывают к брюшной стенке стоящей свиноматки на 5 см сзади пупка и латеральнее правых сосков и продвигают по направлению к задней части живота. Предварительно область перемещения датчика смазывают связывающей средой. Точность диагноза после 22-х дней приближается к абсолютной. Ошибки могут быть вызваны гибелью зародышей. При использовании датчика 5 МГц, введенного в прямую кишку, можно точно диагностировать беременность в период между 12 и 20 днями.

Ректальный метод. Этот метод применим у многорожавших крупных (масса 150 кг или более) животных.

Перед исследованием свиноматку помещают в клетку для осеменения, фиксируют петлей за верхнюю челюсть и затем делают очистительную клизму (1-2 л теплой кипяченой воды). Исследуют животное двумя руками: левую сторону правой, а правую сторону - левой рукой. Если после введения руки отмечаются сильные сокращения прямой кишки, то исследование на некоторое время прекращают. Через расслабленную прямую кишку хорошо пальпируются влагалище, матка и яичники.

Яичники находят возле соответствующей брюшной стенки на 10-15 см ниже маклоков. У свинок в возрасте 9 мес. величина левого и правого яичников составляет: длина 2,7 и 2,8 см, ширина 1,7 и 1,9 см и высота 1,2 и

1,3 см; у здоровых свиноматок длина яичников колеблется от 3 до 4 см, ширина - от 2 до 2,5 см. При атрофии яичников отмечается уменьшение их величины. При пальпации яичников можно обнаружить фолликулы, желтые тела или кисты. Фолликулы пальпируются как тонкие, флюктуирующие пузырьки разного диаметра; крупные фолликулы сильно напряжены и при пальпации их у животного проявляется болезненность. Желтые тела пальпируются в виде плотных бугорков над поверхностью яичника. Диаметр желтых тел и фолликулов не превышает 1 см. Кисты яичников пальпируются в виде тонкостенных пузырьков большего диаметра, чем фолликулы. Однако отличить мелкие кисты от фолликулов невозможно, но при повторных исследованиях через 2-3 недели обнаруживают их увеличение или же овуляцию и наличие желтых тел.

Для диагностики беременности важное значение имеет точное определение состояния яичников и матки, а также средней маточной и наружной подвздошной артерий. Эти артерии пересекаются на уровне последних поясничных позвонков. Наружная подвздошная артерия направляется вперед в брюшную полость и может быть определена как ветвь маточной артерии, идущая вдоль подвздошной кости в сторону задней конечности. Однако она имеет постоянный диаметр во время беременности (около 1 см у взрослых свиноматок), все время вибрирует и не перемещается, так как тесно соединена с окружающими тканями. Средняя маточная артерия располагается в маточной связке, поэтому легко смещается; она проходит сверху вниз и назад, а затем поворачивается вперед и вниз. Диаметр ее меняется в зависимости от сроков беременности.

0-21 день беременности. Состояние шейки и матки подобно как и у небеременных животных в середине цикла. Однако бифуркация рогов менее отчетливо выражена, матка несколько увеличена, а стенки ее становятся мягче. Средняя маточная артерия к концу третьей недели имеет диаметр около 5 мм в месте пересечения с наружной подвздошной артерией. С 6-8-го дня беременности в яичниках пальпируются желтые тела.

21-30 дней. Бифуркация рогов слабо выражена, стенка шейки и матки дряблая, тонкая. Средняя маточная артерия 5-8 мм в диаметре и более легко обнаруживается.

31-60 дней. Шейка матки пальпируется как удлиненная трубка с мягкими стенками. Матка едва обнаруживается и имеет тонкие стенки. Средняя маточная артерия достигает диаметра наружной подвздошной артерии. Вибрация ее впервые может быть обнаружена в 35-37 дней. Для сравнения можно пальпировать наружную подвздошную артерию.

С 60 дней до родов. Средняя маточная артерия имеет больший диаметр, чем наружная подвздошная, и хорошо вибрирует; место пересечения с наружной подвздошной сдвигается кзади, чем ранее. Плоды пальпируются только в конце беременности вблизи бифуркации рогов матки.

Точность положительного диагноза в период 30-60 дней беременности 94-99%, отсутствия беременности - 86-97%.

Метод биопсии влагалища. Гистологическое исследование базируется на том, что в период проэструса и эструса под влиянием эстрогенов отмечается пролиферация покровного эпителия и число слоев клеток достигает 20. К 11-12-му дню цикла, когда доминирует прогестерон, происходит уменьшение их до 3-4, а в конце диэструса - до двух слоев. По мере развития беременности прогестерон продолжает доминировать и к 26-му дню типичной гистологической картиной является два параллельных ряда клеток с темно окрашенными ядрами. Такая картина сохраняется до последних трех недель беременности (рис.). Точность положительных диагнозов - 97%, отрицательных - 94% (McCaughey, 1979). Наилучшее время для получения биопсийного материала - 18-25-й день после осеменения. Материал из задней части влагалища или шейки матки не позволяет получить удовлетворительные результаты.

Под микроскопом студенты изучают заранее приготовленные гистологические препараты.

ЛИТЕРАТУРА

1. Валюшкин К.Д., Г.Ф. Медведев. Акушерство, гинекология и биотехника размножения животных: Учеб. - Мн.: Ураджай, 1997. - 718 с.: ил.
2. Практикум по акушерству, гинекологии и искусственному осеменению сельскохозяйственных животных / В.С. Шипилов, Г.В. Зверева, И.И. Родин, В.Я. Никитин. - М.: Агропромиздат, 1988. - 335 с.: ил.
3. Заянчковский И.Ф., И.В. Смирнов. Практикум по искусственному осеменению сельскохозяйственных животных. М., "Колос", 1975. - 272 с.: ил.
4. Ветеринарное акушерство, гинекология и биотехника размножения. А.П. Студенцов, В.С. Шипилов, Ё.А., Никитин В.Я. и др. - М.: Колос, 1999. - 495 с.: ил.
5. Акатов В.А., Г.А. Кононов, А.И. Пospelов, И.В. Смирнов. Ветеринарное акушерство и гинекология. Под ред. проф. Г.А. Кононова. Л.: Колос, 1977. - 656 с.: ил.
6. Балашов Н.Г. Ветеринарный контроль при искусственном осеменении животных. - М.: Колос, 1980. - 272 с.: ил.
7. Воскобойников В.М., Валюшкин К.Д., Терешенков А.С. Борьба с яловостью коров. - Минск: Ураджай, 1976. - 192 с.
8. Шипилов В.С. Основы повышения плодовитости животных. Смоленск, ред.-издат. агенство "DELO". 1994. 160 р.
9. Солсбери Г.У., Ван Демарк Н.Л. Теория и практика искусственного осеменения коров в США. Перевод с англ. Под ред. и с предисловием В.К. Милованова. М., изд-во "Колос", 1966. 527 с.
10. Полянцев И. И., Синявин А. Н. Акушерско-гинекологическая диспансеризация на молочных фермах.- 2-е изд., перераб. и доп.- М.: Росагропромиздат, 1989 г. - 176 с.: ил.
11. Заянчковский И. В. Задержание последа и послеродовые заболевания у коров. Издательство "Колос", Москва, 1964. 384 с.
12. Инструкция по искусственному осеменению и воспроизводству стада в скотоводстве. - Минск, 1999. - 88 с.: ил.

13. Инструкция по взятию, оценке и замораживанию спермы быков-производителей на племпредприятиях. - Жодино, 1998. - 37 с.

14. Инструкция по трансплантации эмбрионов крупного рогатого скота. - Москва, 1987. 92 с.: ил.

15. The artificial insemination and embryo transfer of dairy and beef cattle (including information pertaining to goats, sheep, swine, and other animals). A handbook and laboratory manual. H.A. Herman, Jere R. Mitchel, Gordon A. Doak. 1994. - 382 p. ISBN 0-8134-2969-2.

16. Bearden H.Joe, John W. Fuquay. Applied Animal Reproduction. - 3rd ed. 1992, p. 352. ISBN 0-13-040346-6.

17. Veterinary Reproduction & Obstetrics. Geoffrey H. Arthur, David E. Noakes, Harold Pearson, Timothy J. Parkinson. Seventh Edition. 1996 W.B. Saunders Company Ltd. 726 p. ISBN 0-7020-1785-X.

18. Veterinary endocrinology and reproduction. L.E. McDonald; N.H. Pineda. - 4th ed. 1989, 571 p. ISBN 0-8121-1134-6.

ЧАСТЬ 1.

БИОТЕХНИКА РАЗМНОЖЕНИЯ ЖИВОТНЫХ

ПОЛОВЫЕ ОРГАНЫ САМОК И ИХ ФУНКЦИЯ

Цель занятий: приобретение студентами глубоких знаний морфо-функциональных качеств и топографии половых органов небеременных самок сельскохозяйственных животных.

Объекты исследований, материалы и оборудование: животные - корова, кобыла, коза (овца), свинья; случная шлея (повал), носовые щипцы, веревки для фиксации животных; половые органы убитых самок; муляжи, рисунки, диаграммы, слайды, гистопрепараты; перчатки резиновые и одноразовые полиэтиленовые; анатомические и хирургические пинцеты, анатомические ножи; скальпели брюшистые, острокопечные и глазные; ножницы прямые и Купера, хирургические зонды; микроскопы МБР и МБС-9(10), предметные и покровные, часовые стекла, чашки Петри (маркированные), стеклянные палочки и трубочки диаметром 2-3 мм; влагалищные зеркала и осветители к ним; красители (Романовского-Гимза), физиологический раствор, среда Дюльбекко, спирт метиловый (этиловый 96%-ный); шприцы и иглы, пипетки глазные, весы, измерительные линейки и ленты, штангенциркули, лупы, кюветы, тазы.

Методические указания.

Занятия проводят в акушерской (ветеринарной) клинике. Сначала преподаватель объясняет студентам функцию и демонстрирует на муляжах, рисунках и слайдах, диаграммах и гистопрепаратах топографию, внешние свойства и гистологическое строение половых органов коров, овец, свиней и кобыл. Затем студенты, разделившись на небольшие группы (по 3-4 человека), под контролем преподавателя осматривают подготовленные на отдельных столиках половые органы убитых самок и препарируют их в такой последовательности:

наружные половые органы;

влагалище;

матка (шейка, тело, рога), слои стенки матки;

яйцепроводы (истмическая и ампулярная часть, воронка);

яичники (форма, величина, наличие желтых тел и фолликулов), оболочки и слои яичника; из полостных крупных фолликулов извлекают фолликулярную жидкость и исследуют под микроскопом для обнаружения ооцита; при обнаружении в яичниках овуляции промывают яйцепровод и матку физиологическим раствором (средой Дюльбекко) и промывную жидкость также исследуют под микроскопом;

После изучения свежих препаратов половых органов (убитых животных) в манеж заводят поочередно небеременных корову, кобылу, свинью и овцу и осматривают сначала наружные половые органы, а затем с помощью влагалищного зеркала - влагалище и шейку матки (у свиньи осматривают только наружные поло-

вые органы). Готовят мазок-отпечаток с слизистой оболочки преддверия влагалища коровы, окрашивают и рассматривают под микроскопом.

Для контроля за освоением изучаемого материала в конце занятия (3-4 часа) преподаватель задает студентам несколько **вопросов**:

1. Какую функцию выполняют яичники, яйцепроводы, матка, влагалище, клитор, преддверие влагалища?
2. Какие имеются особенности в строении яичников коровы, свиньи, кобылы?
3. Какие половые гормоны выделяют яичники? Их биологическое действие на организм самки?
4. Как происходит созревание фолликулов в яичниках, какие изменения претерпевает половая клетка и на какой стадии развития находится она перед овуляцией?
5. Какие эпителиальные клетки различают в покровном эпителии влагалища и какова характерная картина вестибулярного мазка-отпечатка коровы в различные фазы полового цикла?
6. В каких участках половых путей эпителиальные клетки (или железы) продуцируют слизь?
6. К какому типу относят матку коровы и овец, свиньи, кобылы?
7. Где располагаются матка и яичники у коровы, кобылы, свиньи?
8. Каков мочеполовой клапан у intactных телок, свинок, кобылок?

Половые органы самок: наружные и внутренние. К **наружным** органам (*genitalia externa*) относят половые губы, преддверие влагалища и клитор; к **внутренним** (*genitalia interna*) - яичники, яйцепроводы, матку и влагалище. В зависимости от вида животных и физиологического состояния внутренние половые органы расположены в тазовой или брюшной полости (рис. 1). Удерживаются они с помощью *широких маточных связок* (*ligamenta lata uteri*). Связки представляют собой удвоение брюшины, идущее от поясничной области. В связках проходят сосуды и нервы.

Яичники, яйцепроводы и матка снабжаются кровью парных артерий: семенной внутренней и маточных средней и задней артерий. *Внутренняя семенная артерия* (*a. spermatica interna*) отходит от аорты в области 4-го поясничного позвонка, разделяется на *яичниковую ветвь* (*ramus ovaricus*) и *переднюю маточную* (*a. uterina cranialis*), сильно извилистую в области верхушки маточного рога. Артерия тесно прилегает к маточной вене и это обуславливает попадание ряда веществ (простагландины) из матки непосредственно в кровь артерии и затем в яичник. *Средняя маточная артерия* (*a. uterina media*) отходит - от *наружной тазовой* (*a. iliaca externa*) у кобыл и от *пупочной* (*a. umbilicalis*) у коров. Эта артерия хорошо развита и ее ветви образуют анастомозы между собой и с ветвями передней и задней маточных артерий. *Задняя маточная артерия* (*a. uterina caudalis*) отходит от *геморроидальной* (*a. haemorrhoidalis*) у кобыл и от *мочеполовой* (*a. urogenitalis*) у коров; снабжает кровью заднюю часть матки и влагалище. Преддверие влагалища и частично влагалище снабжаются кровью из *внутренней срамной* (*a. pudenda interna*) и *запирательной* (*a. obturatoria*) артерий. Отток крови из половых органов осуществляется по одноименным венам. У овец средние маточные вены отсутствуют, а кровь оттекает по передним пузырным и задним маточным венам.

Иннервируются половые органы симпатическими и парасимпатическими нервными стволами. У кобыл, коров, свиней и сук источником симпатических нервных стволов, идущих к половым органам, является *каудаль-*

ный *брыжеечный* узел. Он соединен с спинномозговыми нервами белыми соединительными ветвями и, следовательно, через спинной мозг поясничной области и через нервные сплетения брюшной полости проводящими путями с центральными отделами нервной системы. Парасимпатические нервные ветви отходят от крестцовых нервов.

Лимфатическая система гениталиев представлена: капиллярами, которые залегают во всех оболочках половых органов, интраорганными и афферентными экстра органными сосудами, крупно-петлистыми сосудистыми сплетениями, расположенными в маточных связках, крупными магистральными афферентными экстра органными сосудами, впадающими в региональные лимфатические узлы, а также эфферентными лимфатическими сосудами и протоками, которые соединяются и впадают в поясничный проток.

Половые органы коров и телок

Половые губы (*labium pudenda, vulva*) — представляют собой два валиковидных выпячивания, расположенных над седалищными буграми. Соединяясь, половые губы образуют верхний и нижний углы половой щели (*commissura labiorum superior et inferior*). Верхний угол закругленный, нижний - острый, имеет пучок длинных волос (рис. 2а, в). У нормальных животных пучок волос клиновидный, а у телок фримартинов - веерообразный. Наружная поверхность половых губ покрыта нежной пигментированной или непигментированной кожей, в которой находятся потовые и сальные железы; внутренняя поверхность покрыта плоским многослойным эпителием. В толще губ содержатся мышечные волокна *сжимателя вульвы* (*m. constrictor vulvae*) и соединительная ткань. В верхней части мышечные волокна переходят в промежность и сливаются со сфинктером ануса, внизу окружают клитор, а впереди переходят в стенку преддверия влагалища.

Клитор (*clitor*) - гомолог полового члена, расположен внизу преддверия влагалища (рис. 2в). Начинается в виде двух пещеристых тел на седалищных буграх. Вместе они образуют тело клитора, которое покрыто плотной оболочкой. Заканчивается клитор заостренной головкой в нижнем углу половой щели.

Между анусом и половой щелью находится *промежность* (*perineum*), представленная в основном рыхлой соединительной тканью. Она простирается вглубь между прямой кишкой и половым каналом и сходит на клин. От анального отверстия до верхнего угла половой щели кожа промежности образует небольшое валиковидное возвышение - шов промежности.

Преддверие влагалища (*vestibulum vaginae*) - представляет собой узкий участок вагинальной трубки длиной 4-8 см. В норме оно сжато с боков и на разрезе представляет вертикальную щель. От половой щели по направлению к влагалищу канал преддверия направлен снизу вверх и вперед. На границе с влагалищем открывается отверстие мочеиспускательного канала,

нижняя стенка которого имеет *слепой мешок* (diverticulum suburethrale) глубиной 2 см. По бокам от отверстия и кзади от него находятся выводные протоки *Бартолиниевых желез* (больших преддверных, gl. vestibulares major). У коров эти железы величиной с крупный боб.

В процессе препаровки половых органов ножницами и скальпелем отделяют конечную часть прямой кишки от влагалища и преддверия влагалища и полностью разрезают промежность. Затем прямыми ножницами разрезают верхнюю спайку половых губ и продолжают продольный разрез преддверия влагалища и влагалища. Находят выводные протоки Бартолиниевых желез и вставляют в них тонкий мандрен (спичку), а затем отделяют полностью со стороны наружной оболочки половых путей. Бартолиниевы железы содержат муциноподобный секрет, который выделяется в период течки.

Стенка преддверия влагалища состоит из слизистой, мышечной и соединительно-тканной оболочек. *Слизистая* оболочка толстая, образует продольные складки; покрыта многослойным плоским эпителием. В течение цикла эпителиальные клетки этой оболочки, как и клетки влагалища, подвергаются изменениям. В мазке-отпечатке с задней боковой стенки преддверия влагалища в фазу *про-эструс* обнаруживаются малые и большие промежуточные эпителиальные клетки, эритроциты, иногда лейкоциты. В фазу *эструс* преимущественно большие промежуточные эпителиальные клетки, безъядерные клетки или клетки вакуолизированные с небольшим пикнотическим ядром и эритроциты. Лейкоциты встречаются редко, только в начале эструса, а в конце этой стадии доминируют безъядерные эпителиальные клетки. В фазу *мет-эструс* в мазке обнаруживается много полиморфонуклеарных лейкоцитов, исчезают безъядерные клетки, уменьшается число больших промежуточных клеток, появляются парабазальные клетки и малые промежуточные эпителиальные клетки, которые в последующем становятся вакуолизированными. При анэструсе в мазке преобладают парабазальные и малые промежуточные эпителиальные клетки (рис. 3).

В период охоты и несколько дней спустя слизь образует рисунок в виде листка папоротника. В середине цикла в мазке в основном находятся малые эпителиальные клетки с крупным ядром, а также лейкоциты. На нижней стенке преддверия влагалища возле клитора в глубине слизистой оболочки расположены отверстия слабо развитых *малых преддверных* (gl. vestibulares minores) желез. *Мышечная* оболочка содержит гладкие волокна, но в заднем участке ее имеется значительное количество пучков поперечно-полосатых мышц. В боковой стенке преддверия, ближе к половой щели, расположено венозное сплетение (bulbus vestibuli), напоминающее пещеристое тело уретры самцов. *Наружная* оболочка преддверия состоит из рыхлой соединительной ткани, которая переходит в ткань промежности и прямой кишки.

Влагалище (vaginae, colpos) — дистальная часть внутренних половых органов, представляет собой широкую трубку длиной до 22 см; является ор-

ганом совокупления. Расположено влагалище в тазу. Начинается от шейки матки и сзади переходит в более узкое преддверие влагалища. В норме влагалище сжато сверху вниз и на разрезе представляет собой горизонтальную щель. Передняя часть влагалища снаружи покрыта *серозной* оболочкой. Простирается она по верхней стенке на 7-12 см и затем с влагалища переходит на прямую кишку. Внизу влагалище почти по всей длине прочно сращено с мочеиспускательным каналом. С боков между стенками влагалища и каналом таза находится соединительно-тканная адвентиция. *Мышечная* оболочка влагалища состоит из двух слоев гладких мышц: наружного слоя продольных волокон и внутреннего слоя, представленного поперечными волокнами. *Слизистая* оболочка покрыта плоским многослойным эпителием и не имеет желез. Она образует большое количество глубоких продольных и слабо выраженных поперечных складок. Возле шейки матки слизистая влагалища состоит из многослойных, вырабатывающих слизь клеток и тонких эпителиальных клеток. По направлению к преддверию влагалища число слизеобразующих клеток резко уменьшается. В этом участке слизистая оболочка утолщена, и ее поверхностный эпителий может ороговеть. У телок в месте перехода влагалища в преддверие влагалища отмечается сужение полового канала. Впереди отверстия мочеиспускательного канала находится перегородка - *мочеполовой клапан* (hymen). Перегородка имеет вид связки различной ширины и толщины (рис. 2в). У взрослых телок толщина перегородки варьирует от 1 до 2,5 мм, ширина - от 2 до 4-6 мм. В месте прикрепления перегородки к верхней и нижней стенкам влагалища ширина ее значительно увеличивается. Здесь она плавно переходит в продольные складки влагалища. Высота перегородки не превышает 8-10 мм. При препаровке половых органов интактных телок разрез верхней стенки в этом месте делают осторожно, чтобы не повредить целостность клапана и затем исследовать его.

Впереди влагалище ампуловидно расширяется и обхватывает со всех сторон влагалищную часть шейки матки. Здесь между шейкой матки и стенками влагалища образуются боковые, верхний и нижний карманы. Наиболее хорошо выражен верхний карман - *свод влагалища* (fornix vaginae). В стенке влагалища по бокам от отверстия мочеиспускательного канала в кра尼альном направлении у многих животных идут два слепо заканчивающихся канала - остатки Вольфовых протоков - *Гартнеровы ходы* (ductus Gartneri). Длина их составляет 4-7 см. Нередко трудно обнаружить выводные отверстия каналов или же обнаруживается отверстие только с одной стороны.

Матка (uterus, hystera, metra) служитместилищем для плода, обеспечивает рост и развитие его, а затем и выведение через родовые пути. У телок и небеременных молодых коров матка находится в тазовой полости, в ложбине лонного сращения. У много рожавших коров в расслабленном состоянии она смещается в брюшную полость. *Шейка матки* (cervix) длиной 5-10

см, толщиной 3-4,5 см расположена в тазу и лишь в середине беременности перемещается в брюшную полость. Она плотная, с толстыми стенками, четко ограничена и хорошо прощупывается рукой через прямую кишку. Задняя часть шейки матки на 2-3 см выдается во влагалище, образуя ясно выраженную влагалищную часть, в которой находится *наружное устье* (orificium externum). *Тело матки* (corpus uteri) сравнительно мягкое, длиной 2-5 см, впереди разделяется на два *рога* (cornua uteri). На протяжении 10-15 см рога сращены между собой (рис. 2а, б). В этом месте между ними снаружи хорошо заметна межроговая борозда (*желоб*). После раздвоения (*бифуркации*) рога расходятся в стороны, затем загибаются вниз и назад, а конечная часть их приподнимается вверх к яичникам и переходит в яйцепроводы. В месте расхождения рога имеют диаметр 2-3,5 см, но по направлению к верхушке сильно истончаются. В среднем длина рогов небеременных телок составляет 28 см, ширина 2,4 см, а у взрослых коров соответственно 32,5 и 3,4 см. Толщина стенок тела и рогов матки у коров 8-12 мм.

Стенка матки состоит из трех оболочек: серозной, мышечной и слизистой. *Серозная оболочка* (perimetrium) покрывает матку снаружи. С боков тела и шейки и по малой кривизне рогов матки серозная оболочка переходит в широкие маточные связки (ligamenta lata uteri), на которых она и подвешена. *Мышечная оболочка* (myometrium) состоит из трех слоев гладких мышц. Слой наружных продольных волокон отделен сосудистым слоем от двух других слоев циркулярных и продольных волокон. В области шейки матки мышечные слои толще, особенно циркулярный слой. *Слизистая оболочка* матки (endometrium) имеет трубчатые железы, которых насчитывается около 1 млн., изнутри покрыта псевдомногорядным призматическим мерцательным эпителием. В области тела и рогов матки в эндометрии имеются особые образования - *карункулы* (carunculae uteri). В каждом роге 4 ряда карункулов, по 10-14 в ряду, всего 80-112.

Слизистая оболочка шейки матки образует многочисленные мелкие продольные и толстые поперечные складки или кольца. Противоположные складки заходят одна за другую, образуя извилистый *цервикальный канал* (canalis cervicis), который открывается *внутренним отверстием* (orificium internum) в тело матки. В области влагалищной части шейки мощно развитые поперечные складки слизистой оболочки (верхняя и нижняя) образуют отчетливо выраженную розетку. Поверхностный эпителий слизистой оболочки шейки матки имеет многочисленные слизеобразующие (бокаловидные) клетки. Они постоянно выделяют слизь, закупоривающую цервикальный канал.

Яйцепроводы (oviductus, tuba uterina, salpinx) - две извитые трубочки, служат местом оплодотворения яйцеклеток и обеспечивают проведение их в рога матки. Располагаются яйцепроводы в складках брюшины (mesosalpinx), простирающихся от верхушки рогов матки до яичника. Канал яйцепровода начинается от верхушки соответствующего рога матки узким маточным от-

верстием. В зависимости от возраста животных длина яйцепроводов колеблется от 20 до 35 см. Наименьший диаметр (1-3 мм) яйцепроводы имеют в области *перешейка* (istmus), который примыкает к рогу матки и составляет около половины всей длины. Средняя часть - *ампула*, имеет диаметр 3-5 мм, а конечная часть - *воронка* - 5-7 мм. Воронка открывается отверстием в брюшную полость. Свободный длинный край воронки называют *бахромкой* (fimbriae tubae). Бахромка тесно прилегает к поверхности яичника и это обеспечивает попадание овулировавших яиц в отверстие яйцепровода. Стенка яйцепровода состоит из трех оболочек: серозной, мышечной и слизистой. *Серозная оболочка* представлена в основном эпителиальным слоем брюшины и частично двумя слоями широкой маточной связки. *Мышечная оболочка* состоит из трех слоев гладких мышц: мощного внутреннего кольцевого и двух более тонких продольных поверхностных слоев. Наиболее толстая мышечная оболочка в месте соединения яйцепровода с маткой. *Слизистая оболочка* покрыта псевдомногорядным мерцательным эпителием, который в узкой части яйцепровода образует 4-8 низких продольных складок, а в воронке - до 20-40 более высоких складок. Движение ресничек эпителия направлено в сторону матки.

Яичники (ovaria, oophoron) - половые железы, вырабатывают яйцеклетки и половые гормоны. Расположены на границе тазовой и брюшной полости. У небеременных коров они чаще находятся у края подвздошной ямки на границе с лонным сращением, реже между подвздошной ямкой и концом маточного рога. К верхушкам рогов матки яичники прикреплены с помощью яичниковой связки, которая является частью широкой маточной связки. Яичниковая связка образует две складки: *яйцепроводную* (mesosalpinx), в которую заключен яйцепровод, и *яичниковую* (lig. ovarii proprium), более толстую и содержащую пучки гладких мышечных волокон; последняя соединяет яичник с боковой поверхностью рога матки. Складки, соединяясь, образуют открытый *яичниковый карман*. В нем располагается яичник.

Типичная форма яичников яйцевидная или округлая, но иногда они могут быть плоскими или иметь неправильную форму, что зависит от наличия в них фолликулов или желтых тел (рис. 4б). Длина яичника - 32-42 мм, ширина - 19-32 мм и толщина - 13-19 мм. Масса каждого яичника составляет 10-19 г. Вся поверхность яичника, за исключением прикрепленного края, покрыта однослойным кубическим эпителием. Под ним располагается *собственная белочная оболочка*. Она придает яичнику соответствующую форму. Вся остальная масса яичника состоит из двух слоев: периферического коркового и центрального мозгового. На разрезе они не четко разделены между собой. *Мозговой* слой содержит кровеносные сосуды, нервы и рыхлую соединительную ткань. *Корковый* (паренхиматозный) слой занимает большую часть яичника и состоит из клеток соединительной ткани, желтых тел и фолликулов на различных стадиях развития.

Половые органы овцы

Половой аппарат овцы аналогичен половому аппарату коров и отличается лишь размерами (рис. 5). Длина *преддверия влагалища* составляет 4-5 см, *влагалища* - 8-12 см, *шейки матки* - 5-7 см, *тела* - 3-5 см, *рогов матки* - 10-20 см, *яйцепроводов* - 10-15 см. *Яичники* имеют овальную или яйцевидную форму, относительно крупные (в период ди-эструса 1,3·1,1·0,8 см) массой от 0,6 до 3 г.

Половые органы свиньи

Половые губы выделяются в виде треугольника, нижний угол которого образован их заостренной спайкой. *Клиитор* тонкий, длинный, оканчивается продолговатой головкой. *Преддверие влагалища* длиной 5-8 см, имеет хорошо выраженные продольные складки слизистой оболочки. В толще ее рядами заложены малые вестибулярные железы. В нижней части боковых стенок преддверия имеются пещеристые образования. Преддверие влагалища и влагалище имеют длину 15-23 см, при соотношении их 2:1 (рис. 6б). *Влагалище* узкое, длиной 10-15 см. На границе с преддверием у интактных свинок заметно сужение полового канала, а впереди отверстия мочеиспускательного канала обнаруживается такая же перегородка, как и у телок.

Матка двурогая двураздельная. *Шейка матки* длиной 10-15 см без резких границ переходит сзади во влагалище, а впереди в короткое (2-3 см) *тело матки*. *Рога матки* в правой половине брюшной полости расходятся на обе стороны от тела матки и образуют большое число петель, которые у молодых свинок располагаются недалеко от тазовой полости, а у рожавших - глубоко в брюшной полости. Длина их составляет соответственно 50-75 см и 90-200 см. Левый рог на 3- 8 см длиннее правого. Задние участки рогов срастаются своими стенками на протяжении 4-6 см. Диаметр рогов достигает 6 см, толщина стенок 2-4 мм. Слизистая оболочка матки темно-красного цвета, сильно складчатая. В области шейки складки в виде многочисленных (15-20) треугольных выступов расположены с боков. Верхушки их не совпадают, в результате чего канал шейки матки образует кривую штопорообразную линию. По направлению к телу матки и, особенно, влагалищу складки сглаживаются.

Яйцепроводы у свиньи выделяются отчетливо; длина их 15-28 см. Истмическая часть узкая, диаметром до 2-3 мм, составляет четвертую часть длины яйцепровода, средняя часть - ампула, толщиной 3-5 мм и воронка 5-6 мм. Конечная часть воронки очень расширена.

Яичники у половозрелых животных похожи на ягоду малины, имеют неправильную форму и размеры 4х3х3 см. У взрослых свиноматок яичники округлой формы, диаметром около 5 см. Поверхность их бугристая, что связано с наличием большого количества крупных фолликулов и желтых тел. Расположены в брюшной полости на уровне 4-5-го поясничного позвонка в хорошо выраженных яичниковых карманах и тесно прилегают к мощно развитой бахромке яйцепровода.

Половые органы кобылы

Половые губы вверху образуют заостренный край, переходящий в шов промежности; нижний край их закругленный, прикрывает головку клитора полушаровидной формы. По бокам головки имеются хорошо выраженные складки слизистой оболочки преддверия влагалища (рис. 6а).

Преддверие влагалища длиной 8-16 см. По бокам его под слизистой оболочкой и отчасти под сжимателем вульвы имеются два пещеристых тела. В верхней части преддверия на 1,5-2,5 см впереди половой щели расположены выводные протоки Бартолиниевых желез, а по бокам его в толще слизистой оболочки расположены два ряда трубчатых желез, открывающихся в просвет преддверия несколькими выводными протоками. **Влагалище** длиной 15-30 см. У молодых кобылок в задней части по всей окружности влагалища имеется хорошо выраженная поперечная складка (мочеполовой клапан) толщиной 2-3 мм с центральным отверстием.

Матка кобылы типично двурогая. **Шейка матки** длиной 4-8 см, диаметром 3-5 см, сзади выдается в полость влагалища. Эта часть ее имеет форму втулки; в центре ее расположено устье шейки матки. **Тело матки** представляет собой большой полый орган длиной 8-15 см и шириной 7-12 см. Впереди разделяется на два *рога*, длина их 8-15 см и ширина 4-7 см. Рога расходятся в стороны, несколько вперед и вверх. Слизистая оболочка тела и рогов матки образует много продольных складок, сверху покрыта высоким цилиндрическим мерцательным эпителием; в толще ее расположены ветвящиеся трубчатые железы. В области шейки матки слизистая оболочка формирует большое количество продольных складок различной высоты.

Яйцепроводы имеют вид сильно извитых трубочек, длиной 15-30 см. Расширенный брюшной конец яйцепровода (воронка) имеет неровные края, тесно прилегает к яичнику в области *овуляционной ямки*. Широкий край ее - *бахромка* полностью прикрывает овуляционную ямку.

Яичники чаще бобовидной, иногда округлой или неправильной овальной формы, подвижные, находятся в поясничной части брюшной полости вблизи верхушек рогов матки, несколько выше их. Правый яичник расположен на уровне третьего поясничного позвонка, на ладонь ниже от почек и в сторону тазовой полости, а левый - на уровне четвертого поясничного позвонка. Величина яичников различная в течение года: поздней осенью и зимой они небольшие (длиной 6 см, толщиной 4 см и шириной 3 см), а в весенний период увеличиваются, что в основном зависит от наличия развивающихся фолликулов, диаметр которых достигает 4-7 см. Снаружи яичники покрыты *серозной* оболочкой. Под ней расположена плотная фиброзного типа *белочная* оболочка, покрывающая почти весь яичник, за исключением *овуляционной ямки* (ovulation fossa), свободной от серозной оболочки и выстланной зародышевым эпителием. Расположена овуляционная ямка по малой кривизне над *корковым слоем* и имеет бархатистый вид. *Моз-*

говой слой яичника расположен по большой кривизне. В этом месте прикрепляется яичниковая связка и здесь начинается серозный покров яичника.

Извлечение ооцитов из яйцепроводов и яичников

Для изучения ооцитов можно использовать яичники всех видов животных. В корковом слое яичников имеется большое количество *первичных* (primordial) фолликулов. Каждый фолликул состоит из оогония и слоя фолликулярных клеток. В процессе роста фолликул глубже погружается в корковый слой. Оогоний увеличивается в несколько раз и превращается в первичный ооцит. Вокруг него образуется прозрачная оболочка. В это же время происходит рост и увеличение количества плоских эпителиальных (фолликулярных) клеток вокруг ооцита. Количество слоев увеличивается до двух, а затем до трех и более.

После окончания роста ооцита фолликулярные клетки в нескольких местах расходятся и в образовавшихся полостях накапливается жидкость. Постепенно полости объединяются в одну большую полость. Яйцо оттесняется к стенке фолликула. Оно располагается в скоплении эпителиальных клеток, в *яйцевом* бугорке (cumulus oophorus, рис. 4а). Те клетки, которые непосредственно окружают яйцо, образуют кольцо - *лучистый венец* (corona radiata). Ободок клеток, выстилающих полость фолликула, называют *гранулезой*. Содержащаяся в полости *фолликулярная* жидкость вязкая, богата эстрогенами. Она способствует увеличению и растяжению фолликула и выходу его из коркового слоя на поверхность яичника.

Гранулезные клетки окружены мембраной. Вокруг нее расположены два слоя клеток, которые образуют оболочку фолликула. Внутренний слой (*theca interna*) окружает фолликул с момента роста ооцита до овуляции. Клетки внутреннего слоя играют большую роль в продуцировании половых гормонов и в образовании желтого тела. Их ядра округлые, в отличие от удлиненных, расположенных концентрическими слоями вокруг фолликула, ядер клеток наружной оболочки (*theca externa*). Состоит наружная оболочка преимущественно из соединительной ткани и гладких мышечных волокон, обильно снабжена кровеносными сосудами.

Если при анатомическом исследовании в яичниках обнаруживаются крупные полостные фолликулы, то можно извлечь ооциты из них. Если установлено, что овуляция уже произошла, то следует попытаться извлечь яйцеклетки из яйцепроводов и матки. В зависимости от предполагаемых сроков овуляции промывают различные участки половых путей. У овец в первые трое суток промыванию подвергают яйцепроводы, а иногда и конечную часть рогов матки; на 5-7-й день делают смывы из большей части рогов матки, а после 9-го дня - промывают всю матку. У коров в первые 3-4 дня промывают яйцепроводы, а в последующем - яйцепроводы и матку. У свиней яйцепроводы промывают в течение первых 2-х дней после овуляции.

Для извлечения зародышей из яйцепроводов в воронку его вводят стеклянную трубочку (внутренний диаметр 2 мм) на глубину 3-5 см и свободный конец ее помещают в маркированную чашку Петри. Физиологический раствор (среду Дюльбекко) 2-3 мл вводят при помощи шприца с иглой в яйцепровод в месте соединения с маточным рогом и всю жидкость собирают. Если извлекают зародыши из рога матки (овца, корова), тогда тупой иглой прокалывают стенку на расстоянии 4-6 см от соединения его с яйцепроводом и через прокол вставляют стеклянную трубочку (канюлю) в рог матки, а свободный конец ее помещают в емкость (чашку Петри) для зародышей. В просвет матки в месте соединения с яйцепроводом шприцем с иглой вводят несколько мл раствора. Чтобы раствор не терялся, рог матки за канюлей пережимают хирургическим пинцетом. Если зародыши (овца) извлекают на 5-7 день от начала охоты, то используют 5-10 мл раствора и делают смывы из большей части рогов матки. А для получения бластоцист через 9 дней после начала охоты промывают всю матку. При этом шейку матки пережимают зажимом, раствор вводят в верхушку одного рога матки, а собирают его через канюлю, вставленную в противоположный яйцепровод.

Собранный после промывания раствор исследуют под микроскопом МБС-9 или МБС-10.

Для получения ооцитов из зрелых фолликулов их осторожно вскрывают глазным скальпелем. Фолликулярную жидкость собирают в чашку Петри. Ооцит находится в прозрачной студенистой массе. Капельку этой массы наматывают на кончик глазного скальпеля и помещают на предметное (часовое) стекло, на которое предварительно наносят капельку физиологического раствора, и исследуют под микроскопом.

При наличии в яичниках незрелых крупных полостных фолликулов их также вскрывают и после удаления фолликулярной жидкости выскабливают стенку небольшой ложечкой Фолькмана. Собранный вязкую массу смывают тщательно несколькими капельками физиологического раствора на предметное (часовое) стекло и микроскопируют.

Исследование наружных половых органов и влагалища

Для клинического исследования коровы и кобылы их помещают в станок или надежно фиксируют. Корову коротко привязывают (в стойле, манеже, загоне) и дополнительно фиксируют одной рукой за складку кожи в области коленного сустава, а другой - за складку кожи на спине. Беспокойных животных фиксируют за рога и носовую перегородку. Кобылу удобнее исследовать в хорошо освещенном манеже; тазовые конечности ее фиксируют случной шлеей. Козу или овцу удерживают за поводок; свинью осматривают без фиксации в узком станке. Мелких животных помещают на стол и при необходимости фиксируют.

Сначала осматривают наружные половые органы и промежность, а также корень хвоста и седалищные бугры. Затем левой рукой, обращенной ладонью к животному и повернутой пальцами вниз, приоткрывают половую щель. Обращают внимание на величину вульвы и клитора, пучок волос в нижней спайке половых губ, цвет и состояние слизистой оболочки преддверия влагалища, целостность кожи и шерсти на крестце и седалищных буграх; определяют наличие и внешние свойства слизи или воспалительного экссудата.

У здоровых животных в зависимости от физиологического состояния и фазы полового цикла отсутствуют повреждения вульвы и промежности, слизистая оболочка бледно-розового или желтоватого цвета, покрыта небольшим слоем слизи. В период течки половые губы отечные, увеличены, кожа гладкая, складки расправлены, слизистая оболочка ярко красного цвета, блестящая, обильно покрыта прозрачным секретом. Слизь можно обнаружить и на ягодицах, седалищных буграх. Волос на крестце и седалищных буграх вследствие садок других животных может быть стертым, а эти места болезненны.

При осмотре могут выявляться аномалии наружных половых органов (недоразвитая вульва, увеличенный клитор, наличие повреждений и рубцов), признаки воспаления, полосчатые или точечные кровоизлияния на слизистой оболочке, а также узелки красноватого или желтоватого цвета или пузырьки прозрачные или мутноватые, различного характера воспалительный экссудат.

Влагалище исследуют рукой или путем осмотра с помощью влагалищных зеркал (расширителей) (рис. 7). Перед исследованием наружные половые органы самки тщательно обмывают теплой водой (при сильном загрязнении с мылом) и дезинфицируют раствором фурацилина. На руку с коротко остриженными ногтями надевают мягкую полиэтиленовую перчатку и смачивают ее физиологическим раствором. Перед введением влагалищное зеркало увлажняют теплым физиологическим раствором или раствором натрия гидрокарбоната и к нему прикрепляют специальный осветитель. При использовании трубчатого стеклянного расширителя пользуются внутренним источником освещения или налобной лампой. Однако более эффективно вагинальное исследование при хорошем дневном освещении. Вводят зеркало в половые пути плавно и осторожно, при этом бранши его должны быть сомкнуты, а ручки направлены в сторону. После введения зеркала его поворачивают так, чтобы ручки были направлены вниз. Затем нажимают медленно на ручки и раздвигают бранши, добиваясь нужного расширения полового канала. Для осмотра должны быть доступны полость влагалища и шейка матки.

ПОЛОВЫЕ ОРГАНЫ САМЦОВ И ИХ ФУНКЦИЯ

Цель занятий: приобретение студентами знаний топографии, анатомических особенностей и функции органов размножения самцов сельскохозяйственных животных.

Объекты исследований, материалы и оборудование: животные - бык, баран, жеребец, хряк; половые органы убитых самцов; муляжи, рисунки, диаграммы, слайды, гистопрепараты; перчатки резиновые и полиэтиленовые одноразовые, анатомические и хирургические пинцеты, анатомические ножи, скальпели, ножницы прямые и Купера; микроскопы, предметные и покровные стекла, стеклянные палочки; шприцы и иглы, измерительные линейки и ленты, весы, штангенциркули, лупы, кюветы, тазы.

Методические указания.

Занятия проводят в акушерской (ветеринарной) клинике. Сначала преподаватель демонстрирует студентам на муляжах, рисунках и слайдах, диаграммах, гистопрепаратах топографию, внешние свойства и гистологическое строение половых органов быков, хряков и других животных, объясняет их функцию. Затем студенты, разделившись на небольшие группы (по 3-4 человека), под контролем преподавателя осматривают подготовленные на отдельных столиках половые органы убитых самцов и препарируют их в такой последовательности:

мошонка: форма, величина, оболочки;

семенники и придатки семенников: форма, величина (длина, толщина и ширина) и масса, консистенция, строение на разрезе, связь придатка с семенником; содержимое канала придатка рассматривают под микроскопом;

семенные канатики: место прикрепления к семеннику, составные части (спермиопроводы и их конечная часть - ампулы, кровеносные сосуды и нервы, внутренний подниматель семенника);

тазовая часть мочеполового канала и придаточные половые железы - пузырьковидные, предстательная (тело и рассеянная часть) и куперовы - расположение относительно тазовой части уретры, величина и форма, выводные протоки;

половой член и пенисовая часть мочеполового канала;

препуций (препуциальный мешок).

После изучения по наглядным пособиям и свежим препаратам половых органов убитых животных в манеж заводят быка (при содержании в клинике - используют самцов и других видов животных), осматривают и пальпируют его половые органы: семенниковый мешок с семенниками, тело и S-образный изгиб пениса, головку пениса и препуций. У быков определяют внешние промеры семенникового мешка.

В конце занятия (3-4 часа) преподаватель задает студентам несколько **вопросов:**

1. *Какую функцию выполняют семенники и придатки семенников, мошонка и наружный подниматель семенника, спермиопровод, пенис и уретра, придаточные половые железы?*

2. *Каковы особенности расположения семенников и мошонки у быка, жеребца, хряка?*

3. *Какие клетки имеются в стенке семенных канальцев и между канальцами?*

4. *Какие клетки семенника продуцируют половые гормоны, биологически активные вещества? Какова роль тестостерона, андроген связывающего протеина, ингибина, ГнРГ в регуляции сперматогенеза и функции самцов?*

5. *Какие факторы влияют на сперматогенез у самцов сельскохозяйственных животных?*

Половые органы самцов состоят из двух половых желез - *семенников с придатками и спермиопроводов; мошонки*, в которой находятся семенники; *полового члена с наружным половым протоком - мочеполовым каналом (уретрой)*; придаточных половых желез: *пузырьковидных, предстательной и куперовых (луковичных)*.

Мошонка (scrotum) представляет собой мешок, состоящий из двух полостей; расположена в паховой области между бедрами позади рудиментарных сосков. Снаружи мошонка разделена в медианной плоскости вертикальной бороздой (raphe scroti) на две половины. У быков, баранов и козлов она несколько сплюснута спереди назад и имеет отчетливо выраженную *шейку*. У жеребцов мошонка занимает почти горизонтальное положение, а шейка выражена слабо. У хряков мошонка находится позади бедер, имеет косое направление, шейка отсутствует. В каждой полости мошонки располагается семенник, к которому основанием прикреплен семенной канатик.

В процессе препаровки мошонку разрезают вдоль каждого семенника с краниальной стороны, чтобы не повредить придатки семенника. Стенка

мошонки состоит из трех слоев: кожи, мускульно-эластической оболочки и общей влагалищной оболочки (рис. 8). *Кожа* (cutis scroti) покрыта нежными волосами и содержит потовые и сальные железы. Она тесно связана с *мускульно-эластической оболочкой* (tunica dartos). Эта оболочка, заворачиваясь внутрь, делит семенниковый мешок на две половины, а в верхней части разделяется на два листка, между которыми располагается половой член. На дне мошонки мускульно-эластическая оболочка рыхло соединяется с *общей влагалищной оболочкой* (tunica vaginalis communis), и их можно легко разъединить. Общая влагалищная оболочка является продолжением париетального листка и поперечной брюшной фасции. Сначала она образует узкие *паховые каналы*, затем расширяется и выстилает обе полости мошонки (cavum vaginale). Она выделяет смазывающую жидкость. К внешней стенке оболочки с задней и наружной стороны прикрепляется *наружный подниматель семенника* (m. cremaster externus). Этот поперечно-полосатый мускул берет начало от внутреннего отверстия пахового канала; он подтягивает семенники.

Мошонка с ее мышцами поддерживает семенники, защищает их от внешних воздействий и обеспечивает постоянную температуру, обычно ниже (на 4-5°C) температуры тела, что важно для сперматогенеза. Относительно постоянная температура семенников у самцов поддерживается благодаря сокращению или расслаблению наружного поднимателя семенника.

Мошонка снабжается кровью наружной семенной артерией (a. spermaticae externa). Иннервация осуществляется наружным семенным нервом (n. spermaticus externus), а также ветвями подвздошно-подчревного и подвздошно-пахового нервов (n. iliohypogastricus, n. ilioinguinalis).

Семенники (testis, orhis, didymis) вырабатывают мужские половые клетки и половые гормоны (тестостерон). Каждый семенник представляет собой овальное, вытянутое тело, подвешен в мошонке на семенном канатике. У жвачных продольная ось семенника расположена вертикально, хвост придатка обращен книзу назад. У жеребца семенники расположены почти горизонтально, хвост придатка находится вверху сзади. У хряка расположение семенников косое, вблизи анального отверстия, хвост придатка находится спереди, вверху (рис. 9).

У быка длина семенника варьирует от 10 до 13 см, ширина - 5-6,5 см, масса - 300-400 г; такой же величины семенники у хряка, а у барана и жеребца они меньше - соответственно - 9-11 x 6 см, масса - 200-300 г и 10-12 x 5-6 см, масса - 200-250 г.

Семенник и придаток семенника покрыты *собственно влагалищной оболочкой* (tunica vaginalis propria), являющейся висцеральным листком брюшины. Она тесно сращена с *белочной оболочкой* (tunica albuginea testis). Белочная оболочка заходит внутрь семенника со стороны головки придатка и образует средостение. От средостения отходят соединительно-тканые перегородки, которые делят семенник на дольки. Перегородки соединяются с поверхностной частью белочной оболочки (рис. 10).

К семеннику в составе *семенного канатика* (funiculus spermaticus) подходят кровеносные сосуды и нервы. Иннервация осуществляется *внутренним семенным* нервом (n. spermaticus internaе), отходящим от заднего брыжеечного узла. Кровоснабжение обеспечивается *внутренней семенной артерией* (a. spermaticae internaе). Этот сосуд в месте соприкосновения с верхним краем семенника немного расширяется, идет дальше по заднему краю и разветвляется под оболочками, образуя систему извилистых артерий, хорошо просматриваемых снаружи. Концевые артерии разветвляются, входят в семенник вдоль средостения и питают ткань семенника.

Паренхима семенника представляет собой мягкую массу желтоватого цвета у быка, беловатого - у козла и барана, темно-бурого - у жеребца и серовато-коричневого или коричневого у хряка и кобеля. Состоит из многочисленных долек (300-400). В каждой дольке имеется один или несколько *семенных канальцев* (seminiferous tubule). Промежутки между канальцами заполнены соединительной тканью, в которой имеются клетки Лейдига, продуцирующие андрогены, а также кровеносные сосуды и нервы.

Образование сперматозоидов происходит в семенных (извитых) канальцах. Диаметр канальцев 100-200 мкм, длина - свыше 1 м. Общая протяженность их у быка достигает 5 км, у хряка - 4-6 км, у кобеля - до 1,2 км. Снаружи канальцы покрыты тонкой мембраной. На ней располагаются эпителиальные клетки двух типов: опорные клетки Сертоли и первичные зародышевые клетки (рис. 11). *Клетки Сертоли* расположены радиально на равных расстояниях друг от друга. Ядра их находятся у основания клеток, а цитоплазма тянется до просвета канальцев. Промежутки между клетками заполнены зародышевыми клетками различной степени дифференциации: *сперматогониями, сперматоцитами и сперматидами*. Клетка Сертоли играют важную роль в питании сформированных, но еще незрелых спермиев. Семенные канальцы направляются к средостению семенника и впадают в *прямые канальцы*, а последние образуют *сеть семенника* (rete testis).

Придаток семенника (appendix testis, epididymis) представляет собой трубку различной ширины, идущую по всей длине семенника. Состоит из головки, тела и хвоста (рис. 10). *Головка придатка* образована *семявыносящими канальцами* (efferent ducts) и начальной частью канала *придатка* (canalis epididymidis). Всего семявыносящих канальцев 12-15 (возможно от 6 до 20); длина их 10-20 см. Отходят они от *сети семенника* в месте связи семенника с придатком и сильно извиваясь образуют сосудистый конус. Последний составляет значительную часть придатка и соединен с длинным каналом придатка. В области *головки* (head epididymidis) канал придатка зигзагообразно извивается. Извилины окружены белочной оболочкой и вместе с ней придают головке придатка вид большой плоской трубки. В области *тела придатка* (body epididymidis) амплитуда извилин канала уменьшается, суживается оболочка и это придает телу вид более узкой и прямой трубки. По направлению к нижней части семенника канал расширяется, размах его

извилин увеличивается и вместе с окружающей оболочкой он образует массивный *хвост* (tail epididymidis). Хвост придатка связан с семенником и фиксирован в нижней части мошонки направляющей связкой семенника.

Просвет канала придатка достигает 0,3-1 мм, при этом диаметр его увеличивается от головки к хвосту. Длина канала составляет у быка около 35 м, у хряка - 64 м и у жеребца - 80 м. Образовавшиеся в семеннике спермии продвигаются по каналу придатка, созревают, покрываются липидной оболочкой и накапливаются в нем.

Спермиопровод (ductus deferens) без ясной границы отходит от придатка и тянется вдоль семенника вверх. Вначале он извилист, затем становится более прямым. В составе семенного канатика проходит через паховый канал, а при попадании в брюшную полость отделяется от артерий, вен и нервов и направляется в тазовую полость, где располагается с соответствующей стороны над шейкой мочевого пузыря. В этом месте он ампулообразно расширяется (*ампула спермиопровода*). Вместе с пузырьковидной железой ампула спермиопровода открывается общим протоком на семенном холмике, расположенном вверху начальной части мочеполового канала.

Ампулы спермиопроводов тесно связаны между собой складкой брюшины. У хряка и кобеля ампулы отсутствуют. Спермиопровод снаружи покрыт брюшиной, а в толще своей имеет продольный и кольцевой слой мышц; изнутри он выстлан многослойным цилиндрическим мерцательным эпителием с наличием клеток, обладающих секреторной функцией. В слизистой оболочке конечной части ампул спермиопроводов у жеребца, быка, барана и кобеля имеются трубчатые железы. Они выделяют фруктозу, лимонную кислоту и пигмент липохром, который придает сперме некоторых быков светло-желтый цвет. В ампулах спермиопроводов спермии скапливаются перед эякуляцией. У быков ампулы хорошо пальпируются при ректальном исследовании. Длина их достигает 10-15 см, толщина около 10 мм (с мизинец).

Семенной канатик (funiculus spermaticus) представляет собой сдавленный с боков конус, основание которого прикреплено к семеннику и придатку семенника, а вершина доходит до внутреннего пахового кольца. Снаружи покрыт серозной оболочкой, в которую заключены спермиопровод, внутренняя семенная артерия и одноименные вена и нерв, лимфатические сосуды и слабо развитый внутренний подниматель семенника.

Мочеполовой канал (urethra) является общим протоком для секретов семенников и придаточных половых желез и для выделения мочи. Начинается от шейки мочевого пузыря, тянется вдоль тазовой полости (*тазовая часть*) и в области большой седалищной вырезки поворачивается вниз вперед и по желобу направляется к головке полового члена, где и заканчивается мочеполовым отверстием (*пенисовая часть*). Изнутри выстлана уретра в начальной части переходным эпителием, а в конечном участке - плоским многослойным эпителием. В толще эпителия имеется много мелких урет-

ральных желез. Средний слой уретры - сосудистый, представлен густым сплетением сильно извитых вен и соединительной тканью с гладкими и эластическими волокнами, которые формируют пещеристое тело мочеполювого канала. Располагается оно, главным образом, снизу. Вены в нем расширены, образуют каверны и при наполнении их кровью обеспечивается зияние канала. Снаружи уретра прикрыта мочеполювым (*m. urogenitalis*) и луковично-пещеристым (*m. bulbocavernosus*) мускулами, сокращения которых способствуют выведению спермы и мочи.

Придаточные половые железы - пузырьковидные, предстательная и куперовы - расположены по ходу тазовой части мочеполювого канала. Секрет этих желез составляет жидкую часть спермы.

Пузырьковидные железы (*glandulae vesiculares*) у быка (рис. 12) имеют грушевидную форму и бугристую поверхность, расположены по одной с обеих сторон возле ампул спермиопроводов и открываются общими с спермиопроводами отверстиями в начальную часть мочеполювого канала. Длина желез составляет 10 см или более, толщина - 2,5 см. Они разделены на дольки; выделяют секрет, содержащий фруктозу и лимонную кислоту. Эти железы легко пальпируются при ректальном исследовании половозрелых животных. У мелкого рогатого скота пузырьковидные железы также имеют бугристую поверхность. У барана длина их 5 см, ширина - 2,5 см и толщина - 1,3 см. Величина желез у козла несколько меньше. У жеребца пузырьковидные железы мешковидные, с ровной поверхностью и центральной полостью, в длину достигают 13-15 см. Самые крупные пузырьковидные железы у хряка: длина до 12 см, ширина - 7 см и толщина - 3 см; поверхность их гладкая (рис. 12). У кобеля этих желез нет.

Предстательная железа (*gl. prostata*) состоит из тела и рассеянной части. Расположена в месте соединения шейки мочевого пузыря с мочеполювым каналом. У быка тело железы состоит из двух слитых воедино частей, имеет вид узкой полоски длиной 4 см, лежащей поперек уретры (рис. 12). Рассеянная часть железы окружает мочеполювой канал сверху и снизу и открывается в него несколькими отверстиями. Эта часть железы прикрыта мочеполювым мускулом и труднее обнаруживается. У барана и козла имеется только рассеянная часть. У жеребца и кобеля тело предстательной железы наиболее хорошо развито, а рассеянная часть выражена слабо или совсем отсутствует. У хряка тело железы крупное, имеет бугристую поверхность; рассеянная часть хорошо выражена. Выделяет предстательная железа жидкий секрет, который богат минеральными веществами и антаглютинином.

Куперовы железы (*gl. bulbourethralis*) расположены по одной с каждой стороны мочеполювого канала. У быков они находятся на расстоянии 10-12 см сзади от предстательной железы и частично прикрыты луковично-пещеристым мускулом. Снаружи они окружены толстым слоем волокнистой ткани и имеют вид небольших эллипсоидных тел беловатого цвета; длина их составляет 2,3 см, толщина 1 см. Протоки открываются одним отверстием в

мочеполовой канал. Вырабатывают вязкое слизеподобное вещество. У барана и козла куперовы железы в 2-2,5 раза меньше, у кобеля они отсутствуют. У хряка железы сильно развиты, имеют вид толстых (2-3 см) продолговатых (до 15 см) пластинок шириной 3-4 см. У жеребца они величиной с грецкий орех.

Половой член (penis) - орган совокупления. Имеет прикрепленную часть - *корень*, основную часть - *тело* и свободный конец - *головку*. Основу полового члена составляет пещеристое тело. Оно берет начало от седалищных бугров двумя ножками, которые вскоре сходятся и образуют тело пениса. Пещеристое тело представляет собой трубчатую систему несимметричных кровеносных сосудов, которые при половом возбуждении наполняются кровью при высоком давлении. Этому способствует задержка оттока крови по глубоко расположенным венам вследствие сдавливания их набухающей эректильной тканью. Питание половой член получает от внутренней срамной (a. pudenda interna) и наружной семенной (a. spermatica externa) артерий.

Снизу пещеристое тело имеет углубление (*желобок*). В нем располагается мочеполовой канал. Снаружи половой член покрыт соединительно-тканной (белочной) оболочкой.

У быка пенис цилиндрической формы длиной около 90 см и 2,5-3 см в диаметре. По направлению к свободному концу он несколько суживается. Пещеристая ткань слабо развита, за исключением корня. В расслабленном состоянии пенис образует S-образный изгиб, который расположен непосредственно сзади мошонки (рис. 9). Выпрямляющий мускул вытягивает пенис вперед, сжимает вены полового члена, тем самым способствует эрекции. За счет выпрямления изгиба длина полового члена увеличивается. Втягивающие (отводящие) мускулы прикреплены к передней части S-образного изгиба и при сокращении придают пенису изогнутое положение. Тело пениса полностью скрыто в области промежности и двухслойной мускульно-эластической оболочке; удерживается подвешивающей связкой пениса.

Головка пениса быка (рис.13) имеет 7 см или более в длину, приплюснута и снабжена острым концом. На головке различают: шейку, отросток мочеполового канала и чехол (колпачок). На *шейке* головки имеется шов, закрученный по ходу головки в левую сторону. Во время эякуляции шов натягивается и конечная часть полового члена заворачивается в сторону, описывая почти полный круг. *Отросток мочеполового канала* не доходит до конца полового члена. В головке пещеристой ткани немного и во время эрекции увеличивается она не сильно, но становится более твердой. Однако и при расслаблении консистенция головка твердая. Покрыта головка пениса тонким многослойным плоским эпителием, образующим много впячиваний в соединительно-тканый слой. Обильно снабжена чувствительными нервными окончаниями из симпатической и парасимпатической нервной

системы (концевые части n. pudenda interna, n. spermaticus externus). Рецепторы, воспринимающие холод (*тельца Краузе, генитальные*) и осязательные (*Мейснеровы тельца*), расположены поверхностно. Более глубоко в эпителии находятся чувствительные к давлению нервные окончания - *Фатер-Пачиниевы тельца*.

У хряка, барана и козла половой член, как и у быка, имеет S-образный изгиб. В выпрямленном состоянии пенис достигает длины у хряка 50-70 см, у барана и козла - 40-50 см. У этих животных головка пениса слабо выражена, заострена, причем у хряка она штопорообразно закручена. Мочеполовой отросток у козла и барана продолжается за пределы пениса на 3-4 см; у барана он изогнут, а у козла прямой (рис. 13). У кобеля в передней части пениса заложена кость длиной 8-10 см; головка утолщена, а в задней части ее имеется пещеристое образование (луковица), которая набухает во время эрекции. У жеребца пенис прямой и в состоянии напряжения достигает длины 90 см или более; головка хорошо развита и содержит много эректильной ткани, которая сильно набухает в процессе совокупительных движений и придает головке грибовидную форму. Отросток мочеполового канала находится в ямке головки.

Головка полового члена располагается в *препуциальном мешке* (praeputium). У быка препуций длиной около 38 см. Внутренняя оболочка препуция имеет два листка: *париетальный*, выстилающий полость препуция, и *висцеральный*, переходящий на половой член; покрыта она плоским многослойным эпителием, сильно складчатая, при выдвигении полового члена складки расправляются и прикрывают тело пениса. В толще своей слизистой оболочка имеет особые сальные железы, которые выделяют препуциальную смегму, способствующую скольжению пениса. Снаружи препуций покрыт кожей; заканчивается отверстием, расположенным позади пупка. Отверстие снабжено пучком длинных волос. У хряка полость препуция разделена кольцевой складкой на широкую переднюю и узкую заднюю части. В верхней стенке передней части находится небольшое отверстие, которое ведет в дивертикул препуция (diverticulum praeputii). У жеребца препуций сложный, образует двойной кожный мешок. В нем различают наружный и внутренний препуции, состоящие, в свою очередь, из наружного и внутреннего листков.

Клиническое исследование половых органов самцов. Животное размещают в хорошо освещенном манеже (или на открытой площадке), фиксируют, затем осматривают половые органы и тщательно пальпируют их. При осмотре обращают внимание на величину и симметричность обеих половин мошонки, целостность кожи ее и препуция. При пальпации семенников (сзади или сбоку) определяют степень подвижности их в полости мошонки, величину и консистенцию. У здоровых самцов семенники эластичные, имеют гладкую поверхность, легко смещаются по направлению к пахо-

вому каналу. Головка придатка у быка прощупывается на верхнем конце семенника в виде широкого, изогнутого плоского возвышения; хвост придатка внизу семенника эластичной консистенции, округлый, массивный. У козлов, реже у баранов встречаются случаи закупорки канала придатка семенника (“застой спермы”), связанные с отсутствием протоков в семявыносящих канальцах или с нарушением продвижения сперматозоидов в них. У таких животных в области головки придатка пальпируются утолщения в виде узелков различной величины (до небольшого грецкого ореха); семенники имеют более плотную консистенцию. Изменяется консистенция семенников и с возрастом животных - они становятся более плотными.

Величина семенников прямо коррелирует с основными показателями спермопродукции производителя. У быков и хряков о морфологическом развитии их половых желез можно судить по промерам семенникового мешка. Снимают промеры при помощи мягкой сантиметровой ленты. У быков рекомендуется (Г.Ф. Медведев, С.О. Турчанов) определять:

- окружность мошонки по горизонтали (во фронтальной плоскости) в наиболее широком месте семенникового мешка;

- поперечный обхват мошонки начиная с верхней, латеральной границы правого семенника, по наружной стенке семенникового мешка (в сегментальной плоскости), заканчивая у верхней, латеральной границы левого семенника;

- обхват мошонки по сагиттальной линии начиная с верхней, краниальной границы семенников по медианной линии семенникового мешка (в сагиттальной плоскости), заканчивая у верхней, каудальной границы семенников.

Взятие промеров (in vivo) должно производиться при полном опускании обоих семенников в полость мошонки.

Для быков черно-пестрой и голштинской пород разработаны критерии оценки морфологического развития половых желез (табл. 1).

Препуций и половой член осматривают сначала в спокойном состоянии, а затем в момент садки самца на самку (чучело, другого самца). Обращают внимание на состояние слизистой оболочки препуция и полового члена, величину отверстия препуция, полноту выдвижения пениса и отсутствие или наличие уздечки, повреждений и новообразований на головке пениса.

Таблица 1

Минимальные требования к морфологическому развитию половых желез у быков-производителей в различном возрасте (по Г.Ф. Медведеву, С.О. Турчанову)

Промеры семенного мешка	Возраст производителей, лет					
	1	1.5	2	3	4	6
Окружность, мм	315	330	350	360	360	370
Поперечный обхват, мм	325	345	365	385	385	410
Обхват по сагиттальной линии, мм	235	260	260	260	275	300

Придаточные половые железы у быков исследуют рукой через прямую кишку. У них легко пальпируются возле шейки мочевого пузыря ампулы спермиопроводов и пузырьковидные железы.

ОРГАНИЗАЦИЯ И ТЕХНОЛОГИЯ ИСКУССТВЕННОГО ОСЕМЕНЕНИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

Для изучения организации и технологии искусственного осеменения сельскохозяйственных животных проводится ряд лабораторных и практических занятий в аудиториях и лабораториях кафедры, в учебном (или производственном) пункте искусственного осеменения, на фермах и комплексах, в государственном предприятии по племенной работе и искусственному осеменению. При этом целенаправленно и последовательно осуществляется практическое освоение всех элементов метода ИО и знакомство с организа-

цией воспроизводства животных в сельскохозяйственных предприятиях, постановкой селекционной работы в регионе.

Методические указания. Целесообразна такая последовательность занятий.

Сначала студенты изучают методы подготовки и обеззараживания инструмента, посуды и материалов, используемых для искусственного осеменения, а на нескольких последующих занятиях - методы получения и оценки качества спермы производителей различных видов животных. На первом из таких занятий они рассматривают устройство искусственных вагин, способы их подготовки и обеззараживания, знакомятся с правилами обращения с производителями и получают сперму от быка; после получения определяют внешние свойства эякулята. На следующих занятиях преподаватель знакомит студентов с получением спермы от производителей других видов животных и методами оценки качества ее. Если на кафедре содержатся баран или козел, то получают от них сперму и осваивают обязательные методы оценки качества. При отсутствии производителей мелкого рогатого скота, снова получают сперму от быка. Для демонстрации получения спермы от жеребца можно использовать производителя учебного хозяйства или другого сельхозпредприятия (конноспортивной школы). Такое занятие легче спланировать и провести, если кафедра содержит кобылу. Проводится занятие ранней весной (март-апрель), когда у небеременных животных начинается регулярная половая цикличность и первая половая охота длится дольше обычного. После получения спермы от жеребца студенты применяют освоенные обязательные методы и знакомятся с дополнительными методами оценки качества спермы. Методы оценки можно осваивать последовательно на всех занятиях, на которых получают сперму от производителей, или спланировать отдельные занятия. При получении спермы от жеребца студентов следует познакомить и с методами диагностики половой охоты, а также техникой осеменения кобыл.

Освоив методы получения и оценки качества спермы студенты затем изучают влияние на сперматозоидов физических и химических факторов; знакомятся с правилами приготовления синтетических сред для разбавления спермы, технологией разбавления, замораживания и хранения спермы при комнатной температуре, при 0-4°C и в жидком азоте; осваивают методы оценки качества сохраняемой спермы. Желательно на этих занятиях использовать сперму быка, а при возможности - и других видов животных.

Получение спермы от хряка, оценку качества ее, разбавление и хранение можно изучить одновременно с освоением методов осеменения свиноматок. Если содержание хряка в ветеринарной клинике технологически затруднено, то кафедра должна иметь свой филиал на близлежащем свиноводческом комплексе, где имеется пункт (станция) искусственного осеменения. Там организуется и проводится такое занятие. Студенты знакомятся с размещением и устройством пункта осеменения свиней, содержанием хряков-производителей, наблюдают за подготовкой их для получения спермы и процессом получения, оценкой качества спермы, разбавлением и хранением. Затем знакомятся с организацией и технологией выявления самок в охоте, осваивают методы осеменения.

После цикла таких лабораторно-практических занятий целесообразно посещение государственного предприятия по племенной работе и искусственному осеменению (ГПП). В ГПП студентов знакомят с размещением на его территории объектов различного назначения, лабораторно-технологическим корпусом, помещениями для содержания производителей. Студенты наблюдают за всеми технологическими процессами: подготовкой быков для получения спермы, технологией получения ее, оценкой качества и разбавлением спермы, охлаждением и замораживанием в гранулах и соломинах, оценкой качества оттаянной спермы; знакомятся с требованиями к сохраняемой сперме и условиями ее хранения, правилами заказа и отпуска потребителям. В бактериологической лаборатории студенты могут познакомиться с санитарной оценкой технологических процессов и получаемой продукции (спермы). В заключение, специалисты ГПП рассказывают об основных производственных и экономических показателях племпредприятия и об организации племенной работы в зоне его деятельности.

Изучение технологии искусственного осеменения коров и организации его на фермах проводится на нескольких занятиях. Сначала в клинике кафедры преподаватель знакомит студентов со способами осеменения коров и телок, инструментом и правилами использования и утилизации его, подготовкой спермы для осеменения и оценкой качества, техникой безопасности при работе с животными. На последующих занятиях в учебном пункте, на фермах или комплексах студенты последовательно осваивают способы осеменения: ректо-цервикальный, визо-цервикальный и mano-цервикальный. На заключительном занятии студенты осматривают пункт искусственного осеменения коров и телок, знакомятся с организацией работы по воспроизводству животных в хозяйстве, учетом результатов осеменения, отчетностью.

В регионах с развитым овцеводством на пункте искусственного осеменения овец студенты знакомятся с оборудованием пункта и организацией его работы, содержанием баранов-производителей, подготовкой их для получения спермы, технологией получения, оценкой качества, разбавлением и хранением спермы, использованием замороженной спермы; наблюдают за организацией выявления охоты с помощью баранов-пробников, осваивают способы осеменения самок.

При наличии в регионе пункта искусственного осеменения кобыл при посещении его студенты осматривают помещения пункта, наблюдают за процессом получения спермы, диагностикой половой охоты у кобыл с помощью жеребца-пробника и осеменением кобыл.

ПОДГОТОВКА И ОБЕЗЗАРАЖИВАНИЕ ИНСТРУМЕНТОВ, ПОСУДЫ И МАТЕРИАЛОВ

Подготовка инструментов и посуды

Искусственное осеменение - это ряд организационных мероприятий и технологических процессов. Для осуществления их на государственных предприятиях и пунктах искусственного осеменения необходимы специальное оборудование, материалы, растворы, инструмент. Перед использованием они должны быть соответствующим образом подготовлены: быть чистыми, сухими и стерильными. Это необходимо для предотвращения повреждений или гибели сперматозоидов при контакте спермы с ними. Подготовка проводится в специально оборудованных помещениях.

Предприятия по ИО имеют отдельные комнаты для мытья и стерилизации инструмента, приборов и посуды, которые используются при получении

нии, обработке и хранении спермы. Стены в этих комнатах облицованы глазурованной керамической плиткой, полы выстланы метлахской плиткой. В моечной комнате должен быть водопровод (холодная и горячая вода) с трапами для стока воды. При отсутствии магистрального водопровода в ней устанавливают газовую колонку или электронагреватель для подогревания воды. В этой комнате необходимо иметь ванну для мытья искусственных вагин, столы для использованной и подготовленной посуды, шкафы стеклянные для запасных искусственных вагин, спермоприемников и другого инструмента, а также шкаф для спецодежды. В ней размещают также и стиральную машину для стирки халатов, фартуков, полотенец и т.д.

В стерилизационной комнате устанавливаются сушильные шкафы, автоклавы, стерилизаторы, газовая или электрическая плита, дистилляторы воды, термостат для подготовленных вагин.

Для обеззараживания воздуха и предметов в стерилизационной и во всех помещениях лаборатории, в которых ведется работа со спермой, а также в манеже устанавливаются бактерицидные лампы - источники ультрафиолетовых лучей.

Использованная или новая посуда, инструмент и материалы должны быть соответствующим образом вымыты и обеззаражены. Новую стеклянную посуду моют теплым раствором соды или специальным моющим средством (типа "Чистоль"), удаляя наклеенные этикетки, жировые пятна и другие механические загрязнения. Моют с помощью ерша, поролона или куска ваты или марли, навернутых на деревянную палочку. После мытья посуду выдерживают в течение суток или более в растворе соляной кислоты (одна столовая ложка дымящейся кислоты на 3 л дистиллированной воды); посуда должна быть полностью погружена в раствор кислоты. После этого посуду тщательно моют проточной водой и затем ополаскивают несколько раз дистиллированной водой и высушивают на специальной доске с колышками. Посуда считается хорошо подготовленной, если на ее наружной и внутренней поверхности после сушки не остается пятен.

Использованную стеклянную посуду моют также в содовом растворе или теплой водой, тщательно ополаскивают проточной водой и затем несколько раз дистиллированной. При сильном загрязнении посуды синтетическими средами для разбавления спермы, которые содержат желток или молоко, ее погружают в хромовую смесь на 24 часа (иногда достаточно обработать смесь внутреннюю поверхность в течении нескольких минут) и многократно промывают проточной водопроводной водой, затем споласкивают дистиллированной водой и высушивают.

Новые пипетки и стеклянные трубки моют проточной водой и помещают на сутки в раствор соляной кислоты. Использованные пипетки достаточно вымыть водой и только сильно загрязненные моют хромовой смесью. Кислоту или хромовую смесь наливают в высокий цилиндр и в него помещают пипетки. Жидкость постепенно заполняет просвет их. После выдерж-

ки пипетки тщательно промывают проточной водой, а затем дистиллированной. Во время мытья следят, чтобы вода полностью заполняла просвет пипетки. Удобно пользоваться специальными цилиндрами с сифоном (пипеткой) или же дистиллированную воду помещать в бутылку с патрубком внизу, к которому присоединяют эластичную (резиновую или из полимерного материала) трубку с зажимом. После промывания пипеток проточной водой их поочередно присоединяют к трубке и промывают дистиллированной водой.

Новые изделия из резины (цилиндры и камеры искусственных вагин, катетеры для осеменения кобыл, трубки и пробки) моют в теплом 2-3%-ном растворе соды, затем тщательно ополаскивают проточной водой и высушивают.

Загрязненные цилиндры мерные и мензурки, которые используются для отмеривания жидкостей, моют теплой проточной водой и ополаскивают несколько раз дистиллированной водой.

Термоса для хранения спермы - сосуды Дьюара два раза в год подвергают мойке и дезинфекции. После освобождения их от жидкого азота и выравнивания температуры внутренних стенок с температурой воздуха (отогревания) их моют 2%-ным раствором натрия гидрокарбоната, затем ополаскивают теплой водой. Остатки воды удаляют марлевыми салфетками.

Подготовленную чистую высушенную посуду перед использованием стерилизуют сухим жаром или другим общепринятым способом.

Приготовление растворов, марлевых салфеток, ватных тампонов, фильтров

Цель занятий: Приобрести навыки приготовления растворов и материалов, необходимых для работы по искусственному осеменению и трансплантации зародышей.

Объекты исследований, материалы и оборудование: натрия хлорид (NaCl), калия хлорид (KCl), натрия гидрокарбонат (Na_2HCO_3), натрий лимоннокислый трехзамещенный пятиводный ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), натрий лимоннокислый трехзамещенный двухводный ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$); натрий фосфорнокислый двузамещенный 12-водный ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$), высушенный до постоянной массы; калий фосфорнокислый однозамещенный (KH_2PO_4); кальций хлористый безводный, высушенный до постоянной массы (CaCl_2); магний хлористый 6-водный, высушенный до постоянной массы ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$); спирт-ректификат, фурацилин, калий двуххромовокислый, серная кислота, дистиллированная вода; стеклянная посуда (флаконы емкостью 100 мл, мерные цилиндры на 100, 250 и 500 мл, мерные колбы на 250, 500 и 1000 мл, колбы стеклянные на 50, 100, 250, 500 и 1000 мл); тампонницы с притертыми крышками, баночки на 100 мл с притертыми пробками, стеклянные воронки, стеклянные палочки; марля, гигроскопическая вата, бумага фильтровальная и пергаментная; ножницы прямые; весы аналитические или лабораторные, весы аптечные с разновесом, спиртометры; магнитная мешалка; автоклав, мембранные фильтры 0,45 мкм; газовая или электрическая плита.

Методические указания. Занятия проводят в лаборатории кафедры или учебном пункте искусственного осеменения. Сначала преподаватель объясняет студентам правила приготовления растворов, тампонов, марлевых салфеток. Затем поручает им самостоятельно приготовить один из растворов или салфетки, тампоны, фильтры. Целесообразно, чтобы студенты работали по парам. На каждом рабочем столе устанавливают весы, размещают соли и посуду, материалы и инструмент, необходимые для выполнения задания. Если в лаборатории установлены одни или двое весов, то студенты по очереди отвешивают соли, а затем на свое столе продолжают работу. Стерилизацию проводят в стерилизационной или на месте, если имеется в лаборатории соответствующее оборудование для стерилизации. После завершения занятия (2 часа) студенты показывают преподавателю приготовленный раствор или материал. Преподаватель уточняет у них правила приготовления, назначение, оценивает их действия.

Приготовление физиологического раствора. Нужно количество дистиллированной (очищенной) воды отмеривают цилиндром и переливают в коническую колбу. На весах отвешивают химически чистый натрий хлорид из расчета 0,9 г на 100 мл воды и помещают в колбу с водой. Если натрия хлорид расфасован в таблетках по 0,9 г, то на каждые 100 мл воды берут одну таблетку. Колбу закрывают бумагой пергаментной, помешивают до полного растворения навески и подогревают до кипения. Вместо дистиллированной воды можно использовать воду очищенную, приготовленную путем двукратного кипячения и фильтрования питьевой воды. Готовят раствор ежедневно.

Применяют физиологический раствор для промывания внутренней поверхности инструмента для осеменения, обеззараженного 70%-ным спиртом (стеклянные шприцы-катетеры и микро шприцы), резинового катетера для осеменения кобыл после стерилизации кипячением, увлажнения влажного зеркала или стеклянного расширителя, а также при оценке качества спермы.

Приготовление 70%-ного спирта. Для приготовления 100 мл 70%-ного спирта в мерный цилиндр наливают дистиллированной воды 73 мл и добавляют до метки (27 мл) 96%-ного спирта этилового (спирта-ректификата). Расчет для приготовления спирта проводят по формуле:

$$\begin{array}{rcl} 96\% & - & 100 \\ 70\% & - & x \end{array} \qquad \begin{array}{l} 70 \cdot 100 \\ x = \frac{\quad}{96} = 72,8 \end{array}$$

Крепость приготовленного спирта контролируют спиртометром (рис. 14). Для этого размещивают стеклянной палочкой спирт с водой и медленно опускают в цилиндр спиртометр. После стабилизации положения прибора по шкале его определяют крепость спирта. Хранят спирт в баночке с притертой пробкой. Используют для обеззараживания внутренней поверхности стеклянного инструмента (шприцы-катетеры, микро шприцы), а также трубок из полимерных материалов, используемых при извлечении зародышей. После обеззараживания остатки спирта удаляют тщательным промыванием инструмента 0,95-ным раствором NaCl или средой Дюльбекко.

Приготовление 2,9%-ного раствора натрия цитрата. На аналитических или других точных весах отвешивают 29 г натрия цитрата ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ХЧ или ЧДА. Навеску вносят в мерную колбу на 1 л и добавляют приблизительно 500 мл дистиллированной воды. Помешиванием раствора добиваются растворения кристаллов натрия цитрата. Затем добавляют необходимое количество воды, постоянно помешивая с помощью магнитной мешалки. Приготовленный раствор (буфер) разливают во флаконы или колбы для хранения и стерилизуют автоклавированием. Можно стерилизовать раствор вакуумной фильтрацией через мембранный фильтр 0,45 мкм в стерильную химическую колбу. Допускается стерилизация в кипящей

водяной бане в течение 10 мин. После стерилизации раствор должен иметь осмотическое давление 285-300 милли осмомолей (mOsm) и pH 6,8-6,9. Хранят в прохладном месте или бытовом холодильнике до момента использования (одна-две недели). Применяют раствор для оттаивания спермы, замороженной в гранулах, при оценке качества свежеполученной и сохраняемой спермы и в качестве компонента желточно-цитратной среды для разбавления спермы быка.

Приготовление раствора фурацилина. Готовят 0,02%-ный раствор фурацилина на физрастворе. Дистиллированную (очищенную) воду подогревают до кипения, затем помещают навеску натрия хлорида (на 100 мл воды 0,9 г соли) и фурацилина из расчета 0,2 г на 1 л (20 мг на каждые 100 мл). Тщательно размешивают и переливают в стерильную бутылку из темного стекла. Хранят в течение двух-трех дней в затемненном месте.

Применяют раствор для обработки искусственных вагин после использования, подмывания препуция у производителей перед получением спермы и наружных половых органов у коров и свиней перед осеменением.

Приготовление фосфатно-солевого буфера (среды Дюльбекко). ФСБ готовят путем смешивания трех различных стерильных растворов.

Раствор ФСБ-А

В мерную колбу на 2 л наливают 1,5 л бидистиллированной воды и помещают в нее навески: натрия хлорида 20 г, калия хлорида 0,5 г, калия фосфорнокислого однозамещенного 0,5 г и натрия фосфорнокислого двузамещенного 12-водного, высушенного до постоянной массы - 2,88 г. Помешиванием раствора добиваются растворения внесенных солей. Затем добавляют воды до метки и тщательно перемешивают с помощью магнитной мешалки. Буфер разливают по 400 мл в бутылки объемом 500 мл. Для стерилизации автоклавируют при давлении 1 атм. в течение 15 минут. Хранят при комнатной температуре.

Раствор ФСБ-Б

В мерную колбу на 250 мл вносят навеску кальция хлорида безводного, высушенного до постоянной массы - 0,25 г и добавляют до метки бидистиллированной воды при постоянном помешивании. Приготовленный раствор разливают по 50 мл во флаконы или колбы соответствующей емкости, закрывают пергаментной бумагой и стерилизуют автоклавированием при давлении 1 атм. в течение 15 минут. Хранят при комнатной температуре.

Раствор ФСБ-В

В мерную колбу на 250 мл вносят навеску магния хлорида 6-водного, высушенный до постоянной массы - 0,25 г и добавляют до метки бидистиллированной воды при постоянном помешивании. Приготовленный раствор разливают по 50 мл во флаконы или колбы соответствующей емкости, закрывают пергаментной бумагой и стерилизуют автоклавированием при давлении 1 атм. в течение 15 минут. Хранят при комнатной температуре.

Для получения полного ФСБ смешивают 400 мл ФСБ-А с 50 мл ФСБ-Б и 50 мл ФСБ-В. В таком виде буфер можно хранить при 4°C до 2-х недель.

Используют фосфатно-солевой буфер в качестве среды для промывания матки при извлечении зародышей у коров-доноров.

Приготовление 1%-ного раствора гидрокарбоната натрия. В коническую колбу на 500 мл наливают дистиллированную воду и стерилизуют в течение 0,5-1 мин. кипячением. Охлаждают проточной водой или дают остыть при комнатной температуре до 40-45°C. Затем отвешивают необходимое количество гидрокарбоната натрия из расчета 1 г на 100 мл воды. Навеску помещают в стерильную стеклянную колбу. Отмеривают стерильным цилиндром (мензуркой) необходимое количество простерилизованной дистиллированной воды и переливают ее в колбу с навеской. Колбу закрывают стерильной пергаментной бумагой. Помешиванием добиваются растворения натрия гидрокарбоната. Нельзя нагревать раствор свыше 60°C, так как натрия гидрокарбонат разлагается и становится токсичным для сперматозоидов.

Готовят раствор ежедневно. Используют при оценке качества спермы, для увлажнения влагилицного зеркала и промывания инструмента, обработанного 70%-ным спиртом.

Приготовление хромовой смеси. В коническую колбу отмеривают 1 л дистиллированной воды и растворяют в ней 60 г калия двуххромовокислого, а затем осторожно добавляют малыми порциями 100 мл концентрированной серной кислоты. Приготовленной хромовой смесью обрабатывают сильно загрязненную стеклянную посуду. После тщательно промывают проточной водой, споласкивают дистиллированной водой и высушивают.

Приготовление раствора перекиси водорода. Раствор перекиси водорода с моющими средствами используют для мытья полов, стен и мебели в боксах для работы с зародышами. Можно использовать этот раствор и при уборке манежа и чучел для получения спермы от производителей, а также помещения пункта искусственного осеменения.

Для приготовления 10 л раствора в стеклянную бутылку, в кастрюлю или ведро наливают 8750 мл питьевой воды, добавляют 1200 мл перигидроли и 50 г моющего средства типа "Прогресс", "Сульфанол" или др. Раствор готовят непосредственно перед употреблением. Норма расхода дезинфицирующего раствора 70-100 мл на 1м².

Приготовление фильтров. Фильтры бумажные используются для приготовления очищенной воды, фильтрования раствора натрия цитрата перед стерилизацией (а при необходимости - и растворов А, Б и В, используемых для приготовления ФСБ), а также красителей, применяемых при оценке качества спермы. При наличии стандартных стерильных фильтров используют их.

В лаборатории фильтры можно приготовить из фильтровальной бумаги. Для этого ножницами разрезают бумагу на квадратные листы соответствующего воронке размера. Складывают лист по диагонали и разглаживают основание образовавшегося треугольника. Затем его еще раз складывают пополам и разглаживают сторону уже четырехслойного малого треугольника. Раздвигают один слой бумаги и вкладывают фильтр в стеклянную воронку так, чтобы после обрезания ножницами выступающих краев бумаги он полностью помещался в воронке, а края его на несколько мм были ниже края ее.

Воронку с фильтром помещают в горловину колбы и осторожно порциями выливают на фильтр раствор или прокипяченную воду. При этом не следует переливать жидкость выше края фильтра. Фильтрация позволяет удалить механические примеси и обеспечивает чистоту и прозрачность раствора.

Приготовление ватных тампонов. Пласты гигроскопической ваты расслаивают и отделяют тонкие кусочки. Края кусочков заворачивают так, чтобы они приобрели форму дисков диаметром 4-6 см. По мере приготовления тампоны складывают стопочкой и помещают в банку-тампонницу с притертой крышкой. Надавливая пинцетом в различных местах хорошо пропитывают 96%-ным спиртом и закрывают банку. Можно тампоны сначала положить в чашку Петри, пропитать спиртом, отжать руками и затем пинцетом разделить их и поместить в тампонницу.

Применяют спиртовые тампоны для дезинфекции искусственных вагин, стеклянных палочек и инструментов для осеменения самок, пинцетов и корнцангов, ножниц, термометров, подставок для инструментов, поверхности стола и рук, др.

Сухие ватные тампоны помещают в бумажные пакеты или в стеклянные банки, которые закрывают бумагой, и стерилизуют в сушильном шкафу при температуре 130°C в течение 1,5 ч. Такие тампоны необходимы для смазывания вазелином стилета катетера для извлечения зародышей, удаления с приборов и инструментов остатков вазелина, слизи, спирта, физиологического раствора и др.

Приготовление марлевых салфеток. Марлю складывают в несколько слоев и разрезают прямыми ножницами так, чтобы получить куски величиной от 20x20 до 40x40 см. Проглаживают утюгом и складывают вчетверо. Затем упаковывают в стерильную пергаментную бумагу. Салфетки используют для протирания оптики, предметных и покровных стекол, удаления капель воды с приборов и инструментов. Для протирания половых губ самки перед осеменением после подмывания можно использовать одноразовые стерильные бумажные салфетки. Стерилизуют их в сушильном шкафу при температуре 130°C в течение 1 часа.

Подготовка и обеззараживание посуды и инструментов

Цель занятий: Изучить методы стерилизации посуды и инструментов.

Объекты исследований, материалы и оборудование: стеклянная посуда (цилиндры мерные и мензурки емкостью 100, 200, 250 и 500 мл; мерные колбы емкостью 200, 250, 500 и 1000 мл; флаконы емкостью 100 мл; колбы для растворов емкостью от 50 до 1000 мл); баночки на 100 мл с притертыми пробками; стеклянные и одноразовые полиэтиленовые спермоприемники; инструмент для осеменения самок сельскохозяйственных животных; тазы эмалированные, кастрюля эмалированная на 3-5 л, ерши и щетки для рук; Раствор натрия гидрокарбоната 1%-ный и 2-3%-ный, раствор хромовой смеси, соляная кислота; резиновые или поролоновые губки для рук; полотенца, вата, марлевые салфетки, бумага фильтровальная, фильтры; перчатки резиновые и полиэтиленовые одноразовые; анатомические и хирургические пинцеты, анатомические ножи, скальпели, ножницы прямые и Купера; предметные и покровные стекла, чашки Петри, часовые стекла, стеклянные палочки; шприцы и иглы, кюветы; автоклав, сушильный шкаф, простой или электрический стерилизатор, бактерицидная лампа; газовая или электрическая плита, примус; спиртовые тампоны, дистиллированная вода; доска с колышками.

Методические указания.

Занятия проводят в лаборатории кафедры, акушерской (ветеринарной) клинике или учебном пункте. Сначала преподаватель объясняет студентам порядок подготовки инструмента и посуды, предметных и покровных стекол и выдает соответствующие задания для каждого студента (или пары). Далее студенты самостоятельно выполняют эту работу. Затем преподаватель знакомит их с методами стерилизации, а также назначением, устройством и правилами работы с автоклавом, стерилизаторами, сушильным шкафом, бактерицидной лампой. При этом обращает внимание на соблюдение техники безопасности при работе с газовыми и электрическими приборами. После этого студенты стерилизуют подготовленные ими инструмент, посуду, материалы и после выполнения задания отчитываются перед преподавателем. Преподаватель в конце занятия (2 часа) уточняет прочность усвоенных студентами знаний приготовления растворов, обработки и подготовки посуды и материалов, правил стерилизации.

Вопросы:

1. Как моют новую и использованную или загрязненную стеклянную посуду, стеклянный инструмент, новые и использованные резиновые изделия?
2. Как моют пипетки и микропипетки, предметные стекла, полиэтиленовые наконечники для дозаторов пипеточных? Какими способами их можно стерилизовать?
3. Как моют и дезинфицируют сосуды Дьюара?
4. Как приготовить 2,9%-ный раствор натрия цитрата, физиологический и другие изотонические растворы, 70%-ный спирт, спиртовые тампоны? Для каких целей их применяют?
5. Какими способами стерилизуют стеклянную посуду и инструмент, металлический инструмент, изделия из резины, пластмассы и полимерных материалов, марлю и изделия из ткани?

Стерилизация кипячением. Кипячением обеззараживают: металлический инструмент; искусственные вагины и влагалищные зеркала; резиновые трубки, пробки и катетеры для осеменения кобыл; иглы и шприцы для многократного пользования; стеклянные банки и склянки, расширители влагалища и шприцы-катетеры. Стерилизация проводится в хирургических электрических, а также простых стерилизаторах и специальных стерилизаторах для искусственных вагин.

Обычный стерилизатор представляет собой продолговатую металлическую коробку различной величины с крышкой (рис. 15). Внутри его вставляется сетка с ручками (выступами), за которые ее удерживают крючками при погружении или извлечении из кипящей воды. Также устроен и электрический стерилизатор, однако он имеет автономный электронагреватель. Большой хирургический стерилизатор размещается на специальной подставке и снабжен ножным рычагом для поднятия крышки и сетки, а также устройством для включения электронагревателя и переключения мощности. Для нагревания воды в обычном стерилизаторе используют любой источник тепла: газовую или электрическую плиту, примус и т.д.

Металлический инструмент (ножницы, пинцеты и корнцанги, шприцы для осеменения ШО-3 и ШО-4 и трансплантации зародышей, расширитель шейки матки, подставки для инструментов и др.) и влагилицные зеркала кипятят в дистиллированной или очищенной воде в течение 15-20 минут. Чтобы они не покрывались ржавчиной их нужно опускать сразу в кипящую воду, а режущий и колющий инструмент (скальпели, ножницы, иглы и пр.), кроме того, обертывают марлей для предохранения от затупления. Добавление к воде 1-2% соды усиливает стерилизующий эффект и также предохраняет инструмент от ржавчины.

Шприцы для инъекций, различного типа переходники для соединения полимерных трубок, шприцы-катетеры и другие стеклянные предметы (банки, склянки и мелкая посуда) кипятят 30 минут в дистиллированной или очищенной воде без добавления щелочей. Их кладут в воду до начала подогревания, чтобы не лопались, причем шприцы разбирают и обертывают марлей. В шприцах-катетерах поршни индивидуально притерты к цилиндру и менять их нельзя. Поэтому при обертывании марлей к каждому шприцу прикрепляют и поршень. После этого их помещают на сетку стерилизатора, прикрытую марлей, и заливают теплой дистиллированной или очищенной водой. Стерилизатор накрывают крышкой, нагревают воду до кипения и кипятят 15-20 минут.

После кипячения инструмент и посуду вместе с сеткой извлекают из воды, кладут на крышку стерилизатора и высушивают; с горячей поверхности вода быстро испаряется. Инструмент, непосредственно контактирующий со спермой, необходимо сразу же встряхнуть, чтобы удалить из него воду, а оставшиеся капли удаляют обеззараженными марлевыми салфетками или сухими стерильными ватными тампонами. Из шприцев-катетеров воду удаляют вставленными поршнями, завертывают их в стерильную пергаментную бумагу, трехслойные марлевые салфетки или фольгу и хранят в шкафу. Собирая шприцы (для инъекций и шприцы-катетеры), поршень вставляют в цилиндр лишь после остывания. Пользуются при этом стерильным пинцетом.

Резиновые пробки помещают в чистые марлевые мешочки и кипятят в течение 20-25 минут отдельно от металлического инструмента. Затем мешочки с пробками извлекают из воды и сушат в сушильном шкафу при температуре не выше 60°C.

На искусственные вагины перед кипячением (а также автоклавированием) с обоих концов закрепляют чехлы (колпаки) из холста или плотной белой ткани. После этого вагину помещают в специальный или большой хирургический стерилизатор и кипятят в течение 20 минут. После кипячения быстро извлекают из воды и некоторое время удерживают в вертикальном положении, чтобы полностью удалить воду, и кладут на подставку. Чехлы снимают непосредственно перед подготовкой к получению спермы. Если

обнаружены на стенке камеры остатки воды, ее удаляют спиртовыми тампонами.

Стерилизация сухим жаром. Этим способом наиболее удобно стерилизовать стеклянную посуду, приборы и инструмент. Стерилизация проводится в электрических сушильных шкафах различных типов. Эксплуатация их осуществляется в соответствии с инструкцией по использованию. В рабочей камере сушильного шкафа температура может достигать 250-350°C. Контролируется температура ртутными термометрами, а в современных моделях приборов - электронными цифровыми термометрами (рис. 15).

Перед стерилизацией стеклянные спермоприемники и разобранные шприцы-катетеры, мерные и пастеровские пипетки, часовые стекла и чашки Петри, а также мелкую посуду заворачивают в фильтровальную (пергаментную) бумагу или пищевую алюминиевую фольгу. При этом с банок снимают притертые крышки. Мензурки и мерные цилиндры большого объема закрывают колпаками из пергаментной бумаги или пищевой алюминиевой фольги, а колбы - ватно-марлевыми пробками. Подготовленные предметы размещают на полках сушильного шкафа, нагревают его до температуры 160-180°C и выдерживают в течение 45-60 минут. Затем шкаф выключают и после охлаждения по мере необходимости берут инструмент и посуду для использования.

Стерилизация в автоклавах. Надежным способом стерилизации искусственных вагин, белья и спецодежды (полотенца, халаты, шапочки и косынки, фартуки, марлевые салфетки, вата), растворов, лабораторной посуды и инструмента является стерилизация паром под давлением - автоклавирование. Этот метод основан на том, что при кипении воды в герметически замкнутом приборе (автоклаве) повышается давление и температура пара. При этом температура кипения воды и давление находятся в определенной зависимости: при давлении 1, 1.2, 1.4 и 1.6 атм. температура кипения воды соответственно равна 99.1°C, 104.2°C, 108.7°C и 112.7°C. Высокая температура губительно действует на вегетативные и споровые формы микроорганизмов.

Автоклав представляет собой двустенный котел с герметически закрывающейся массивной крышкой. Между стенками котла находится паровая камера, предназначенная для получения водяного пара определенной температуры и давления. В нее через воронку заливают воду. Уровень воды контролируют посредством водомерного стекла. Снаружи автоклав покрыт металлическим кожухом, который предохраняет паровую камеру от механических повреждений и защищает обслуживающий персонал от ожогов. Внутри паровой камеры (котла) находится стерилизационная камера, в которую помещают биксы (стерилизационные коробки, барабаны) с стерилизуемым материалом; в днище стерилизационной камеры имеется отверстие для выхода пара. Между паровой и стерилизационной камерой остается свободное пространство, куда поступает пар из парообразователя через патру-

бок с вентилем. В нижней части автоклава расположен выпускной кран, через который удаляется конденсационная вода, воздух и пар. Когда выпускной кран закрыт, пар поступает в замкнутое пространство и это приводит к повышению давления и температуры. Давление контролируют по показанию манометра. Шкала его градуирована в атмосферах.

В автоклавах котел, как и стерилизационная камера, расположен горизонтально или вертикально. Поэтому различают автоклавы горизонтальные и вертикальные (рис. 15). Выпускаются и переносные (лабораторные) мини-автоклавы.

Перед включением автоклава проверяют исправность манометра и кранов, целостность водомерного стекла. Автоклав заправляют в строгой последовательности: через воронку наливают воду до $2/3$ высоты водомерного стекла, помещают стерилизуемый материал, плотно завинчивают крышку, открывают выпускной кран и включают нагревательное устройство. Доводят воду до кипения, после чего пар начинает переходить из паровой камеры в стерилизационную и затем выходит из нее через отверстие в днище, связанное с выпускным краном. Сначала выделяется пар, смешанный с воздухом. Как только пар становится сухим, выпускной кран закрывают и следят за давлением. После достижения необходимого уровня, ручку переключателя ставят в положение "стерилизация" и замечают время. Продолжительность стерилизации зависит от температуры и давления: при 0,5 атм. выдерживают 30 мин. По окончании стерилизации отключают нагреватель (ручка ставится в положение "0") и ожидают снижения давления до 0. Затем открывают выпускной кран и выпускают пар. После этого можно открывать крышку.

При автоклавировании искусственных вагин на концы их одевают чехлы или же их закрывают пергаментной бумагой, которую закрепляют резиновыми кольцами. Инструмент, спецодежду, марлевые салфетки, вату упаковывают в биксы. Растворы и лабораторную посуду можно размещать непосредственно в стерилизационной камере. Горловину колб закрывают пергаментной бумагой.

Обеззараживание спиртом. Шприцы-катетеры (микро шприцы) для осеменения коров и овец можно обеззараживать путем промывания внутренней поверхности 70%-ным спиртом с последующим тщательным (5-6 раз) промыванием физиологическим раствором, 1%-ным раствором натрия гидрокарбоната или 2,9%-ным раствором натрия цитрата. Катетеры для извлечения зародышей из латексной резины полностью погружают в 96%-ный или 70%-ный спирт, а затем промывают стерильной средой Дюльбекко.

Изделия из пластмассы и резины можно стерилизовать путем погружения их в 0,5%-ный раствор хлорамина на сутки. После этого их ополаскивают стерильной дистиллированной водой и физиологическим раствором или средой Дюльбекко.

Наружную поверхность стеклянного инструмента для осеменения самок, а также сухие стеклянные палочки, химические термометры, пластмассовые подставки, эбонитовые палочки для смазывания искусственных вагин вазелином, пинцеты, ножницы, скальпели и др. обеззараживают путем протирания тампонами, пропитанными 96%-ным спиртом. Отработанные спиртовые тампоны складывают в специальную баночку или тампонницу и используют затем для фламбирования инструментов.

Спиртом обеззараживают также отогретые вымытые сосуды Дьюара. Сухие внутренние стенки их протирают тампонами, пропитанными 96%-ным спиртом-ректификатом.

Стерилизация фламбированием (обжиганием). Этот способ применяется чаще в полевых условиях. Для стерилизации инструмент (влагалищные зеркала, ножницы, пинцеты, стеклянные палочки, подставки) проводят несколько раз над не коптящим пламенем горящего спиртового тампона, спиртовки, паяльной лампы или газовой горелки. При этом стерилизуемые предметы постоянно поворачивают, медленно проводя через верхнюю часть языка пламени, где температура наиболее высокая, и обжигают (но не прокаливают) со всех сторон, чтобы была обеззаражена вся поверхность. Стеклянные предметы фламбируют осторожно: вначале обжигают над пламенем огня на расстоянии 15-20 см, а затем приближают к нему, равномерно обрабатывая со всех сторон.

Обеззараживание паром. Этот способ в практике искусственного осеменения используется крайне редко. Стерилизация проводится в аппарате Коха или при помощи парообразователя и только для обеззараживания внутренней поверхности стеклянных банок и колб, инструмента для искусственного осеменения свиней (вагины, спермоприемники, ампулы, зонды).

В парообразователь наливают на 3/4 воду, закрывают его крышкой и нагревают до кипения на электроплитке или газовой плите. Образующийся пар поступает в резиновую трубку, присоединенную к патрубку крышки. Струю пара, выходящего из трубки, направляют на обеззараживаемый инструмент. По мере выкипания воды, ее подливают в колбу через воронку, разжав зажим на резиновой трубке.

Продолжительность обеззараживания различных предметов (инструментов) неодинаково и зависит от их размеров, внешней температуры и силы струи пара. Обеззараживание проводят обычно в течение 3-5 минут с того момента, когда пар начинает выходить из обеззараживаемого прибора (пар вначале конденсируется на холодных стенках инструментов). Обработанные паром инструменты нужно промывать стерильным 1%-ным раствором бикарбоната натрия или 2,9%-ным раствором лимоннокислого натрия, чтобы удалить с них оставшиеся капельки воды, которые может неблагоприятно отразиться на качестве спермы.

Правила и техника подготовки и обеззараживания отдельных инструментов, используемых для получения и разбавления спермы а также для осеменения самок, подробнее будут описаны в соответствующих разделах.

Стерилизация вазелина. Белый или желтый вазелин используют для смазывания внутренней поверхности камер искусственных вагин, стилетов катетеров для извлечения зародышей, наружной поверхности ветвей влагаллищного зеркала, рук или перчаток при вагинальном исследовании.

В стеклянную банку с притертой пробкой накладывают не слишком полно вазелин. Плотнo не закрывают пробкой, чтобы во время стерилизации она не прикипела к горловине или не лопнула банка; обычно пробку помещают в наклонном положении. На дно электрической водяной бани или кастрюли кладут сложенную в несколько слоев марлю (полотно, вату) и ставят на нее банку с вазелином. В баню (кастрюлю) наливают холодную или теплую воду так, чтобы уровень ее был несколько выше уровня вазелина в банке. Электрическую баню включают в сеть, а кастрюлю ставят на электрическую или газовую плиту. После начала кипения воды и расплавления вазелина, обеззараживание его продолжают 20-30 минут. После этого банку извлекают из водяной бани и дают остыть, после чего плотно закрывают пробкой.

Если после расплавления вазелина на дне банки появляется осадок, верхний (чистый) слой вазелина переливают в другую банку и стерилизуют заново. Стерилизация вазелина должна проводиться ежедневно.

ПОЛУЧЕНИЕ СПЕРМЫ ОТ ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ

Цель занятий: познакомить студентов с методами получения спермы от самцов и правилами обращения с ними.

Объекты исследований, материалы и оборудование: разобранные искусственные вагины быка, барана, хряка, жеребца; подставки для спермоприемников и искусственных вагин; поролоновая (капроновая) протирка для вагин, кружка Эсмарха; дистиллированная вода, 2-3%-ный раствор натрия гидрокарбоната, 0,02%-ный раствор фурацилина, физиологический раствор, 70%-ный спирт этиловый; тампоны, пропитанные 96%-ным спиртом-ректификатом, марлевые салфетки, вата; стерильный вазелин; компрессор или шары Ричардсона, термометры, стеклянные воронки, пинцеты, корнцанг; бык, баран (козел), хряк, жеребец, чучело свиньи, животное-манекен для получения спермы от быка, овца (коза) и кобыла в охоте; станки для получения спермы от быка и барана, палка-водила для быка; стеклянная посуда (цилиндры мерные и мензурки емкостью 100, 200, 500 мл; тазы эмалированные, кастрюля эмалированная на 3-5 л, ерши и щетки для рук; резиновые или поролоновые губки для рук; полотенца, бумага фильтровальная, пищевая алюминиевая фольга; перчатки резиновые и полиэтиленовые одноразовые; электроэякуляторы для быка и барана; автоклав, сушильный шкаф, термостат для вагин, простой и электрический стерилизатор, бактерицидная лампа; газовая или электрическая плита.

Методические указания. Занятия проводят в лаборатории и ветеринарной клинике кафедры, в учебном или производственных пунктах искусственного осеменения свиней, овец и кобыл. На первом занятии студентов распределяют на группы по несколько человек, обеспечивают их деталями искусственных вагин, необходимыми материалами, растворами и оборудованием для подготовки вагин. Преподаватель демонстрирует студентам устройство искусственной вагины, объясняет правила сборки и подготовки. Студенты учатся самостоятельно собирать вагины для производителей сельскохозяйственных животных и готовят два-три прибора для получения спермы от быка. После этого преподаватель объясняет студентам правила обращения с быком, методы подготовки и технику получения спермы. Подготовив быка и манекена, один или два студента под контролем преподавателя получают сперму (1-2 эякулята) и определяют ее внешние свойства. На последующих занятиях сперму получают от барана, жеребца, хряка.

В конце каждого занятия (3-4 занятия по 2-4 часа) преподаватель оценивает действия студентов при подготовке искусственной вагины и получении спермы от самцов, обращает внимание на допущенные погрешности, задает несколько вопросов:

1. Каковы принципы устройства искусственной вагины и какие условия необходимо создать в ней, чтобы обеспечить рефлекс эякуляции у самца?
2. Правила и последовательность подготовки искусственной вагины для получения спермы?
3. Какие животные (фантомы) используются при получении спермы от быков?
4. В чем заключается подготовка быков-производителей для получения спермы? Каковы основные мероприятия по стимуляции у них половой функции?
5. В каких случаях применяют методы массажа и электроэякуляции для получения спермы от быков?
6. Правила обращения со спермой после получения? Как проводится предварительная оценка спермы?
7. Какие методы применяют для получения спермы от хряков? Особенность эякуляции у них?
8. Какой основной метод получения спермы у жеребца?
9. Каких животных используют в качестве манекена при получении спермы от жеребца, хряка, барана?
10. Оптимальный режим получения спермы от быка, хряка, барана и жеребца?
11. Какие факторы влияют на объем и качество получаемой от самцов спермы?

Устройство, подготовка и использование искусственной вагины

Искусственная вагина (влагалище) - прибор для получения спермы от самцов; состоит из следующих частей (рис. 16-19).

Цилиндра или корпуса, изготовляемого из толстой вулканизированной резины (для быка и хряка), эбонита (для барана), оцинкованного железа или алюминия (для жеребца, хряка).

Тонкостенной резиновой камеры, поверхность которой с одной стороны гладкая, с другой - несколько шероховатая; диаметр камеры для быка и хряка равен диаметру корпуса, для барана меньше диаметра корпуса, а для жеребца несколько шире диаметра узкой части корпуса (табл. 2).

Резиновых колец, которые используются для крепления камеры на корпусе искусственной вагины для быка, хряка и жеребца; для вагины барана кольца не предусмотрены.

Краника эбонитового или полиэтиленового - его вставляют в отверстие патрубка на корпусе для регулирования давления при подаче воздуха. В вагине для быка и хряка краник вставляется непосредственно в отверстие патрубка, а в вагину барана посредством резиновой пробки с отверстием или резиновой трубки.

Спермоприемника - емкости, в которую попадает сперма после эякуляции производителя. Для искусственной вагины быка образца 1942 г. применяется двустенный стеклянный спермоприемник с крышкой (рис. 16); в современной укороченной модели спермоприемник полиэтиленовый однослойный. В вагине для барана спермоприемник одностенный или двустенный стеклянный, а для жеребца - резиновый в виде широкого стакана (рис. 18). В приборах для хряка используется специальный пластмассовый спермоприемник или стеклянная банка емкостью 500-1000 мл (рис. 19).

Резинового держателя спермоприемника, используемого только в искусственной вагине для быка образца 1942 г.; он служит для крепления стеклянного спермоприемника.

Вкладыша полиэтиленового - имеется только в вагине для хряка; вставляется в вагину со стороны спермоприемника и предотвращает полное смыкание стенок резиновой камеры.

Для смазывания внутренней поверхности резиновой камеры вазелином предназначена *эбонитовая палочка*, а для мытья вагин - поролоновая или капроновая *протирка*. Для современной модели прибора с полиэтиленовым спермоприемником предусмотрены ватно-марлевые (или из другого материала) термоизоляционные чехлы, которые позволяют выдерживать необходимую температуру (38°C) в процессе получения спермы в манеже в холодное время года.

В Европейской модели вагины для быка (Minitub) корпус длиной от 30 до 41 см. Камера из латексной резины, коричневатого цвета; поверхность гладкая или шероховатая; патрубков в корпусе металлический, вместо краника - металлическая завинчивающаяся пробка с отверстием для нагнетания воздуха и устройством для герметизации. В качестве спермоприемника используется градуированная пробирка емкостью 15 мл (нередко двустенная); присоединяется спермоприемник при помощи направляющего резинового конуса. Спермоприемник и резиновый конус прикрываются утеплительным чехлом (рис. 17).

Искусственная вагина для барана (рис. 18) конструктивно подобна вагине для быка образца 1942 г. и отличается лишь размерами и устройством патрубка. Для фиксации в отверстии патрубка эбонитового краника на него необходимо одеть кусочек сложенной вдвое толстой резиновой трубки или же подобрать по размеру отверстия патрубка резиновую пробку. Отверстие в пробке для краника легко сделать при помощи специального прибора. Он состоит из набора заточенных трубок различного диаметра. В верхней (укрепленной) части трубок имеется отверстие для металлического стержня, посредством которого вращают трубку и вырезают отверстие в пробке.

Для хряка чаще применяют искусственную вагину, предназначенную для быка, но в зависимости от размера полового члена производителя ее укорачивают на 10-25 см. В моделях приборов для хряков, предложенных в лаборатории А.В. Квасницкого (Полтавский институт свиноводства), цилиндр выполнен из жести; обогрев электрический или водяной; спермоприемник пластмассовый (рис. 19). Водоналивная искусственная вагина состоит из двустенного жестяного цилиндра с отверстием для наливания воды и патрубком (трубкой), через который нагнетается воздух; резиновой камеры, которая вставляется внутрь жестяного цилиндра и заворачивается на концах выступающей внутренней части его; прозрачного пластмассового спермоприемника. Вагина с электрическим обогревом имеет также двустенный металлический цилиндр - обогреватель, заполняемый водой, кото-

рая нагревается вмонтированной электросвечой, и конусную одностенную трубку с патрубком для нагнетания воздуха. В эту трубку заправляется резиновая камера, после чего такая вагина вставляется в обогреватель. Температура регулируется контактным термометром.

На корпусе искусственной вагины для жеребца (рис. 18) имеется суженная часть (горловина), а также скоба для фиксирования рукой при получении спермы; на патрубок для подачи воды навинчивают пробку с резиновой прокладкой (возможна с клапаном для выхода воздуха), что обеспечивает герметичность пространства между камерой и цилиндром.

Таблица 2

Размеры цилиндров и камер искусственных вагин (см)

Производитель	Цилиндр		Камера	
	длина	диаметр	длина	диаметр
Бык: образца 1942 г.	50	8	70	6,2
современная	30	8	55-65	6,2
Европейская	30,35,41	8	65	6,8
Баран	20	4,8-5,5	30-40	3,3
Хряк	26-41	8	70	6,2
Жеребец	54	13	90	9,3

Правила подготовки и сборки искусственной вагины. Корпус искусственной вагины, камеру, фиксирующие резиновые кольца и держатель спермоприемника тщательно моют горячим 2-3%-ным раствором натрия гидрокарбоната, многократно ополаскивают чистой горячей водой и высушивают. Перед сборкой убеждаются в целостности корпуса вагины и резиновой камеры, в соответствии диаметров отверстия патрубка и краника для подачи воздуха и исправности краника. Если краник проворачивается туго, его слегка смазывают вазелином. Для обнаружения повреждений камеры ее растягивают двумя руками за концы и осматривают каждую сторону; в момент растяжения повреждения хорошо заметны. Неиспользованные новые резиновые камеры выворачивают гладкой поверхностью внутрь. Удобнее это сделать следующим образом: через всю камеру проводят корнцанг и захватывают противоположный конец, затем постепенно выворачивают ее.

Камеру вставляют в корпус, заворачивают концы ее и поочередно натягивают на концы цилиндра. Чтобы не было перекосов, после натягивания одного конца камеры вагину переворачивают вниз и приподнимают за свободный конец камеры, выравнивают ее и натягивают на цилиндр. При натяжении камеры сначала отвернутые края ее двумя руками натягивают на цилиндр, а затем ладонью руки выравнивают просвет. При правильном натяжении камеры диаметр внутреннего просвета искусственной вагины должен быть на всем протяжении одинаковым и не иметь складок. Завернутые концы камеры должны быть примерно одинаковой величины; их закрепляют с каждой стороны резиновыми кольцами.

В просвет искусственной вагины для хряка со стороны спермоприемника (до присоединения его) рекомендуется вставить полиэтиленовый вкладыш. Он способствует свободному передвижению спермы в спермоприемник. В качестве спермоприемника используется полулитровая (литровая) банка. Ее присоединяют к вагине при помощи отрезка резиновой камеры; в верхней части отрезка делают небольшое отверстие для выхода воздуха во время эякуляции хряка.

В вагине для барана вследствие разницы в диаметрах резиновой камеры и цилиндра, натягивается камера с трудом. Но на цилиндре удерживается прочно и не требует дополнительной фиксации кольцами. При выполнении этой процедуры не следует растягивать камеру, чтобы не допустить образования воронкообразного расширения; камера должна загибаться внутрь под прямым углом.

Порядок подготовки искусственной вагины к работе. Подготовка искусственной вагины включает выполнение следующих последовательных работ.

Мытье искусственной вагины. В предприятиях по искусственному осеменению сразу после получения спермы вагину помещают в ванну с 0,02%-ным раствором фурацилина. Моют использованные вагины с помощью протирки 2-3%-ным раствором натрия гидрокарбоната. После этого их тщательно ополаскивают чистой горячей водой для удаления остатков соды, затем дистиллированной водой и высушивают или насухо вытирают полотенцем.

Стерилизация искусственной вагины проводится автоклавированием или кипячением. Перед стерилизацией на оба конца искусственной вагины надевают чехлы из белой ткани (при автоклавировании можно использовать и колпаки из пергаментной бумаги или алюминиевой фольги; укрепляют колпаки новым резиновыми кольцами). Автоклавирование искусственных вагин проводят при температуре 105°C и давлении 0,3-0,5 атм. в течение 15-20 минут. Европейскую модель вагины рекомендуется автоклавировать при давлении не более 0,02 атм. (*bar*) и температуре 100°C в специальных автоклавах-стерилизаторах типа Sterivar (фирмы "Minitub") с низким давлением (рис. 20). Кипячением искусственные вагины стерилизуют в дистиллированной воде не менее 20 минут.

Стерилизация 96%-ным спиртом-ректификатом применяется как дополнительный способ. Спиртовой тампон диаметром 5-6 см складывают пополам, затем еще раз и зажимают прямой угол образовавшегося четырехслойного треугольника корнцангом, вводят инструмент в середину искусственной вагины и тщательно протирают внутреннюю поверхность камеры по направлению к одному концу, затем поворачивают вагину и обрабатывают другую часть камеры.

Наполнение искусственной вагины водой. После стерилизации в межстенную полость вагины заливают воду. Температура воды перед заполне-

нием зависит от типа и температуры прибора (табл. 3). Если прибор охлажденный, то вода должна иметь температуру 45-70°C, а к моменту получения спермы 43-45°C. После наполнения вагины водой отверстие патрубка закрывают краником и ее помещают в термостат и хранят при температуре 45-46°C.

Таблица 3

Количество воды и температура ее в вагине для различных производителей

Производитель	Тип прибора	Количество воды, мл	Температура воды (°C),
Бык	1942 г.	450-500	60-70
	Современная	200-300	60-65
Баран	1942 г.	150-180	50-55
	Хряк	Резиновая (ВИЖ)	300-400
Жеребец	Полтавский НИИ свиноводства	1000-1200	45-50
	Алюминиевая	1500-2000	50-60

Стерилизация спермоприемника. В приборах образца 1942 г. (для быка и барана) используются стеклянный двустенный или градуированный одностенный спермоприемники. Стерилизуют их сухим жаром, кипячением или автоклавированием. Стерилизация сухим жаром проводится при температуре 160-180°C в течение 40-60 минут. Перед стерилизацией подготовленный спермоприемник закрывают крышкой и заворачивают в пергаментную бумагу или фольгу. Если стерилизация проводится кипячением или автоклавированием, то после извлечения из стерилизатора или автоклава с внутренних стенок спермоприемника необходимо удалить капельки воды. Перед присоединением к искусственной вагине в обеззараженный двустенный спермоприемник наливают воду. В спермоприемнике для быка вода должна иметь температуру 30-35°C, для барана - 25-30°C; заливают воду температуры соответственно 35-40°C и 30-35°C.

Стерилизация полиэтиленовых спермоприемников проводится с помощью бактерицидных ламп. Спермоприемники раскладывают в один ряд и выдерживают под лампами в течение 40-50 минут.

Смазывание резиновой камеры. Внутреннюю поверхность резиновой камеры смазывают стерильным вазелином или синтетической средой с помощью эбонитовой палочки. Обеззараживают палочку спиртовым тампоном, пропитанным 96%-ным спиртом. Для обеззараживания конец палочки обхватывают тампоном и несколькими движениями назад и вперед тщательно обрабатывают ту часть ее, которая будет соприкасаться с внутренней поверхностью камеры. затем концом палочки берут вазелин из банки и круговыми движениями начиная с конца вагины равномерно смазывают поверхность камеры. Отрезок ее (длиной 2-3 см в вагине для барана, 4-6 см - для быка и хряка и 8-10 см - для жеребца) со стороны спермоприемника не смазывается для предупреждения попадания вазелина в сперму.

Присоединение спермоприемника. Стекланный спермоприемник для быка вставляется в вагину до кольцевого выступа на его середине и закрепляется резиновым держателем и кольцом. При использовании одноразового полиэтиленового спермоприемника для быка, конец вагины можно обернуть полоской стерильной фильтровальной бумаги для предупреждения попадания вазелина в сперму. Полоску выдвигают на 1-2 см за край корпуса, сверху на корпус вагины одевают спермоприемник и закрепляют его кольцами. В Европейской модели прибора спермоприемник вставляется в узкую часть резинового конуса и прочно удерживается без дополнительной фиксации благодаря расширению (фланцу) на его открытом конце.

В вагине для барана спермоприемник не крепится, а при получении спермы придерживается пальцами. К вагине для жеребца спермоприемник присоединяется одеванием его на узкий конец корпуса (горловину); в момент совокупительных движений производителя он удерживается в таком положении давлением руки. К искусственной вагине для хряка спермоприемник присоединяется при помощи обеззараженного отрезка резиновой камеры с отверстием; отрезок укрепляют на корпусе вагины резиновыми кольцами. К металлической вагине пластмассовый спермоприемник присоединяется посредством специальной резиновой муфты или же отрезка камеры для вагины барана.

Нагнетание воздуха в искусственную вагину. Воздух в вагину нагнетается через краник с помощью баллона, двойных шаров Ричардсона или специального компрессора. Для этого резиновый шланг от компрессора (трубку от шаров) надевают на верхнюю (округлую) часть краника, открывают его и нагнетают воздух; нагнетание продолжают до смыкания стенок камеры и образования щели или треугольной складки. В искусственную вагину для жеребца воздух не нагнетается, давление создается за счет большого объема полости цилиндра и перемещения в нем воды. В жестяную вагину для хряка воздух нагнетают через тонкий патрубок в пространство между внутренней стенкой корпуса и резиновой камерой. Шары Ричардсона посредством стеклянного тройника соединяют длинными резиновыми трубками с патрубком и манометром (ртутным или водяным). По показаниям манометра во время получения спермы следят за давлением в вагине и при необходимости понижают или увеличивают его до необходимого уровня: 40-60 мм ртутного или 40-50 см водяного столба. Устройство для нагнетания воздуха имеется и в ряде зарубежных моделей искусственной вагины для хряка. Оно остается присоединенным к кранику в процессе получения спермы. Это необходимо для регулирования давления в вагине, к которому очень чувствительны хряки.

Измерение температуры в искусственной вагине. Температуру в вагине проверяют непосредственно перед взятием спермы. Подготовленную вагину несколько раз покачивают для равномерного обогривания водой ее стенок (если она не находилась в термостате после наполнения водой), по-

ворачивают спермоприемником вверх и вставляют специально предназначенный для этой цели спиртовой термометр в открытый конец вагины. Предварительно термометр обеззараживают ватным тампоном, смоченным 96%-ным спиртом-ректификатом. Температура в вагине (образца 1942 г.) в момент получения спермы должна быть не ниже 40°C и не выше 42°C. При использовании укороченной вагины с одноразовым спермоприемником температуру устанавливают не ниже 43°C и не выше 55°C.

Получение спермы от быка

В предприятиях по искусственному осеменению сперму от быков-производителей получают в искусственную вагину. В качестве манекена используют малоценных в племенном отношении быков или волов, а также чучела различных конструкций. Использование быков-производителей в качестве подставных животных неблагоприятно отражается на качестве их спермы, поэтому практикуется редко. Взятие спермы с использованием механических установок более целесообразно по сравнению с подставными животными: снижается микробная контаминация эякулятов, улучшаются условия работы техников, повышаются технологические свойства спермы и удлиняются сроки эксплуатации производителей. Наиболее популярны механическое чучело с амортизирующим устройством и подвижное чучело (рис. 21).

Получают сперму в манеже, а в теплое время года и на открытой площадке. Манеж должен быть просторным, высотой не менее 4 м, площадью 70 м² или более. В нем устанавливается одно или несколько чучел и станки для фиксации животных-манекенов (рис. 22 а). Сзади станка или чучела пол покрывают прочными резиновыми матами или ковриками из другого эластичного материала. Возле стенок манежа устанавливают защитные барьеры, обеспечивающие безопасность работы с животными.

В США некоторые организации по искусственному осеменению в помещениях устраивают просторные манежи, площадью 150-200 м² или даже 500 м². В них оборудовано несколько мест (до 6) для получения спермы на корову, другого быка или чучело, а также для фиксации и выдержки производителей перед взятием спермы. Такая разнообразная обстановка усиливает половое возбуждение у быков и способствует более быстрому получению спермы хорошего качества. Пол в таких манежах покрыт резиновыми ковриками, но чаще земляной (глинобитный), следовательно более благоприятный для конечностей быков. Взятие спермы может вестись на быка или корову, не зафиксированных в станках (рис. 22 г).

В манеж для взятия спермы быка вводят с помощью палки-водила длиной около 2 м, зафиксированной за носовое кольцо (рис. 22 б). Производителя подводят к животному-манекену, выдерживают несколько минут и допускают садку. В момент прыжка быка студент (оператор), расположенный на 2-3 шага справа и сзади подставного животного или чучела, немедленно подходит ближе и левой рукой (ладонь обращена вверх) осторожно

смещает за препуций половой член производителя в правую сторону и направляет его в искусственную вагину (рис. 22 в, г); продольная ось вагины в этот момент должна совпадать с направлением полового члена. Прикосновение или обхватывание рукой непосредственно пениса быка может затормозить рефлекс эрекции, а в начале совокупительного движения - вызвать даже преждевременную эякуляцию (рис. 22 е).

После совокупительного толчка вагине придают горизонтальное положение, но не снимают с полового члена производителя, а опускают по мере движения быка вниз (пока он передними конечностями не коснется пола). После этого, отняв искусственную вагину, переворачивают ее спермоприемником вниз, открывают краник, чтобы выпустить из меж стенового пространства воздух и дать стечь эякуляту в спермоприемник. От вагины стеклянный спермоприемник отделяют постепенно и осторожно, затем закрывают крышкой. В современной модели прибора полиэтиленовый спермоприемник оставляют на цилиндре вагины и при помощи прибора "Молния" герметизируют в нем полученный эякулят, после чего ножницами отделяют эту часть и передают в лабораторию.

Взятие спермы проводят в утренние часы до кормления производителей. Именно такая очередность производственных процессов необходима потому, что одновременное сочетание акта кормления и взятия спермы является одним из факторов, предрасполагающих к развитию импотенции.

Получение высококачественной спермы возможно лишь при условии хорошей подготовки быков непосредственно перед ее взятием. При этом важное место должно отводиться функциональной подготовке. Целостная эффективная система подготовки их к получению спермы должна включать следующие мероприятия.

1. Гигиена манекена (животного, чучела). До начала работы животных, на которых получают сперму, необходимо тщательно почистить, чтобы во время садки производителя микроорганизмы с частицами грязи и пыли с них не попадали в воздух, на половой член производителя и в искусственную вагину. Если используют чучело, то его моют теплой водой с мылом, высушивают и обеззараживают 2%-ным раствором хлорамина. Можно использовать для мытья и обеззараживания раствор перекиси водорода. Обработку чучела проводят обычно сразу после окончания получения спермы.

2. Гигиена быка производителя - чистка, подмывание препуция и высушивание. Наружную поверхность препуция обмывают теплым раствором фурацилина и насухо вытирают бумажной салфеткой или туалетной бумагой. Можно использовать индивидуальные полотенца. Если препуций сильно загрязнен, то его моют теплой водой с мылом, а затем обмывают раствором фурацилина. Полностью животное моют за день до получения спермы или не ранее, чем за 1-1,5 часа до получения, и тщательно высушивают (рис.23).

3. Подвязывание стерильного фартука (рис. 23).

4. Функциональная подготовка к взятию спермы быков молочных пород: ввод в манеж, подвод к манекену, одна холостая садка, выдержка возле манекена 2,5 минуты, две холостые садки и получение эякулята. Такая же подготовка и перед получением второго эякулята. При отсутствии фартука во время холостых садок половой член производителя необходимо отводить в сторону, чтобы он не касался манекена или чучела (рис. 22). Быков мясных пород после подвода к манекену не сдерживают, а позволяют сделать три холостых садки, затем берут первый эякулят; второй эякулят обычно получают без предварительных холостых садок.

5. Температура в искусственной вагине с одноразовым полиэтиленовым спермоприемником устанавливается в пределах 45-46°C (возможно до 55°C).

6. Проводка производителя и получение второго эякулята не позднее, чем через 10-15 минут.

7. Регулярная смена манекена, замена чучела на манекена или наоборот, смена места получения спермы, присутствие других животных в манеже.

Применение системы функциональной подготовки для взятия спермы позволяет существенно повысить эффективность использования быков-производителей (Г.Ф. Медведев и Н.А. Лебедев). Себестоимость производства одной спермодозы в Могилевском племпредприятии в зависимости от уровня половой потенции быка и сезона года была снижена на 5,3-37,6%. Кроме того, повышалась криоустойчивость и оплодотворяющая способность их спермы.

Получение спермы с помощью электроэякулятора. В практике иногда возникает необходимость применить метод электроэякуляции. Обычно этим методом получают сперму от молодых, не приученных к искусственной вагине быков для оценки качества их спермы, а в центрах по искусственному осеменению - и от старых, хромых быков, которые не могут сделать садку. Перед получением спермы производителя фиксируют в станке, прямую кишку освобождают от каловых масс и подмывают препуций. При наличии современного прибора (рис. 24) зонд его с электродами вставляют в прямую кишку и прижимают книзу. После этого делают электрические стимулы в соответствии с рекомендованным инструкцией режимом, при этом напряжение тока постепенно повышают. В начале при невысоком напряжении происходит выделение секрета луковичных желез, затем следует обильное выделение секрета пузырьковидных и предстательной желез и, наконец, семенная жидкость по каплям стекает по волосам препуция или из отростка уретры выдвинутого полового члена. Обычно сперма выделяется спонтанно, пассивно, но иногда отмечается эрекция пениса и оргазм. В таких случаях эякулят нередко теряется. Оргазм часто сопровождается поворотом головки полового члена вокруг продольной оси. Это же можно наблюдать и при массаже и при получении спермы в искусственную вагину. В момент электроэякуляции сперму собирают как и при ректальном массаже. Объем эякулята чаще больше стандартного.

Получение спермы методом массажа. Известно, что во время полового возбуждения сперматозоиды из канала придатка семенника перемещаются в ампулы спермиопроводов и сохраняются там до момента эякуляции. Массажем можно вызвать сокращение ампул и выделение половых клеток наружу.

Перед получением спермы быка выдерживают возле коровы в охоте, чтобы вызвать у него половое возбуждение. Затем руку вводят в прямую кишку на глубину 25-35 см; при необходимости освобождают ее от каловых масс. В момент расслабления находят твердый червеобразный орган - мочеполовой канал. Двигая по нему рукой вперед, отыскивают мягкую шейку мочевого пузыря с лежащими на ней ампулами спермиопроводов в виде эластичных трубок, толщиной почти с палец, а по бокам от них - грушевидные пузырьковидные железы. Производят осторожный массаж желез спереди назад, и таким же образом массируют ампулы спермиопроводов. Обычно двухминутного массажа бывает достаточно для того, чтобы выде-

лилась сперма. Если массировать только пузырьковидные железы, то, как правило, выделяется семенная жидкость без сперматозоидов.

Объем получаемой этим методом семенной жидкости колеблется от 0,5 до 23 мл. Так как пенис при массаже часто не выдвигается и не наступает эрекции его, то для предотвращения загрязнения спермы волос вокруг отверстия препуция тщательно подмывают и вытирают насухо. Сперму собирают в чистый стаканчик, подставленный к отверстию препуция, или специальное приспособление, входящее в комплект электроэякулятора (рис. 24). Полученная этим методом сперма нередко бывает загрязнена мочой, имеет более высокое содержание секрета пузырьковидных желез и вообще худшее, чем в нормально эякулированной жидкости, соотношение отдельных компонентов. При грубом и неумелом массаже возможны травмы спермиопроводов и пузырьковидных желез.

Этим методом можно воспользоваться для получения спермы от тех быков, которые по какой-либо причине (слабые или больные задние конечности, слишком вялое проявление половых рефлексов и др.) не в состоянии выделить сперму в искусственную вагину или идти в случку.

Получение спермы от барана.

Сперму от барана получают в манеже, а в теплое время года - и на открытой площадке. В качестве подставного животного используют овцу в охоте. Особенно это необходимо вначале приучения производителя к искусственной вагине. В последующем, когда будут выработаны условные рефлексы на обстановку и время, можно пытаться получить сперму и на овцу не в охоте, а то и на валуха или другого малоценного барана, или даже на чучело. Перед получением спермы брюхо барана или козла и препуций их необходимо почистить.

Сперму от барана получают также, как и от быка. Половой акт у овец продолжается недолго, поэтому студент должен быть наготове и находится возле зафиксированной в станке овцы справа. При подходе барана к овце (манекену) студент немедленно должен опуститься на корточки и следить за его поведением. В момент садки барана левой рукой необходимо отвести половой член за препуций в сторону и направить в вагину. После совокупительного толчка баран соскакивает с овцы и в это время вагину отнимают и поворачивают спермоприемником вниз. Затем открывают краник, выпускают воздух, отделяют спермоприемник от вагины, накрывают крышечкой и передают в лабораторию.

Когда нет возможности или не удастся получить сперму от барана в искусственную вагину, применяют метод электроэякуляции.

Получение спермы от хряков. От хряков сперму получают в манеже пункта искусственного осеменения. В качестве манекена используют чучело свиньи. Конструкции чучел разнообразны, но все они имеют сплошную поверхность, что позволяет легко мыть и дезинфицировать ее.

Чаще используется деревянное чучело (рис. 26). По внешнему виду оно похоже на свинью и это способствует более быстрой выработке у хряков условных половых рефлексов и обеспечивает в последующем хорошее проявление их. Искусственная вагина фиксируется внутри чучела. Наружная поверхность задней части его имеет воронкообразное углубление с отверстием в центре. Оно совпадает с просветом искусственной вагины. Для обеспечения скольжения и попадания полового члена хряка в вагину углубление в стенке чучела делают гладким и скользким. Это достигается путем

нанесения на деревянную поверхность кисточкой раствора органического стекла в ацетоне или дихлорэтаноле. При получении спермы в холодном помещении внутрь чучела помещается электрическая лампочка. Включают ее в сеть в момент получения спермы. Это предотвращает снижение температуры в искусственной вагине. На спермоприемник одевают ватно-марлевый чехол.

Нередко используются чучела, представляющие собой простые лавки. На расстоянии примерно 60 см от задней части чучела размещают опоры для передних конечностей хряка. Лавку обивают мягким материалом, а сверху кожей. При получении спермы на такое чучело искусственную вагину техник держит в руке или же получает сперму мануальным способом. В помещении чучело размещается так, чтобы хряк подходил к нему сзади и с боков, но не спереди. Особое внимание обращают на высоту задней части чучела и наличие удобной для хряка поверхности пола (не скользкой, ребристой).

Для приучения хряков к садке на чучело его вначале можно обтянуть шкурой свиньи в охоте или обрызгать жидкостью с специфическим запахом, полученной из влагалища свиноматки в охоте. Приучают хряков к вагине по отдельности или группой. Для облегчения этой работы в качестве манекена можно использовать свиноматку в охоте. После садки хрячка половой член его отводят в сторону и направляют в искусственную вагину. В последующем он может быстрее сделать садку и на чучело.

Успех приучения хрячков к садке на чучело зависит от их возраста и половой потенции, а также отсутствия или наличия половых извращений. Уже в 6-месячном возрасте у хрячков проявляется половая потенция, а их половые железы вырабатывают достаточное для оплодотворения количество сперматозоидов и секретов, формирующих эякулят. С этого момента можно начать приучение их к искусственной вагине.

После садки на чучело хряк делает поисковые движения penisом, при этом все глубже и глубже вводит его в вагину. После нескольких глубоких совокупительных движений он успокаивается и начинает выделять сперму. Хвост у него в это время закручивается кверху, семенники подтягиваются ближе к анальному отверстию, мошонка становится слабо напряженной и несколько отвисшей.

После окончания эякуляции хряка удаляют из манежа, искусственную вагину вынимают из чучела, отсоединяют от нее спермоприемник и передают его в лабораторию.

Применение искусственной вагины у свиней имеет ряд особенностей. Хряки менее чувствительны, чем быки, к температуре в вагине, но для них очень важным является давление. При коитусе необходимое давление создается после введения закрученной головки penisа в спиралевидный цервикальный канал. В зависимости от состояния мышечной оболочки шейки матки давление в нем периодически изменяется. В обычной искусственной

вагине подобные условия отсутствуют. Однако предложены и такие модели приборов, в которых имеется пульсатор и суживающаяся латексная трубка с конической стальной спиралью, имитирующая шейку матки свињи.

Можно симулировать соответствующие условия путем обхватывания выдвинутого пениса пальцами руки, на которую одета теплая, смазанная латексная перчатка. Давление, создаваемое рукой, легко вызывает эякуляцию. Этот прием, названный *мануальным методом*, широко используется в ряде стран для взятия спермы. Постепенно находит применение он и в свиноводческих хозяйствах Беларуси. При этом методе после вскакивания хряка на чучело или свиноматку в охоте и первых начальных движениях полового члена осторожно кладут на него левую руку в перчатке. Когда совокупительные движения хорошо проявятся и половой член окажется выдвинутым полностью, обхватывают головку и плавным движением назад пытаются как бы распрямить естественную извитость ее. Давление усиливают и это вызывает более энергичные совокупительные движения, а вскоре начинается и эякуляция. После начала эякуляции конечную часть полового члена можно направить вниз (рис. 26). Сперму собирают в спермоприемник, подогретый до температуры 30°C. На него кладут фильтр (марлевый), чтобы отделить густую желеобразную фракцию спермы. Первые порции спермы содержат небольшие количества желатина подобного вещества, которое остается вблизи головки полового члена, и сразу же выделяется прозрачная или слегка мутноватая фракция. Ее не собирают, а собирают только последующую фракцию, которая имеет молочно-белую окраску и богата сперматозоидами. После этой основной фракции выделяется третья фракция сероватого цвета; ее также не собирают. К концу эякуляции хряк опять начинает делать совокупительные движения и выделяется при этом желеобразная фракция спермы.

Используя этот способ, можно уверенно распознать и отделить основную фракцию спермы от остальных, снизить микробную загрязненность спермы, объективно и точно оценить весь процесс эякуляции.

При получении спермы от хряков следует строго соблюдать правила гигиены. Даже при хороших условиях содержания хряки часто бывают загрязнены и при садке их на чучело поднимается много пыли. Больше всего загрязнена кожа живота и препуция. Поэтому незадолго до получения спермы хряка необходимо помыть под душем либо в специальной установке, где кожа не только смачивается, но и механически очищается щетками и затем высушивается теплым воздухом.

Получение спермы от жеребца. Сперму от жеребца получают на открытой ровной площадке среди двора или под навесом. В холодную дождливую погоду получать сперму целесообразно в закрытом помещении (манеже) с высоким потолком. Получают сперму на кобылу в охоте. Тазовые конечности ее фиксируют случной шлеей, хвост забинтовывают.

После подготовки кобылы двое студентов (или конюх и студент) выводят жеребца на поводьях. Спокойных жеребцов может выводить один человек. Как только у производителя хорошо проявится эрекция (пенис приподнимается к брюху) его сразу же пускают на кобылу. Техник по взятию спермы (преподаватель и помощник - студент) находится с правой стороны кобылы, в нескольких шагах; вагину удерживает в правой руке. Один из помощников его находится с другой стороны и во время садки жеребца должен быстро отвести хвост кобылы в сторону и постоянно удерживать его. Техник в момент начала садки приближается быстро к животным, искусственную вагину прижимает к крупу кобылы, а левой рукой берется за половой член жеребца вблизи головки (ладонь руки обращена вниз) и направляет его в вагину. Касание рукой полового члена не тормозит половых рефлексов у жеребцов. Не следует только дотрагиваться до головки пениса. Как только половой член производителя попадет в искусственную вагину, ее необходимо прижать обеими руками к крупу кобылы (рис. 27). При этом левая рука фиксирует скобу корпуса, а правая располагается сверху спермоприемника; угол наклона вагины спермоприемником вверх 30-35°. При получении спермы от крупных жеребцов технику помогает удерживать вагину помощник. Жеребец делает мощные совокупительные движения и чтобы вагина не отходила вперед, необходимо особый упор делать на спермоприемник. Эякуляция быстрее проявится, если головка пениса будет достигать суженной части горловины. Здесь возникает необходимое для выделения спермы давление.

Во время совокупительных движений необходимо следить за состоянием резиновой камеры вагины. Если возникает опасность срыва ее с цилиндра или нарушения целостности, то немедленно ослабляют пробку патрубка и выпускают немного воздуха; затем опять пробку плотно закручивают. При разрыве камеры воздух и вода выходят из цилиндра и жеребец немедленно прекращает садку.

Садка у лошадей продолжается 1-1,5 минуты, эякуляция происходит в течение 10-20 секунд. Об эякуляции можно судить по ритмичному сокращению мускулатуры корня хвоста, вследствие чего он поднимается и опускается, а также путем ощущения продвижения спермы по мочеполовому каналу вблизи мошонки. Совокупительные движения во время выделения спермы прекращаются.

В конце эякуляции жеребец медленно опускается ("сползает") с кобылы. Вместе с ним опускают искусственную вагину спермоприемником вниз, а затем медленно и осторожно, чтобы не потерять часть эякулята, снимают с полового члена. Следует учитывать, что головка пениса в это время сильно увеличена и грубое и быстрое снятие вагины может причинить боль производителю.

Если садка по какой-то причине не получилась, то жеребцу делают проводку в течение нескольких минут и затем опять подводят к кобыле.

Режим получения спермы от производителей. От быка обычно получают по два эякулята в день с промежутком в 5-15 минут; интервалы между взятием спермы - 3-4 дня или более в зависимости от половой потенции производителя. При получении трех эякулятов в день промежутки между взятием составляют 4-5 дней (3 раза за две недели).

От взрослых баранов сперму получают во время случного сезона ежедневно или через день по 2-3 эякулята (2 эякулята утром с промежутком в 5-10 минут и 1 (иногда 2 эякулята) вечером; молодых производителей используют реже (1-2 эякулята в день). От козла сперму берут 2-3 раза в неделю.

У хряка получают один эякулят через 3-4 дня.

У жеребца сперму получают обычно во время случного сезона по одному эякуляту 5-6 дней подряд с предоставлением в последующем одного-двух дней отдыха.

ОЦЕНКА КАЧЕСТВА СПЕРМЫ

Цель занятий: изучение методов оценки качества спермы и приобретение студентами навыков применения их на практике.

Методические указания. Занятия проводят в клинике и лаборатории кафедры или в учебном пункте. Сначала преподаватель знакомит студентов с существующими методами оценки качества спермы, выделяя из них те, которые используются для оценки каждого эякулята (*обязательные*), и другие методы (*дополнительные*), позволяющие всесторонне оценить сперму; дополнительные методы используются периодически.

К обязательным методам относят:

*оценку внешних свойств спермы,
оценку спермы по густоте и подвижности сперматозоидов,
определение концентрации сперматозоидов в сперме.*

Дополнительные способы включают:

*определение процента живых сперматозоидов путем дифференциальной окраски;
определение процента морфологически ненормальных сперматозоидов;
определение метаболической активности сперматозоидов (по скорости обесцвечивания метиленовой синьки, индексу фруктолиза, показателю рН и др.);
определение абсолютного показателя живучести сперматозоидов и другие.*

Целесообразно занятия (два или три по 2-4 часа) по оценке качества спермы сочетать с получением спермы от различных производителей. При этом учитывается место и условия проведения занятия и др. Если имеется возможность в клинике кафедры получать сперму от самцов всех видов сельскохозяйственных животных, то обязательные методы следует применить каждый раз, а дополнительные изучать поочередно. Целесообразно провести отдельное занятие по освоению методов оценки сохраняемой спермы, обратив особое внимание на оценку по подвижности и частоте повреждений акросомы сперматозоидов.

Вопросы для контроля полноты усвоения знания и понимания значения методов оценки качества спермы для прогнозирования оплодотворяющей способности ее и плодовитости производителя:

1. В какие сроки должна быть проведена оценка полученной спермы? При какой температуре хранят ее до разбавления?

2. От чего зависят внешние свойства спермы - цвет и консистенция? Каковы характерные цвет и консистенция спермы хорошего качества у различных производителей?

3. Чем может быть загрязнена сперма? Что делают со спермой загрязненной или с измененными цветом, консистенцией?

4. Можно ли ограничиться оценкой внешних свойств спермы?

5. Как влияет понижение температуры на подвижность сперматозоидов в свежеполученной сперме? При какой температуре следует определять их подвижность?

6. Влияют ли толщина мазка и процент подвижных сперматозоидов на результаты оценки спермы при микроскопическом исследовании? Как оценивают подвижность сперматозоидов в различных странах?

7. С какой целью определяют концентрацию сперматозоидов в сперме?

8. Какой метод наиболее часто используется для определения концентрации сперматозоидов? Какие факторы влияют на этот показатель?

9. Какие наиболее типичные отклонения в морфологии сперматозоидов встречаются? Как их классифицируют?

10. Какие факторы могут вызвать появление в сперме повышенного числа ненормальных сперматозоидов?

11. Какие аномалии сперматозоидов обусловлены генетически и какие связаны с факторами внешней среды? Какие аномалии наиболее сильно влияют на плодовитость производителя?

12. Какие тесты можно использовать для оценки интенсивности метаболических процессов в сперме? Их сущность?

13. Существует ли корреляционная связь между концентрацией сперматозоидов в сперме и индексом фруктолиза, величиной рН, скоростью обесцвечивания метиленовой сини?

14. Как изменяется рН свежеполученной спермы при хранении при комнатной температуре?

15. Каковы стандартные показатели качества спермы быков, баранов, хряков и жеребцов с нормальной воспроизводительной способностью?

16. Какие показатели качества спермы подвержены наибольшему изменению?

17. Возможно ли улучшение качества спермы после ее получения?

18. Какие методы оценки качества спермы позволяют наиболее объективно и точно прогнозировать ее оплодотворяющую способность?

19. Результаты какой оценки спермы: до замораживания (охлаждения) или после оттаивания более важны при искусственном осеменении?

20. Как определить состояние акросом у подвижных сперматозоидов? Сохраняют ли сперматозоиды способность к оплодотворению при повреждении акросомы?

21. Какие факторы влияют на результаты оценки качества спермы?

22. Почему необходимо постоянно регистрировать показатели качества эякулятов у одного и того же производителя?

На первом занятии (4 часа) после ознакомления студентов с обязательными методами оценки качества спермы, а также правилами работы с микроскопом, осветительными приборами и обогревательными столиками, ФЭК или спектрофотометром, преподаватель намечает последовательность работ и поручает каждому студенту выполнить определенную работу (подготовка вагины; подготовка, привод и фиксация производителя и манекена; получение спермы). Получив сперму от быка (барана, жеребца, хряка), студенты осматривают эякулят и измеряют его объем. Затем распределившись на небольшие группы (по 2-3 человека) готовят мазки и счетные камеры и оценивают сперму по густоте и подвижности, определяют в ней концентрацию сперматозоидов путем прямого подсчета, а в заключение под контролем преподавателя определяют этот показатель с помощью оптического прибора.

Оценка внешних свойств спермы.

Объекты исследования, материалы и оборудование: животные - бык, корова (чучело) или самец и самка другого вида; оборудование, материалы и инструменты для получения спермы (соответствующего вида животных), стерильные марлевые салфетки; лабораторные весы, смесители для спермы, мерные цилиндры на 100, 250 и 500 мл, стерильные градуированные пипетки на 2 и 10 мл.

Оценка внешних свойств свежеполученной спермы проводится по следующим критериям: цвету, консистенции, запаху и объему эякулята.

Таблица 4.

Объем эякулята самцов сельскохозяйственных животных

Производитель	Объем эякулята, мл		
	минимальный	средний	максимальный
Баран	0,6	1	2
Бык	2	4—6	10
Жеребец	20	70—75	300

Хряк	100	200—250	500
------	-----	---------	-----

Цвет спермы зависит от вида животных и содержания в ней сперматозоидов: чем больше содержится их в сперме, тем более белый цвет ее. Сперма барана белого цвета с желтоватым оттенком, быка - белого или желтоватого, а жеребца и хряка - серовато-белого цвета. При наличии примесей крови сперма приобретает буроватый или розовый цвет; примеси хлопьев или сгустков гноя придают сперме синевато-зеленоватый, а мочи - желтоватый цвет.

Запах нормальная сперма сельскохозяйственных животных не имеет. Гнилостный или другой запах в ней может быть результатом воспалительного процесса в половых путях.

Изменение цвета спермы или появление в ней запаха дает основание для выбраковки эякулята.

Консистенция, как и цвет спермы, зависит от концентрации сперматозоидов. Чем больше содержится в ней половых клеток, тем более вязкая консистенция. Сперма барана имеет консистенцию сливок, быка - редких сливок или густого молока, а сперма жеребца и хряка - водянистая.

Объем эякулята быка определяют сразу же после получения путем взвешивания отделенной герметизированной части полиэтиленового спермоприемника. Взвешивают на точных весах (типа ВЛК-20, ВЛК-500, Р-2-200 или др.); масса 1 г спермы принимается за 1 мл, при этом вычитается масса самого спермоприемника. В Европейской модели вагины объем эякулята определяют по шкале градуированного спермоприемника. При получении спермы в стеклянный двустенный спермоприемник, ее предварительно разбавляют 1:1 (добавляют 5 мл среды) и затем переливают в специальный градуированный смеситель и определяют объем.

Объем эякулята барана измеряют с помощью градуированной пипетки на 2 мл или определяют по меткам одно-стенного спермоприемника. Объем спермы жеребца и хряка определяют в градуированных мензурках или цилиндрах после процеживания через трехслойный марлевый фильтр.

При измерении объема эякулята мерная посуда должна быть сухой, стерильной и подогретой до температуры свежеполученной спермы.

Оценка спермы по густоте и подвижности сперматозоидов

Объекты исследования, материалы и оборудование: животные - бык, корова (чучело) или самец и самка другого вида; оборудование, материалы и инструменты для получения спермы (соответствующего вида животных); термостат для микроскопа; микроскопы МБР (МБИ-1, МБИ-3, МБИ-4 или БИОЛАМ) с осветителями ОИ-35 либо МКИ-11, микроскоп МБИ-11 (МБИ-14) с телевизионной камерой; конденсор светлого и темного поля марки ОИ-10 производства ЛОМО или фазово-контрастный микроскоп; обогревательные столики; дозаторы пипеточные и наконечники к ним, пипетки глазные, палочки стеклянные; предметные и покровные стекла; марлевые салфетки; система автоматического компьютерного анализа спермы.

Эта оценка производится путем просматривания спермы под микроскопом при увеличении 100-250х (в зависимости от типа микроскопа и набора объективов и окуляров). На чистое подогретое предметное стекло стерильной стеклянной палочкой или глазной пипеткой наносят маленькую каплю спермы и накрывают ее покровным стеклом. Желательно, чтобы каждый раз величина капельки была одинаковой, так как от этого в значительной мере зависит объективность и точность оценки. Это условие в полной мере можно выдержать при использовании дозатора пипеточного регулируемого или калиброванного на 0,03 мл. К дозатору прилагается 20-30 полиэтиленовых наконечников. Готовят их заранее: моют путем погружения в теплый раствор натрия гидрокарбоната, затем тщательно промывают проточной и дистиллированной водой; обеззараживают путем погружения в этиловый спирт или выдержки под бактерицидной лампой.

Чтобы капля равномерно растеклась под покровным стеклышком (без пузырьков воздуха) и не выходила за его края, поступают следующим образом. Держа двумя пальцами за грани (ребрышки) покровное стеклышко, касаются одной его гранью предметного стекла возле края капли под углом 45-50°. Когда капля расплывется по всей ширине стеклышка, медленно опускают его. Покровное стеклышко должно быть тщательно вытерто. Протирают его марлевой салфеткой между большим и указательным пальцами, поворачивая за ребрышки пальцами другой руки.

Исследуют сперму при температуре 38-40°C (в организациях по искусственному осеменению в США - при 35-37°C с помощью фазово-контрастного микроскопа). Для создания требуемой температуры используют специальный термостат или обогревательный столик (конструкции Морозова или Пакенаса) с автоматическим регулированием температуры. Обогревательный столик помещают на предметный столик микроскопа. При помощи макро винта приближают объектив (увеличение 80-120х) к предметному столику микроскопа на расстояние 4-5 мм и устанавливают необходимое освещение. Обычно пользуются электрическим осветителем ОИ-35 либо МКИ-11, а при отсутствии осветителя - осветительным зеркалом. В таких случаях микроскоп необходимо расположить напротив хорошего источника света (окно помещения, лампа дневного света и т. д.). Равномерность и сила освещения достигается за счет приподнимания или опускания конденсора микроскопа и прикрытия диафрагмы. Для улучшения видимости сперматозоидов желательно использовать конденсор темного поля ОИ-10; в поле зрения будут отчетливо просматриваться ярко светящиеся контуры половых клеток на темном фоне.

После подготовки микроскопа готовят мазок и помещают его на обогревательный столик. Глядя в окуляр, при помощи макро винта медленно приподнимают тубус до появления изображения в поле зрения. Вращая затем микро винтом в ту или другую сторону добиваются четкого изображения.

Густота спермы определяется по количеству сперматозоидов, наблюдаемых в поле зрения микроскопа. Такая оценка проводится с целью получения предварительных данных о содержании половых клеток в сперме и о необходимости дальнейшей оценки ее. Наиболее хорошо разработана для спермы быка и барана. Имеет самостоятельное значение лишь в том случае, когда по какой-либо причине не определяют концентрацию сперматозоидов. Классифицируют сперму как густую, среднюю и редкую.

Густая сперма - все поле зрения заполнено сперматозоидами без промежутков между ними; обозначается буквой **Г**.

Средняя сперма - промежутки между сперматозоидами имеются, но они не превышают размеров сперматозоида; обозначается буквой **С**.

Редкая сперма - промежутки между сперматозоидами превышают их размеры; обозначается буквой **Р** (рис. 28).

Олигоспермия - в поле зрения имеются единичные сперматозоиды; обозначается буквой **О**. *Аспермия* - в поле зрения сперматозоиды отсутствуют; обозначается буквой **А**.

Таблица 5.

Зависимость густоты спермы от концентрации сперматозоидов

Производитель	Концентрация сперматозоидов в сперме, млрд. в мл		
	в густой	в средней	в редкой
Баран	≥ 2	1—2	≤ 1
Бык	≥ 1	0,8—1	≤ 0,8
Жеребец	≥ 0,25	0,15—0,25	≤ 0,15
Хряк	≥ 0,2	0,1—0,2	≤ 0,1

К использованию допускается сперма быка, жеребца и хряка с оценкой густая и средняя, сперма барана - только густая.

Одновременно с определением густоты спермы проводят и оценку ее по подвижности (активности) сперматозоидов. Различают три вида движения сперматозоидов: прямолинейно-поступательное, маневренное и колебательное. Нормальным для сперматозоидов движением является *прямолинейно-поступательное*. Сперматозоиды с *маневренным, колебательным* движением или *неподвижные* неспособны к оплодотворению.

Подвижность сперматозоидов оценивают по 10-балльной шкале. Если около 90% сперматозоидов движутся прямолинейно поступательно, то такой сперме ставится оценка 9 баллов, если 80% - 8 баллов и т.д. *Некроспермия* - все сперматозоиды в поле зрения неподвижны; обозначается буквой **Н**. Свежеполученная сперма допускается к использованию по подвижности, если она оценена не ниже 8 баллов у барана, не ниже 7 баллов - у быка и хряка и не ниже 6 баллов - у жеребца. Результат оценки по густоте и подвижности сперматозоидов обозначается двумя знаками, например Г-9, С-9, Р-7 и т.д.

В ряде стран (США и др.) допускается использование спермы, в которой не менее 50% клеток обладают поступательным движением. При оцен-

ке по подвижности большое внимание уделяется характеру движения половых клеток, а также образованию в мазке из свежеполученной спермы вихрей и завихрений и их силе. В густой сперме энергично двигающиеся в одном направлении сперматозоиды образуют своеобразные потоки ("струи"). Когда такие струи сталкиваются, в поле зрения возникают темные завихрения, которые быстро исчезают.

В 5 баллов оценивается сперма, если в мазке сперматозоиды проявляют очень быстрое и энергичное поступательное движение, за счет которого чрезвычайно быстро возникают вихреобразное движение и небольшие завихрения, постоянно изменяющиеся в поле зрения.

4 балла - быстрое поступательное движение сперматозоидов и внезапное формирование вихреобразного движения и завихрений в просматриваемом мазке.

3 балла - устойчивое, средней силы поступательное движение сперматозоидов; вихревое движение и небольшие завихрения продвигаются более медленно через поле зрения.

2 балла - слабое поступательное движение, отмечаются остановки и возобновление движения сперматозоидов. Вихреобразное движение и завихрения отсутствуют.

1 балл - слабое волнообразное или колебательное движение сперматозоидов.

0 баллов - отсутствие в мазке подвижных сперматозоидов.

Для предприятий по искусственному осеменению Республики Беларусь инструкцией (1998 г.) рекомендуется при оценке спермы быка по подвижности не сразу выбраковывать густые эякуляты, в которых сперматозоиды проявляют слабое движение. Возможно, что в момент эякуляции половые клетки не успевают полностью выйти из состояния анабиоза. Поэтому капельку такой спермы необходимо разбавить одной-двумя каплями натрия цитрата, подогретого до 38-40°C, затем провести оценку в нескольких полях зрения и сделать окончательное заключение о пригодности спермы к использованию.

В крупных центрах по искусственному осеменению ряда стран используют современное оборудование, позволяющее определять концентрацию и подвижность сперматозоидов (включая прямолинейное поступательное и маневренное движение), а также морфологию их. Имеется уже три поколения систем автоматического компьютерного анализа спермы. В системах первого и второго поколения не дифференцируются клеточные фрагменты от неподвижных сперматозоидов. Поэтому необходимо проводить раствор через мембранные фильтры 0,2 м. Системы третьего поколения анализируют каждый объект (клетку) до хвоста и если не обнаруживают его, то не включают в общее количество. Использование этих систем позволяет повысить точность оценки качества спермы и ее оплодотворяющую способность.

Определение концентрации сперматозоидов в сперме.

Объекты исследования, материалы и оборудование: животные - бык, корова (чучело) или самец и самка другого вида; оборудование, материалы и инструменты для получения спермы (соответствующего вида животных); микроскопы МБР (МБИ-1, МБИ-3, МБИ-4 или БИОЛАМ) с осветителями ОИ-35 либо МКИ-11, микроскоп МБИ-11 или БИОЛАМ-М с телевизионной камерой; камеры Горяева, лейкоцитарный и эритроцитарный меланжеры (смесители); марлевые салфетки; спектрофотометр или фотоэлектрический колориметр; дозаторы пипеточные, градуированные микропипетки на 0,1 мл и пипетки на 1, 2, 5 и 10

мл; система автоматического компьютерного анализа спермы; 96%-ный этиловый спирт, эфир, дистиллированная вода, 3%-ный раствор натрия хлорида; шары Ричардсона или резиновый баллон (для продувания смесителей).

Концентрацию сперматозоидов определяют:

- путем подсчета в счетной камере,
- с помощью спектрофотометра (фотоэлектрического колориметра),
- с помощью специальных электронных счетчиков.

Определение концентрации сперматозоидов с помощью счетной камеры.

Счетная камера Горяева (рис. 29) представляет собой пластинку из толстого стекла. Поделена желобами на поля: центральное и два опорных. Центральное поле разделено средним поперечным желобом на две части; это поле на 0,1 мм ниже опорных полей и на каждой половине его выгравирована сетка. При помещении на опорные поля покровного стекла над сетками образуется пространство высотой 0,1 мм; оно закрыто только с двух сторон, а с двух других сторон остаются широкие щелевидные отверстия, через которые заполняют спермой камеру. Чтобы шлифованное покровное стекло прочно держалось, его помещают на чистую и обезжиренную спиртом камеру и, прижимая пальцами к опорным полям, притирают до появления радужных колец (рис. 30).

На сетки камеры помещается сперма, разбавленная 3%-ным раствором натрия хлорида (или дистиллированной водой). Разбавление производят в смесителях (меланжерах). Сперму барана разбавляют в 200, быка - в 100 раз. Для этого в эритроцитарный смеситель (с красной бусинкой) набирают сперму соответственно до метки 0,5 и 1,0, а раствор (воду) - до метки 101. Сперму жеребца и хряка разбавляют в 20 раз, набирая ее в лейкоцитарный смеситель (с белой бусинкой) до метки 0,5, а раствор (воду) до метки 11.

Смесители должны быть чистыми и сухими. Поэтому после использования их промывают многократно дистиллированной водой, а затем 96%-ным спиртом и эфиром (1:1) и высушивают путем продувания воздуха резиновым баллоном или шарами Ричардсона. Для удобства в работе на каждый смеситель одевают резиновую трубку (15-20 см) с кусочком зашлифованной стеклянной трубки.

Перед использованием кончик пипетки смесителя обеззараживают спиртовым тампоном. Обеззараженную часть пипетки слегка погружают в сперму, берут в рот кончик резиновой трубки (отрезок стеклянной трубки) и осторожно набирают сперму до нужной метки. Кончик пипетки вытирают ватой, одновременно подравнивая столбик спермы до метки, затем быстро погружают в раствор натрия хлорида и насыщают его до метки 101 (11). После этого зажимают кончик пипетки меланжера большим пальцем левой руки, быстро перегибают резиновую трубку возле другого конца меланжера,

а затем и на кончике пипетки, постепенно освобождая его от пальца. Кончик резиновой трубки фиксируют на меланжере. Зажав концы смесителя между мизинцем и большим пальцем быстрыми движениями кисти руки смешивают сперму с раствором (водой) в течение 2-3 минут.

После перемешивания немедленно производят зарядку камеры. При этом первые 3-4 капли из смесителя сливают отдельно. Последующую каплю на кончике смесителя подносят к центральному полю и касаются ею щелевидного отверстия у края покровного стекла. Капля быстро заполняет пространство между центральным полем с сеткой и покровным стеклом; пузырьков воздуха не должно быть над сеткой. Если часть капли останется у края покровного стеклышка, ее необходимо осторожно снять комочком сухой ваты. Другую сетку можно заполнить другим образцом спермы.

Камеру помещают на предметный столик микроскопа (*строго горизонтальное расположение!*), устанавливают увеличение 200х, подбирают необходимое освещение и осторожно наводят микроскоп. Сперматозоидов подсчитывают в пяти больших квадратах сетки (по диагонали), каждый из которых поделен на 16 малых квадратов.

Концентрацию сперматозоидов вычисляют по формуле:

$$C = \frac{N \cdot D \cdot 4000 \cdot 1000}{n},$$

где С — концентрация (количество) сперматозоидов в 1 мл (см³),

N — количество подсчитанных сперматозоидов,

D — степень разбавления спермы раствором (водой),

4000 - коэффициент перевода в объем (малый квадрат имеет объем 1/4000 мм³),

1000 - количество мм³ в 1 см³,

n — количество малых квадратов, в которых производился подсчет (80).

Удобнее пользоваться упрощенными формулами, которые получены из приведенной выше:

а) формула для расчета концентрации спермы барана

$$C = N/200;$$

б) формула для расчета концентрации спермы быка

$$C = N/100;$$

в) формула для расчета концентрации спермы жеребца и хряка

$$C = N/1000,$$

где С — концентрация сперматозоидов в сперме, млрд./мл;

N — количество сперматозоидов, подсчитанных в пяти больших (80 малых) квадратах.

Электрофотометрический метод

Этот метод базируется на зависимости мутности или оптической плотности спермы от содержания сперматозоидов. Оптическая плотность различных образцов спермы при стандартном разбавлении повышается

прямо пропорционально концентрации половых клеток. Точно определить оптическую плотность можно с помощью спектрофотометра (фотоэлектрического колориметра, эритрогеметра и др.).

Из свежеполученного эякулята отбирают пробу спермы и разбавляют 2,9%-ным раствором натрия цитрата. Сперму быка разбавляют в 100 раз; в зависимости от типа прибора и объема кюветы берут 0,05 или 0,1 мл спермы и соответственно 5 или 10 мл натрия цитрата. Сперму барана разбавляют в 400 раз; для этого берут 0,025 мл спермы и 10 мл натрия цитрата. Сперму хряка разбавляют в 30 раз, используя 0,4 мл спермы и 12 мл натрия цитрата. Разбавление производят во флаконе емкостью 10-20 мл. Необходимо до получения спермы приготовить столько флаконов, сколько планируется получить эякулятов, и в них заранее внести раствор натрия цитрата.

При взятии проб спермы необходимо стремиться к высокой точности. Отбирать пробы следует только микропипетками или дозаторами пипеточными из середины свежеполученных эякулятов, не допуская попадания в них пены или вазелина. Перед внесением пробы спермы в раствор микропипетку (наконечник дозатора) следует вытереть снаружи чистой марлевой салфеткой для удаления излишней спермы. Температура 2,9%-ного раствора натрия цитрата должна быть в пределах +20-25°C.

Для исследования необходимы две кюветы (для фотоэлектрических колориметров - с рабочей длиной 10 мм). Одну из них наполняют до метки разбавленной спермой, вторую - раствором натрия цитрата. Кюветы ставят в кюветодержатель прибора. Сначала располагают на пути пучка света (с длиной волны около 550-нанометров, красный светофильтр) кювету с раствором натрия цитрата (без спермы). Стрелка гальванометра при этом смещается. Ручками грубой и тонкой настройки ее устанавливают на "0" (рис. 31). Затем перемещают кюветодержатель, располагая на пути пучка света кювету с разбавленной спермой. В результате стрелка гальванометра укажет величину, соответствующую оптической плотности спермы.

Для определения концентрации сперматозоидов в сперме по величине оптической плотности необходимо прокалибровать шкалу прибора, т. е. установить, какой концентрации соответствует одно деление шкалы. Для этого необходимо определить концентрацию сперматозоидов в 12-15 эякулятах путем подсчета в счетной камере и одновременно исследовать эти эякуляты с помощью прибора. Подсчет сперматозоидов в каждом образце спермы в камере должен проводиться четырехкратно; для этого заправляют два мелянжера и из каждого из них - две сетки камеры. Из четырех подсчетов (они не должны отличаться более чем на 10%) берется среднеарифметический результат. Отобранные для построения калибровочной кривой эякуляты должны быть различной концентрации - от редких до самых густых.

Определив оптическую плотность спермы с помощью прибора и концентрацию сперматозоидов в счетной камере в исследуемых эякулятах, строят калибровочную кривую. Для этого откладывают в определенном

масштабе на миллиметровой бумаге по оси абсцисс показатели концентрации сперматозоидов 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 млрд./мл и т. д., а по оси ординат - величины оптической плотности - 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 и т. д. На пересечениях перпендикуляров с оси абсцисс и оси ординат ставят точки в соответствии с полученными данными. Затем проводят калибровочную кривую так, чтобы она охватила большинство точек (рис.31).

Калибровочную кривую следует выводить для каждого прибора в отдельности и время от времени ее проверять. При исследовании большого числа образцов можно пользоваться коэффициентами-множителями (это возможно при прямолинейной зависимости концентрации и оптической плотности). Для этого необходимо сделать регрессионный анализ полученных данных и определить коэффициент регрессии для двух показателей: концентрации и оптической плотности. Зная величину концентрации сперматозоидов для одного деления шкалы прибора (коэффициент), можно легко определить концентрацию сперматозоидов в неразбавленной сперме. Для этого необходимо перемножить оптическую плотность на коэффициент.

Наиболее точно определить концентрацию сперматозоидов в сперме можно с помощью специальных электронных счетчиков. В этих приборах разбавленная сперма пропускается через капилляр так, что между электродами проходит только один сперматозоид. Головка его вызывает резкое увеличение сопротивления и это регистрируется счетчиком.

Такие счетчики необходимы и при оценке качества разбавленной спермы путем *фильтрации* через сфадекс гель/стекловату. Приготовленный сфадекс гель укладывается поверх пробки из стекловаты на дно пластикового шприца, используемого в качестве фильтрационной колонки. Фильтр колонки промывается буфером и в нее вносится небольшое количество спермы. Затем система промывается большим количеством буфера и в фильтрате подсчитывается число сперматозоидов. Мертвые или поврежденные клетки, а также отдельные формы абнормальных клеток остаются в фильтрационной колонке, тогда как живые проходят через нее. Считают, что целостность мембраны и поверхности сперматозоидов определяет возможность продвижения их через такую систему. Отмечена высокая степень зависимости оплодотворяющей способности спермы от соотношения живых и мертвых сперматозоидов.

В сохраняемой сперме можно определить количество сперматозоидов (в единице объема или дозе) по *содержанию ДНК*. Для определения ее необходим буфер, специальный краситель и флуорометр. В каждом сперматозоиде содержится 3,3 пкг ДНК.

Дифференциальная окраска живых и мертвых сперматозоидов.

Объекты исследования, материалы и оборудование: свежеполученная сперма; микроскопы МБР (МБИ или БИОЛАМ) с осветителями, МБИ-11 или МБИ-14 с телевизионной камерой; дозаторы пипеточные и наконечники к ним, пипетки глазные, палочки стеклянные, петля платиновая; предметные стекла, стекла с шлифованными краями; ванночки; фильтровальная бумага, марлевые салфетки; красители: эозин, берлинская лазурь; соли KH_2PO_4 и Na_2HPO_4 для приготовления фосфатного буфера; дистиллированная вода, смесь спирта этилового с эфиром (1:1); обогревательный столик, устройство для сушки мазков (электрофен бытовой).

Этот метод, предложенный В.А. Морозовым в 1938 г., основан на свойстве эозина проникать через мембрану мертвых сперматозоидов и окрашивать их; мембрана живых клеток не пропускает краску и они остаются не окрашенными. Использование других красителей в сочетании с эозином,

может повышать точность метода за счет создания фона, на котором лучше просматриваются окрашенные и неокрашенные сперматозоиды.

На край обезжиренного предметного стекла наносят дозатором пипеточным (стеклянной палочкой, глазной пипеткой) маленькую капельку свежеполученной спермы и рядом с ней - капельку 5%-ного водного раствора эозина. Обе капельки быстро смешивают стеклянной палочкой (уголком шлифованного стекла) и делают тонкий мазок. Для этого прижимают торцевую грань шлифованное стеклышко к предметному стеклу и подводят его под углом 35-40° к капле так, чтобы она растеклась сзади него на всю ширину грани. Придерживая в наклонном положении шлифованное стеклышко большим и указательным пальцами, быстро, но плавно тянут каплю вдоль предметного стекла к другому краю; при этом капля равномерно размывается сзади стеклышка. Ровным получится мазок, если указательный палец, фиксирующий шлифованное стеклышко, опустить несколько ниже грани предметного стекла и двигать по ней. Важно, чтобы мазок был тонким (заканчивался на расстоянии 0,5-1 см от края предметного стекла); в таких случаях он быстро высохнет. Чтобы ускорить высыхание, его следует положить на подогретые обогревательный столик или пластину (45-55°) и обдувать потоком теплого воздуха (можно использовать электрофен бытовой).

Высушенный мазок просматривают под микроскопом при увеличении 900х (иммерсионный объектив); увеличение 300-400х менее подходящее для этого метода. Подсчитывают минимум 100 сперматозоидов. К окрашенным (*мертвым*) клеткам относят тех, у которых окрашена полностью головка или задняя часть ее. После подсчета выводят процент неокрашенных (*живых*) клеток.

Зарубежные организации по искусственному осеменению используют следующий рецепт красителя. Растворяют 1 г эозина синеватого (спирт- или водо-растворимого, 88% содержание краски) и 4 г берлинской лазури (анилин голубой водо-растворимый) в 100 мл М/8 фосфатного буфера. Для приготовления буфера растворяют 1,702 г KH_2PO_4 в 100 мл дистиллированной воды и 1,776 г безводного Na_2HPO_4 в 100 мл дистиллированной воды. Смешивают 28,5 мл раствора KH_2PO_4 и 71,5 мл раствора Na_2HPO_4 . Краситель растворяют в буфере и прогревают в водяной бане при 85°С в течение 10 мин. Финальный показатель рН красителя должен быть 6,6. Хранить буфер можно в холодильнике при 5°С.

Для приготовления мазков берут дозатором пипеточным или градуированной пипеткой 0,03 мл красителя, подогретого до комнатной температуры, и капельку спермы. Смешивают платиновой петлей (толщина проволоки 1-3 мм) или тоненькой стеклянной палочкой и делают мазок. Процедура приготовления мазка (после смешивания спермы с красителем) до помещения его на теплую пластину не должна превышать 15 с., а высыхание - более 30 секунд. Высушенный мазок просматривают под микроскопом при увеличении 900х.

На результаты дифференциальной окраски сперматозоидов оказывают влияние рН смеси, концентрация применяемых красителей и время, за которое может произойти окрашивание клеток. Поэтому следует постоянно выдерживать условия приготовления мазков, а также одинаковый рецепт раствора красителя.

Определение процента патологических (морфологически ненормальных) сперматозоидов.

Объекты исследования, материалы и оборудование: свежеполученная сперма; микроскопы МБР (МБИ или БИОЛАМ) с осветителями, МБИ-11 или МБИ-14 с телевизионной камерой; конденсор светлого и темного поля марки ОИ-10 производства ЛОМО или фазово-контрастный микроскоп; дозаторы пипеточные и наконечники к ним, пипетки глазные, палочки стеклянные; предметные стекла, стекла с шлифованными краями, пробирки, ванночки; фильтровальная бумага; красители: эозин, берлинская лазурь, кристаллвиолет, анилин, основной фуксин; карболовая кислота, спирт этиловый; калий хлорид, натрий фтористый, K_2HPO_4 и Na_2HPO_4 для приготовления фосфатного буфера; 2,9%-ный раствор натрия цитрата, дистиллированная вода, смесь спирта этилового с эфиром (1:1), марлевые салфетки; термостат, обогревательный столик, устройство для сушки мазков (электрофен бытовой).

Для сперматозоидов каждого вида животных характерна своя структура и величина; не исключены и некоторые индивидуальные особенности. Появление в эякуляте значительного числа клеток с явными отклонениями в их структуре (*тератоспермия*) сопровождается понижением плодовитости производителя. Это может быть обусловлено тем, что продвижение ненормальных сперматозоидов в половом тракте самки к месту оплодотворения нарушено и не накапливается там необходимое число половых клеток (в половом тракте есть места, которые не пропускают ненормальных сперматозоидов), или же с неспособностью таких клеток вызвать оплодотворение и последующее развитие зародыша.

Ненормальности головки имеют большее значение, чем ненормальности в области хвоста. В связи с этим классифицируют ненормальности сперматозоидов как: первичные (главные), вторичные и третичные. *Первичные* связаны с головкой или акросомой клетки, *вторичные* - с наличием цитоплазматической капельки в средней части хвоста и *третичные* - с другими дефектами хвоста.

В предприятиях по искусственному осеменению необходимо периодически (один-два раза в год) тщательно просматривать образцы спермы от каждого производителя и при выявлении повышенного числа ненормальных клеток внимательно обследовать животное.

При наличии фазово-контрастного микроскопа или конденсора ОИ-10 готовят сырой неокрашенный мазок. На обезжиренное предметное стекло наносят капельку спермы и капельку 0,35 М раствора калия хлорида или 40,0 мМ натрия фтористого, приготовленных на 2,9%-ном растворе натрия цитрата. После смешивания делают тонкий мазок. Просматривают с использованием иммерсионного объектива 100 клеток. Можно исследовать свежеполученную и оттаянную сперму.

Более надежно исследование производить в окрашенных сухих мазках. Самый простой способ - это использование мазка, окрашенного смесью эозина и анилина голубого при определении процента живых и мертвых сперматозоидов. Однако, можно готовить и окрашивать мазок непосредственно для определения патологических форм сперматозоидов.

При приготовлении мазка следует предотвратить температурный шок, в результате которого хвостики сперматозоидов закручиваются и невозможно отличить такие клетки от тех, которые образовались в семенниках. Попадание воды (например, влажное предметное стекло) также вызывает этот артефакт. Свежеполученные сперматозоиды легко разламываются в области шейки, что приводит к увеличению процента бесхвостых головок. Чтобы предотвратить такую опасность, можно до исследования сперму выдерживать при комнатной температуре; сохраняемые сперматозоиды менее чувствительны к разломам.

Перед приготовлением мазка сперму разбавляют изотоническим раствором натрия хлорида или натрия цитрата. В пробирку вносят 1 мл раствора и добавляют одну каплю спермы быка. Степень разбавления спермы барана должна быть большей, а спермы хряка и жеребца - меньшей. Температура раствора и спермы перед смешиванием должна быть одинаковой. Смешивание проводят осторожно, путем легкого постукивания пальцем по нижнему концу пробирки. Каплю приготовленной смеси помещают на обезжиренное предметное стекло и делают мазок.

Если сперма хранилась несколько часов, то можно нанесенную на предметное стекло каплю спермы накрыть вторым таким же стеклом и плавно и ровно протянуть его по первому. Мазки высушивают при температуре 36-37°C в термостате, а затем фиксируют на пламени или погружением на 1-2 минуты в стаканчик с 96%-ным этиловым спиртом. После фиксации производят окрашивание. Используют различные красители. Хорошие результаты получают при двойном окрашивании анилиновым генцианвиолетом и карболовым фуксином Циля. Фиксация мазков после высушивания не требуется.

Анилиновый генцианвиолет (Эрлиха).

Раствор А.

Кристаллвиолет (85% красящего вещества) - 2,5 г;

этиловый спирт (96%-ный) - 12 мл.

Раствор Б.

Анилин - 2 мл;

дистиллированная вода - 98 мл.

После полного растворения оба раствора смешивают вместе и хранят во флаконе с стеклянной пробкой.

Карболовый фуксин Циля.

Раствор А.

Основной фуксин (90% красящего вещества) - 3 г;

этиловый спирт (96%-ный) - 10 мл.

Раствор Б.

Фенол (карболовая кислота) - 5 г;

дистиллированная вода - 95 мл.

Раствор А добавляют в *раствор Б*, смешивают и хранят во флаконе с стеклянной пробкой.

Для получения лучших результатов карболовый фуксин надо время от времени фильтровать. Хранить обе краски можно бесконечно.

Высушенные мазки окрашивают в течение 2 мин. анилиновым генцианвиолетом и сразу же промывают проточной, затем дистиллированной водой и высушивают. После этого дополнительно окрашивают карболовым фуксином в течение 10-15 с. или дольше, в зависимости от желательной интенсивности окрашивания; промывают проточной водой, потом дистиллированной и высушивают.

Из каждого образца спермы готовят 2-3 мазка, исследуют под микроскопом с иммерсионной системой и в каждом из них просматривают 100-200 сперматозоидов. Это дает более надежные результаты, чем просмотр большего количества клеток (до 500) в одном мазке. При подсчете ненормальных сперматозоидов придерживаются какой-либо классификации. Проще всего аномалии в структуре спермиев классифицировать по измененным частям их: аномалии в области головки, шейки, средней части (тела) и хвоста.

Головки могут быть двойными, конусообразными и грушевидными, круглыми, сморщенными, большими, узкими, удлинненными, уменьшенными, асимметричными. Наиболее частые *аномалии шейки*: сломанные шейки, бесхвостые головки. *Аномалии тела*: изогнутые, разорванные, удлинненные, утолщенные, двойные, нитевидные и рудиментарные, а также ненормальное прикрепление тела к головке. *Аномалии хвостика*: извитые, двойные, сломанные, изогнутые, закрученные и срезанные (рис. 33).

Многие патологические изменения в структуре сперматозоидов появляются в результате нарушения сперматогенеза. Особенно это относится к отклонениям в величине и форме головки, а так же к нарушениям структуры тела и хвостика. Большие головки бывают у сперматозоидов с диплоидным набором хромосом; головка и хвостовая часть у них, как правило, деформированы. Некоторые нарушения по своему происхождению генетические.

В сперме каждого производителя, даже с высокой плодовитостью, обнаруживаются морфологически ненормальные половые клетки, однако процент их обычно невысокий. У животных с гипоплазией семенников, с воспалительными процессами в них, а также при нарушениях условий кормления число таких клеток может резко возрастать.

В сперме барана содержание морфологически ненормальных сперматозоидов не должно превышать 14%, в сперме быка - 20%, хряка и жеребца - 39%. Обычно в сперме быков молочных пород число ненормальных сперматозоидов менее 10%, из них 0-5% клеток с первичными нарушениями, 1-5% - с вторичными и 2,5-7,5% - с третичными.

Определение метаболической активности сперматозоидов.

Предложены следующие методы: измерение поглощения кислорода из расчета на стандартное число клеток, определение скорости обесцвечивания метиленовой сини, определение индекса фруктолиза и величины рН и др. Каждый из этих способов объективно отражает активность метаболических процессов, происходящих в сперматозоидах при температуре выше 20-25°C. Поэтому в большинстве случаев отмечают корреляционную связь данных, полученных с помощью этих методов, с основным показателем качества спермы - ее оплодотворяющей способностью. В практике обычно используют способ, основанный на способности сперматозоидов при отсутствии источника кислорода обесцвечивать метиленовую синьку.

Определение качества спермы по скорости обесцвечивания метиленовой синьки.

В процессе гликолиза при окислении фосфоглицеринового альдегида выделяется водород, который переносится на пировиноградную кислоту, превращая ее в молочную. Метиленовая синь является хорошим акцептором водорода. При присоединении двух ионов водорода этот краситель теряет свой темно-синий цвет и превращается в лейкометиленовый синий, представляющий собой белый порошок. Водород фруктоза отдает под воздействием внутриклеточного фермента дегидрогеназы. Реакция должна происходить без доступа воздуха, так как кислород воздуха быстро окисляет лейкометиленовый синий в метиленовый.

Объекты исследования, материалы и оборудование: свежеполученная сперма, желток куриных яиц, 2,9%- и 3,6%-ный раствор натрия цитрата; дозаторы пипеточные и наконечники к ним, пипетки глазные, палочки стеклянные; предметные стекла с луночками, стеклянные трубки с внутренним диаметром 0,8-1 мм, бактериологические пробирки; цилиндры мерные на 10, 100 и 1000 мл, колбы емкостью 100 мл и 1 л, банка из темного стекла с притертой пробкой; марлевые салфетки; водяная баня, метиленовая синька, физиологический раствор, минеральное (вазелиновое) масло; секундомер или часы, аналитические (точные) весы.

По методу Н.П. Шергина на предметное стекло с луночкой глазной пипеткой наносят каплю свежеполученной спермы быка или барана и добавляют каплю 0,01%-ного раствора метиленовой синьки. Быстро перемешивают обе капли стеклянной трубкой с внутренним диаметром 0,8-1 мм и набирают в нее смесь так, чтобы образовался столбик длиной около 2 см без пузырьков воздуха (пены). Трубку кладут на белую бумагу при температуре 20-22°C и наблюдают, через какое время голубой столбик обесцветится. По концам, где мениски смеси соприкасаются с воздухом, окраска обычно не изменяется. Оценивают сперму исходя из сроков обесцвечивания смеси: *хорошее качество* - для быка 5-10 и для барана 3-7 минут, *среднее* - соответственно 11-30 и 8-12 минут, *плохое* - более 30 минут для быка и более 12 минут для барана.

Раствор метиленовой синьки необходимо приготовить заранее. Для этого сначала готовят 1000 мл физиологического раствора на дистиллированной воде, затем растворяют в нем 100 мг краски. Краску переливают в банку из темного стекла с притертой пробкой и хранят в закрытом шкафу.

В качестве стеклянных трубочек можно использовать кусочки разбитых шприцев-катетеров для осеменения коров. Концы таких трубочек шлифуют наждаком или напильником.

Метод Бека и Солсбери (Beck G.H., Salisbury G.W.). В бактериологическую пробирку (объем 10 мл) вносят 0,2 мл свежеполученной спермы и 0,8 мл желточно-цитратной среды (40 мл 2,9%-ного раствора натрия цитрата и 10 мл желтка); тщательно смешивают. Добавляют 0,1 мл раствора метиленовой синьки, приготовленного из 50 мг красителя и 100 мл 3,6%-ного раствора натрия цитрата ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$); содержимое смешивают и покрывают слоем минерального (вазелинового) масла толщиной 1,25 см. Пробирку помещают в водяную баню с регулируемой температурой при 43-46°C. При такой температуре восстановление метиленовой сини происходит наиболее быстро, а бактерии, попавшие в образец при получении или обработке спермы, не оказывают влияния на результаты, так как многие из них погибают. Лучшие по качеству эякуляты быка обесцвечивают краситель в течение 3-6 минут.

Определение выживаемости (живучести) сперматозоидов вне организма.

Объекты исследования, материалы и оборудование: свежеполученная сперма, среда для разбавления спермы, оттаянная сперма; дозаторы пипеточные и наконечники к ним, пипетки глазные, палочки стеклянные; предметные и покровные стекла; термостат, микроскопы МБР (МБИ-1, МБИ-3, МБИ-4 или БИОЛАМ) с осветителями ОИ-35 либо МКИ-11, микроскоп МБИ-11 (МБИ-14) с телевизионной камерой; конденсор светлого и темного поля марки ОИ-10 производства ЛОМО или фазово-контрастный микроскоп; термостат для микроскопа, обогревательные столики; марлевые салфетки; система автоматического компьютерного анализа спермы.

Установлена зависимость оплодотворяющей способности спермы от степени сохранения подвижности сперматозоидов при стандартных условиях (например, при температурах близких к 0°C). В.К. Миловановым был предложен метод, который позволяет одновременно проследить за характером снижения подвижности сперматозоидов в течение всего срока хранения, определить максимальную продолжительность жизни отдельных сперматозоидов и найти оптимальную степень разбавления. В настоящее время степень разбавления спермы варьирует в более узких пределах, чем было предусмотрено автором, поэтому метод этот в полном объеме не используется. Достаточно исследовать сперму после стандартного разбавления: от 100-125 до 150-187 млн. сперматозоидов в мл из расчета получения 10-15 млн. подвижных клеток в грануле или солоmine после оттаивания.

Для исследования 1-2 мл разбавленной спермы оставляют в холодильнике при 2-4°C и ежедневно определяют подвижность сперматозоидов при температуре 38-40°C до полной их гибели. Суммируя все произведения времени (в часах), в течение которого наблюдалась та или иная подвижность, на активность сперматозоидов (в баллах), вычисляют абсолютный показатель живучести. Для спермы барана высокого качества он должен быть не ниже 1600, для спермы быка - 1000-1400, для спермы жеребца - 400-730 и для спермы хряка - 700-800. Максимальная продолжительность жизни для сперматозоидов (в часах) - для быка не менее 200, для барана - 250 и жеребца - не менее 300.

Для определения выживаемости сперматозоидов в замороженных эякулятах применяют экспресс-методику. Из каждого дуплетного эякулята по 2 дозы спермы после оттаивания помещают в термостат при температуре 38°C. Фиксируют время оттаивания и одновременно определяют исходную подвижность сперматозоидов. Через 5 часов оценку повторяют. Пригодной для осеменения считают сперму (быка), начальная подвижность которой не менее 4 баллов и через 5 часов единичные (или многие) сперматозоиды проявляют движение.

Образец записи результатов исследования спермы

Дата исследования	Время исследования	Подвижность, баллов (а)	Время сохранения подвижности, ч (t)	Произведение подвижности на время (at)
7.02	8 ⁰⁰	8	12	96
8.02	8 ⁰⁰	7	24	168
9.02	8 ⁰⁰	6	24	144
10.02	8 ⁰⁰	5	24	120
11.02	8 ⁰⁰	4	24	96
12.02	8 ⁰⁰	3	36	108
14.02	8 ⁰⁰	1	36	36
15.02	8 ⁰⁰	1	24	24
16.02	8 ⁰⁰	0	-	0
				792

Определение сперматозоидов с поврежденной акросомой.

Объекты исследования, материалы и оборудование: замороженная в соломинах или гранулах сперма быка; 10%-ный раствор желатины (рН 7,0); фазово-контрастный микроскоп или микроскопы БИО-ЛАМ (МБИ-3 или МБИ-4) с осветителями ОИ-19 (ОИ-35, МКИ-11) и конденсор светлого и темного поля марки ОИ-10 производства ЛОМО; дозаторы пипеточные и наконечники к ним или Пастеровские пипетки; предметные и покровные стекла; фильтровальная бумага, марлевые салфетки; термостат.

Акросома сперматозоидов содержит две группы ферментов, которые играют важную роль в процессе оплодотворения. Различные дефекты ее или повреждения структуры в процессе обработки и хранения спермы приводят к потере сперматозоидами оплодотворяющей способности. Такие повреждения, как правило, возникают в процессе замораживания и оттаивания

спермы. При этом большое значение имеют индивидуальные особенности производителей. Высокая частота повреждений акросомы может существенным образом повлиять на результаты осеменения. Поэтому целесообразно оценивать замороженную сперму не только по подвижности, но и по числу сперматозоидов с поврежденной акросомой. Для этой оценки используют интерференционный или фазово-контрастный микроскоп. При отсутствии их достаточно иметь микроскоп БИОЛАМ (МБИ-3 или МБИ-4) и конденсор темного поля ОИ-10.

Сперматозоиды по окраске почти не отличаются от окружающей среды. Они не адсорбируют свет, не изменяют ни интенсивность, ни цвет прошедшего через них луча, поэтому микроскопия их затруднена. Однако они изменяют фазу волны света. Для обнаружения сдвига фаз используются интерференционные или фазово-контрастные микроскопы.

В фазово-контрастном микроскопе освещение устроено по методу светлого поля. Но в нем имеются: 1) дополнительная (кольцевая) осветительная диафрагма, которая помещается под конденсором (в его передней фокальной плоскости), и 2) фазовая пластинка из вещества, поглощающего свет и вносящего определенный сдвиг фаз; фазовая пластинка помещается в задней фокальной плоскости объектива, где изображается и кольцевая диафрагма. Изображения диафрагмы и фазовой пластинки (вследствие соответствия размеров их) совмещаются. Весь свет, не прошедший через объект, проходит через фазовую пластинку. Луч, прошедший через объект, распадается (подвергается дифракции) на пучки света (убывающей интенсивности), выходящие из объекта под разными углами. Этот дифрагированный свет проходит через весь зрачок объектива, в основном вне изображения кольцевой диафрагмы. Два пучка лучей - один от объекта, другой от среды, в которой находится объект, - соединяются, преобразуя при этом фазовые изменения, обусловленные объектом, в амплитудные (различной интенсивности). В результате получается видимое, фазово-контрастное изображение структуры объекта, в котором распределение яркостей (амплитуд) воспроизводит фазовый рельеф.

Экспресс метод определения оплодотворяющей способности сперматозоидов (разработанный под руководством Соколовской И.И.). Этот метод позволяет определять состояние акросом непосредственно у движущихся сперматозоидов в неразбавленной или оттаянной сперме быка, а также соотношение подвижных и неподвижных клеток.

Замороженную сперму быка оттаивают и разбавляют 10%-ным раствором желатины в отношении 1:1 для создания повышенной вязкости и снижения интенсивности движения сперматозоидов. Каплю разбавленной спермы (0,03 мл) наносят на предметное стекло дозатором пипеточным (Пастеровской пипеткой) и накрывают покровным стеклом. Сперму за пределами стекла удаляют при помощи фильтровальной бумаги. Приготовленные мазки немедленно исследуют под микроскопом БИОЛАМ, оснащенном окуляром 15х и объективом 40х и конденсором ОИ-10. Необходимый уровень освещения обеспечивается при помощи осветителя ОИ-19.

Для получения четкого изображения прикрывают диафрагму конденсора и опускают его кремальеру до упора; находят изображение сперматозоидов сперва в светлом поле конденсора, затем наводят фокус, полностью открывают диафрагму конденсора и вводят в ход лучи темного поля. Следя за изображением медленно перемещают кремальеру кверху до появления ярко светящихся контуров половых клеток на темном фоне.

На этом фоне можно отчетливо различить три категории клеток:

- сперматозоидов с ярким свечением всего контура головки, иногда с утолщенным передним краем – это биологически полноценные клетки с неповрежденной акросомой; у таких сперматозоидов ярко светятся также тело и хвост;

– сперматозоидов с отчетливо заметным задним ядерным кольцом и хвостом, но слабо заметным контуром передней половины головки – это неполноценные половые клетки с разбухшей акросомой (рис. 34);

– сперматозоидов с полностью отсутствующими контурами всей передней части головки – это клетки с полностью разрушенной или утерянной акросомой (рис. 34).

Просматривают в препарате 100 сперматозоидов, обладающих прямолинейным поступательным движением и вычисляют процент клеток с поврежденной акросомой. Каждый образец спермы исследуют сразу после ее оттаивания и спустя 1 и 2 часа (по И.И. Соколовской - однократно). В период исследований сперму выдерживают в термостате при температуре 37°C.

Процент сперматозоидов с поврежденной акросомой спустя 1 час после оттаивания составляет 7.1 ± 3.9 . Установлено наличие высоко достоверной корреляции этого показателя спермы с ее оплодотворяющей способностью. При увеличении содержания поврежденных половых клеток на 1%, оплодотворяемость животных снижалась на 2,48%. При анализе результатов осеменения коров и телок установлено, что средний процент оплодотворяемости после первого осеменения, при использовании эякулятов хорошего качества (ненормальных сперматозоидов 7% или менее), составил – 62.4%, при использовании эякулятов удовлетворительного качества (8-11%) – 56.3% и неудовлетворительного качества (12% или более поврежденных клеток – 35.3%. Следует отметить, что корреляционная связь между данными признаками внутри групп возростала и в третьей группе составила – 0.44 при $P > 0.05$. (Г.Ф. Медведев, С.О. Турчанов)

Определение подвижности сперматозоидов в оттаянной сперме по способу БелНИИЖ.

Объекты исследования, материалы и оборудование: замороженная в соломинах сперма быка; 2,9%-ный раствор натрия цитрата в ампулах; 7%-ный раствор глюкозы или 9%-ный раствор лактозы; микроскопы БИОЛАМ (МБИ-3 или МБИ-4) с осветителями ОИ-19 (ОИ-35, МКИ-11) и конденсор ОИ-10 или фазово-контрастный микроскоп; биотермостат, обогревательные столики, дозаторы пипеточные и наконечники к ним, глазные палочки; предметные и покровные стекла; фильтровальная бумага, марлевые салфетки; термостат.

Оттаянную в соломинке сперму выливают в ампулу с 2,9%-ным раствором натрия цитрата (1 мл, $t = 38^\circ\text{C}$); содержимое осторожно смешивают. В небольшой (5-10 мл) флакон наливают 1 мл 7%-ного раствора глюкозы медицинской безводной или 9%-ного раствора лактозы и добавляют 0,2 мл разбавленной после оттаивания спермы; температура спермы и раствора – 18-20°C. Небольшую каплю вторично разбавленной спермы наносят стек-

лянной глазной палочкой (дозатором пипеточным) на подогретое ($t = 38^{\circ}\text{C}$) предметное стекло, накрывают покровным стеклом, помещают на обогревательный столик микроскопа и просматривают при увеличении 600-800х. Подсчитывают всех сперматозоидов в пяти полях зрения, причем в каждом из них сначала учитывают подвижных. Подсчитывают общее количество просмотренных сперматозоидов и вычисляют процент подвижных.

Для лучшей видимости сперматозоидов рекомендуется использовать конденсор ОИ-10.

РАЗБАВЛЕНИЕ СПЕРМЫ

Цель занятий: приобретение студентами навыков приготовления синтетических сред, контроля качества их и разбавления спермы производителей сельскохозяйственных животных с учетом условий и срока хранения.

Объекты исследования, материалы и оборудование: самцы животных, животные-манекены или чучела (для быка и хряка); инструменты, оборудование и материалы для получения спермы; термостат, холодильник, водяная баня, магнитная мешалка, биологический термостат; спектрофотометр (электрический фотоколориметр), микроскопы МБР (МБИ-1, МБИ-3, МБИ-4 или БИОЛАМ) с осветителями, микроскоп МБИ-11 или БИОЛАМ-М с телевизионной камерой; обогревательные столики, предметные и покровные стекла; посуда - колбы, мерные цилиндры и мензурки, смесители для спермы; градуированные пипетки, стеклянные палочки; фильтры бумажные и марлевые, мембранный фильтр 0,45 мкм; спиртовые тампоны; компоненты сред - вода дистиллированная, куриные яйца, гомогенизированное молоко (гомогенизированные сливки и обрат), лактоза, глюкоза, фруктоза, сахароза, глицин, глицерин, натрия цитрат, K_2HPO_4 , $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, натрия хлорид, натрия гидрокарбонат, калия хлорид, аммония сульфат, магния сульфат, хелатон, капроновая кислота, токоферол (25-30%-ный масляный раствор), ди-трет-бутил-крезол (ДТБК), декстрин, гуммиарабик, трис-буфер, лимонная кислота, ксилит, спермосан-3 или спермосан ППК или полиген, стрептоцид, пенициллин, стрептомицин, каталаза, тилозин, гентамицин, линкомицин, спектинамицин.

Краткие методические указания. Занятия проводятся в клинике и лаборатории кафедры (учебном пункте). Сначала преподаватель объясняет студентам цель и значение разбавления спермы. Затем знакомит с составом наиболее распространенных синтетических сред для разбавления спермы различных производителей; называет и демонстрирует основные компоненты сред, которые могут быть использованы во время занятий; рассказывает о технике приготовления сред, контроле свойств и качества их, о влиянии на сперматозоидов различных факторов и правилах разбавления спермы.

После этого студентов (несколько групп) обеспечивают необходимыми реактивами, материалами и оборудованием для приготовления одной из синтетических сред. После приготовления сред (возможно одновременно с приготовлением их) ведется подготовка к получению спермы от производителя. Полученную сперму оценивают и затем разбавляют. Методы контроля качества сред можно изучить одновременно с изучением действия на сперматозоидов физических и химических факторов. По теме целесообразно проведение одного-двух занятий (по 2-4 часа).

Вопросы:

1. *Цель разбавления спермы?*
2. *Какие требования предъявляют к средам для разбавления спермы?*

3. Роль желтка куриных яиц, глицерина, сахаров, различных солей в средах для разбавления спермы?
4. Что такое изотонический раствор (буфер), какова его роль в среде для разбавления спермы?
5. Для чего включают в среды противомикробные вещества? Какие антибиотики и сульфаниламиды наиболее часто используются, какая концентрация их в разбавленной сперме?
6. Какие способы внесения антибиотиков в разбавленную сперму наиболее эффективны?
7. Как часто используется молочная среда для разбавления спермы производителей? Какова основа этой среды? Какие вещества дополнительно вносятся в эту среду?
8. Какое осмотическое давление в сперматозоиде? Каково оно должно быть в среде для разбавления спермы?
9. При какой температуре производится начальное разбавление спермы? Как и почему необходимо охлаждать сперму перед финальным разбавлением?
10. В какой степени разбавляют сперму производителей сельскохозяйственных животных? От каких факторов зависит степень разбавления?
11. Какое количество сперматозоидов должно содержаться в одной дозе для осеменения коровы, овцы, свиньи, кобылы?
12. Какая подвижность сперматозоидов в свежеполученной и в разбавленной и сохраняемой сперме?
13. Для чего проводится окрашивание среды для разбавления спермы или соломины (пайеты)?

Состав сред

Для приготовления сред применяют компоненты (реактивы) в заводской упаковке: в стеклянных банках с притертыми пробками (или с корковыми пробками, залитыми сверху парафином), а также в запаянных полиэтиленовых мешочках. На упаковке должна быть этикетка с обозначением названия препарата и предприятия, выпустившего реактив, степени чистоты реактива (ЧДА - чистый для анализа, ХЧ - химический чистый) и номера контрольного анализа. Хранят реактивы в шкафах в сухом теплом помещении.

Для приготовления сред используют следующие вещества.

Натрия цитрат (трехзамещенный, пятиводный - $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). Белые прозрачные кристаллы или мелкокристаллический порошок, слабощелочного, солоноватого вкуса. Обладает хелатными свойствами - активно связывает ионы кальция и тяжелых металлов и уменьшает содержание их в среде; понижает набухание и проницаемость мембраны сперматозоидов, предохраняя их от потери электрического заряда и агглютинации; рассеивает жировые шарики в желтке так, что при оценке разбавленной спермы под микроскопом можно наблюдать за отдельными сперматозоидами; вместе с другими компонентами создает необходимое осмотическое давление и pH среды.

Натрия цитрат (трехзамещенный двухводный - $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), идентичен $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

Калия фосфат (однозамещенный - KH_2PO_4). Большие прозрачные кристаллы или кристаллический порошок, слабокислый на вкус.

Натрия фосфат (двухзамещенный двенадцативодный - $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$). Белые крупные кристаллы.

Натрия гидрокарбонат (NaHCO_3). Белый порошок, щелочной на вкус.

Магния сульфат ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Бесцветные кристаллы.

Аммония сульфат $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$. Бесцветный кристаллический порошок, возможен легкий желтоватый оттенок.

Трилон Б (хелатон-3, динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты, $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_8\text{N}_2\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Белые кристаллы; сберегают в темном месте.

Все эти соли, подобно натрий цитрату, связывают ионы кальция и оказывают благоприятное действие на состояние и целостность мембран сперматозоидов, создают необходимое осмотическое давление и рН среды.

Натрия хлорид (NaCl). Мелкокристаллический порошок или таблетки массой 0,9 г.

Калия хлорид (KCl). Белый мелкокристаллический порошок.

Кислота лимонная ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$). Белый кристаллический порошок, хорошо растворим в воде.

Трис-буфер (2-амино-2-гидроксиметил-1,3-пропандиол). Мелкокристаллический белый порошок. Устойчиво удерживает первоначальную величину рН среды, обладает осмотическим действием, хорошо проникает через клеточную мембрану. Он способен соединяться с H^+ и CO_2 и устранять явления дыхательного ацидоза клеток и может заменить в средах глюкозу и натрия цитрат.

Глюкоза (виноградный сахар, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$). Белый гигроскопичный порошок сладкого вкуса.

Фруктоза (гексоза, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$). Белый порошок сладкого вкуса.

Сахароза (тростниковый сахар, $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$). Представляет собой белые кристаллы, сладкие на вкус.

Лактоза (молочный сахар - $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11} \cdot \text{H}_2\text{O}$). Белые кристаллы или белый кристаллический порошок без запаха, со слабым сладким вкусом, растворимы в воде. Хранят в бытовом холодильнике при температуре 5°C .

Глицин (аминоуксусная кислота, $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$). Белый мелкокристаллический порошок, слабого специфического запаха и сладковатого вкуса.

Введение в среды сахаров или глицина (гликокола) понижает их электропроводность и защищает сперматозоидов от агглютинации (склеивания их головками или всем телом в результате потери отрицательного электрического заряда), а также способствует инактивации антител (спермолизиннов). Сахара (глюкоза, фруктоза) могут быть использованы сперматозоидами для метаболических процессов.

Благоприятное действие сахаров на сперматозоидов связано не только с участием их в метаболических процессах. Сахара являются источником редуцирующих веществ. Воспринимая кислород и окисляясь, они могут выполнять роль антиоксидантов и предохранять антагглютинин и ферменты, содержащие сульфгидрильную группу, от окисления. Сахара увеличивают вязкость среды и устойчивость к развитию гнилостных микроорганизмов, что также благоприятно отражается на жизнедеятельности сперматозоидов. Кроме того, они способны задерживать воду или заменять ее в структурах, чувствительных к дегидратации.

Желток куриных свежих (1-2 дня!) яиц. Содержит: глюкозу (которая используется сперматозоидами раньше, чем фруктоза плазмы спермы), раз-

личные протеиды, водо-растворимые и жирорастворимые витамины, каротин, холестерин и другие вещества, стимулирующие активность дегидрогеназ сперматозоидов. Лецитин желтка защищает сперматозоидов от температурного шока, а ряд других веществ и соединений могут служить в качестве окислительных субстратов, предохраняющих сульфгидрильные группы ферментов и антагглютинин от разрушения. Желток имеет слабокислую реакцию (рН 6,0-6,3). Обычно она нейтрализуется введением в среду лимоннокислого натрия. В среды для спермы быка и барана желтка включают 12,5-20,0%. Оптимальным количеством для спермы хряка и кролика является 3-5%, а для жеребца - менее 1% желтка.

Глицерин ($\text{CH}_2\text{OH}\cdot\text{CHOH}\cdot\text{CH}_2\text{OH}$). Простейший трехатомный спирт; представляет собой густую, прозрачную, бесцветную, гигроскопичную жидкость. Легко смешивается с водой или этиловым спиртом в любых пропорциях. При охлаждении до -196°C затвердевает без образования кристаллов льда. Таким же свойством обладают и растворы с концентрацией его 70% или более. Точка замерзания растворов даже с небольшим содержанием глицерина понижается, а объем их уменьшается. Введенный в среды для замораживания спермы глицерин уменьшает опасность образования кристаллов льда и механического повреждения ими сперматозоидов, способствует снижению давления на клетки и препятствует сильному повышению концентрации растворенных веществ при образовании кристаллов льда из воды. Глицерин используется сперматозоидами путем окисления для образования энергии, а в аэробных условиях восполняет содержание фруктозы. Вносится он в количестве от 3 до 10 мл на 100 мл среды.

Бактериостатические вещества - пенициллин, стрептомицин, гентомицин, тилозин, линкомицин, спектиномицин, стрептоцид белый растворимый или комбинированные препараты: спермосан-3, спермосан ППК, полиген, комбиспермосан ЛАП и др. Все антибиотики должны быть проверены на безвредность для сперматозоидов.

При хранении спермы возможно развитие в ней микроорганизмов. Попадают они в момент получения или обработки спермы. Размножаясь, микроорганизмы выделяют в среду продукты обмена, которые отрицательно сказываются на выживаемости сперматозоидов. При осеменении внесенные со спермой в половые пути самки микроорганизмы могут препятствовать оплодотворению или развитию беременности. Особенно большую опасность представляет загрязнение спермы возбудителями специфических половых инфекций. Для предупреждения размножения микроорганизмов в сперме и инфицирования спермы вносят сульфаниламиды и антибиотики.

Среды готовят на *дистиллированной (желательно дважды дистиллированной)* воде. Проводить дистилляцию необходимо в цельностеклянном дистилляционном аппарате, чтобы вода не соприкасалась металлическими деталями. Хранят в закрытых стеклянных сосудах.

Среды для разбавления спермы быка. Сперму быка хранят при комнатных температурах, при температуре $0..5^\circ\text{C}$ и при минус 196°C (в жидком азоте). Разбавляют сперму средами, состав которых зависит от технологии расфасовки и хранения.

В ряде стран (Новая Зеландия) широко практикуется хранение спермы в течение трех дней при комнатных температурах (18-24°C). Осеменение скота сезонное - с середины сентября до декабря. Осеменяют ежегодно до 1,8 млн. животных. В 1991 г. в течение трех месяцев из полученной от быка голштинской породы Stocketts Trevog спермы было подготовлено и использовано для осеменения 380000 доз.

Для разбавления спермы используют **цитратно-желточную** среду. Ее насыщают азотом и добавляют капроновую кислоту. *Буфер цитратный* содержит:

Натрий цитрат ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	2,0%
Глюкоза	0,3%
Глицин	1,0%
Глицерин	1,25%
Капроновая кислота	0,03125%
Сульфациетамид	0,01%
Вода дважды дистиллированная	до 100 мл

Желток, пенициллин и стрептомицин добавляют в среду перед использованием. Содержание желтка при предварительном разбавлении 20%, после финального разбавления 5%. Сперма разбавляется нередко из расчета 2 млн. сперматозоидов в дозе (0,5 мл), но чаще ее расфасовывают в соломины объемом 0,25 мл. Добавление каталазы 20 мкг на 1 мл среды повышает оплодотворяемость на 1-2%. Каталаза разрушает образующуюся в процессе метаболизма сперматозоидов перекись водорода.

Среды для хранения при 0...5°C в течение 72 часов

Глюкозо-цитратно-желточная среда

Вода дистиллированная	100 мл
Глюкоза	3 г
Натрий цитрат	1,4 г
Желток куриных яиц	20 мл
Спермосан-3	75-90 тыс. ед.

Желточно-фосфатная среда

Фосфатный буфер и
желток куриных яиц в соотношении 1:1.

Фосфатный буфер (рН 6,7-6,8) содержит в 100 мл дистиллированной воды 0,2 г KH_2PO_4 и 2,0 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$. Смесь подогревается в кипящей водяной бане до растворения солей. Хранится при температуре 15°C.

При замораживании спермы (в гранулах и соломинах) разбавление проводят ЛЖГ (*лактозо-желточно-глицериновой*) средой или ЛГЦЖ (*лактозо-желточно-цитратно-глицериновой*), в состав которых входят:

Вода дистиллированная	100 мл	100 мл
Лактоза	11,5 г	10,5 г
Натрия цитрат	-	0,2 г
Желток куриных яиц	20 мл	20 мл
Глицерин	5 мл	5 мл
Спермосан-3	50 тыс. ЕД.	50 тыс. ЕД

В мировой практике широко используются *двух фракционные среды*. Сперму ими разбавляют дважды: сначала одной, а затем другой фракцией. Несодержащая глицерина *фракция А* используется для начального разбавления и охлаждения спермы, вторая *фракция Б* с удвоенным содержанием

глицерина добавляется после того, как сперма охлаждена до +5°C. Введение глицериновой фракции после охлаждения уже разбавленной спермы предотвращает возможные повреждения сперматозоидов и обеспечивает проявление действия антибиотиков. Наиболее простая, состоящая из двух фракций, *желточно-цитратно-глицериновая среда*:

Ф р а к ц и я А

2,9%-ный цитратный буфер 400 мл
Желток свежих (1-2 дня) куриных яиц 100 мл

Ф р а к ц и я Б

Цитратный буфер 330 мл
Желток 100 мл
Глицерин 70 мл

Финальное соотношение *фракции А + сперма* и *фракции В* - 1:1. При таком соотношении содержание компонентов (в %) в смеси: *буфер цитратный* - 73, *желток* - 20 и *глицерин* - 7. В эту среду (в одну или обе фракции) нередко включают фруктозу или глюкозу; конечная концентрация в среде от 1 до 1,25%. Среда должна иметь рН 6,8-6,9 и осмотическое давление 285-300 милли осмомолей.

Широко используется и молочная среда. Так, в США в 1992 году $\frac{1}{4}$ часть всей спермы была разбавлена молочной средой. Единственный серьезный недостаток этой среды - это наличие оптически различных жировых шариков, которые затрудняют оценку подвижности сперматозоидов.

Ф р а к ц и я А

Прогретое гомогенизированное молоко 500 мл

Ф р а к ц и я Б

Прогретое гомогенизированное молоко 430 мл
Глицерина 70 мл

При отсутствии оборудования для гомогенизации молока можно использовать гомогенизированные сливки жирностью 10% - 175 мл, обрат - 285 мл и 40 мл 5%-ного раствора фруктозы (Г.Ф. Медведев, Л.П. Аникевич). Молочная среда должна иметь рН 6,5-6,6 и осмотическое давление 260-290 милли осмомолей.

Среды для разбавления спермы барана. Сперму барана и козла хранят при температуре +2...4°C в течение одного-двух дней или длительное время при минус 196°C. Среды для краткосрочного хранения:

Глюкозо-цитратно-желточная среда

Вода дистиллированная 100 мл
Глюкоза 0,8 г
Натрия цитрат 2,8 г
Желток куриных яиц 20 мл
Спермосан-3 50-75 тыс. ед.

В США для разбавления спермы барана используют *желточно-цитратный* или *желточно-фосфатный буфер*. *Цитратный буфер* готовят из расчета 36 г трехзамещенного пятиводного ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 5\frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$) или 30 г двух водного ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) натрия цитрата в 1 л дистиллированной или очищенной воды. *Фосфатный буфер* готовят путем растворения 2 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ и 0,2 г KH_2PO_4 на 100 мл дистиллированной или очищенной воды. Раствор стерилизуют в водяной бане и добавляют в момент разбавления спермы 20% (к объему) желтка свежих куриных яиц.

Замораживание спермы барана практикуется реже, чем спермы быка. Это связано с недостаточно стабильными результатами осеменения маток замороженной спермой, а также с особенностями организации искусственного осеменения в овцеводстве и сроков его проведения. Для разбавления и замораживания рекомендуются синтетические среды ВИКА (с антиоксидантом), ГЖУК-трис-буферная (с полисахаридом декстрином) и ЛЖГТЦГ (с полисахаридом гуммиарабиком).

Состав среды ВИКА

Сахароза	9,84 г	
Натрий-кальциевая соль ЭДТА	0,84 г	
Желток	10 мл	
Глицерин	5,0 мл	
Токоферол (25-30%-ный масляный раствор)	2,0 мл	или
Ди-трет-бутил-крезол (ДТБК)	0,05 г	
Спермосан-3	25 тыс. ЕД	
Вода дистиллированная	до 100 мл	

Состав ЛЖГТЦГ-среды

Лактоза	14,5 г
Гуммиарабик	6,0 г
Желток	20 мл
Глицерин	17,0 мл
Трис-(оксиметил)-аминометан	0,6 г
Лимонная кислота	0,27 г
Спермосан-3	25 тыс. ЕД
Вода дистиллированная	100 мл

Состав лактозо-желточной (ЛЖ) среды

Вода дистиллированная	100 мл
Лактоза	12 г
Желток	20 мл

Состав ГЖУК-трис-буферной среды

Лактоза	8,4 г
Ксилит	0,26 г
Хелатон-3	0,135 г
Желток	20 мл
Глицерин	6,0 мл
Трис-(оксиметил)-аминометан	0,105 г
Декстрин	5 г
Спермосан-3 или ППК	25 тыс. ЕД
Вода дистиллированная	100 мл

Сперму хряка хранят при температуре +16...20°C в течение трех суток. Для этого используют *глюкозо-хелато-цитратно-сульфатную (ГХЦС)* или *глюкозо-хелато-цитратную (ГХЦ) среды*.

Состав ГХЦС:

Вода дистиллированная	1000 мл
Глюкоза.....	40 г

Хелатон	2,6 г
Натрия цитрат	3,8 г
Аммония сульфат.....	1,8 г
Натрий гидрокарбонат	0,5 г
Спермосан-3.....	250-300 тыс. ед.

Состав ГХЦ:

Вода дистиллированная	1000 мл
Глюкоза.....	60 г
Хелатон	3,7 г
Натрия цитрат	3,56 г
Натрий гидрокарбонат	1,2 г
Спермосан-3.....	250-300 тыс. ед.

Для разбавления и хранения спермы жеребца при температуре +2...4°C в течение 48 часов применяется *лактозо-хелато-цитратно-желточная среда (ЛХЦЖ)*:

Вода дистиллированная	100 мл
Лактоза	11,0 г
Натрий гидрокарбонат.....	8,0 мг
Натрий цитрат	89,0 мг
Хелатон	100 мг
Желток куриных яиц	1,6 мл
Спермосан-3	24-30 тыс. ед.

Эта же среда, но с добавлением 3,5 мл глицерина, применяется для разбавления и замораживания спермы.

Приготовление сред и разбавление спермы производителей

Приготовление сред. В племпредприятии среды готовят в день разбавления спермы. Работу по разбавлению спермы проводят в стерильной камере или в специальной оборудованной лаборатории, облученной бактерицидными лампами. Температуру (18-20°C) в лаборатории поддерживают бытовыми кондиционерами.

Среды для краткосрочного хранения спермы быка и барана (ГЦЖ) готовят следующим образом. В химическую колбу наливают дистиллированную (бидистиллированную) воду, закрывают колпачком из пергаментной бумаги и стерилизуют кипячением в течение 5-7 минут; затем охлаждают до 35°C. На точных весах отвешивают глюкозу и натрия цитрат и высыпают их в другую стерильную колбу. Стерильной мензуркой или цилиндром отмеривают нужное количество прокипяченной воды, переливают ее в колбу с реактивами и размешивают до полного их растворения. Раствор фильтруют через бумажный фильтр и стерилизуют в водяной бане 5-10 мин. Охлаждают до 35°C и добавляют спермосан-3 и желток.

Свежие (1-2 дня) куриные яйца сначала моют теплой водой с детергентом, затем промывают теплой проточной и дистиллированной водой, вытирают стерильной марлевой салфеткой и обеззараживают 70%-ным этиловым спиртом. Стерильным скальпелем яйцо раскалывают пополам и, оставляя желток в одной половинке скорлупы, сливают в чашку белок; при этом следят, чтобы оболочка желтка не была повреждена острым краем скорлупы. Осторожно наклоняя скорлупу перемещают желток на стерильную фильтровальную бумагу. Для освобождения желтка от остатков белка край бумаги приподнимают, поворачивают в разные стороны и скатывают медленно желток к другому краю ее. Поддерживая на несколько сжатой бумаге желток, стерильным пинцетом или скальпелем разрушают его оболочку и выливают в подготовленную мензурку (цилиндр). Один желток имеет объем 10-20 мл.

Среда ЛХЦЖ для разбавления спермы жеребца. Отвешивают согласно рецепту лактозу и хелатон и высыпают в стерильную колбу. В эту колбу добавляют 0,2 мл 4,2%-ного стерильного раствора натрия гидрокарбоната и 0,25 мл 35,7%-ного стерильного раствора натрия цитрата (из расчета на каждые 100 мл среды) и приливают необходимое количество прокипяченной охлажденной дистиллированной воды. Содержимое растворяют, фильтруют через стерильный бумажный фильтр и добавляют желток.

Среду ГХЦС для разбавления спермы хряка в форме сухих заготовок, выпускаемых медицинской промышленностью или специальными лабораториями научно-исследовательских институтов, готовят согласно наставлению по применению "Глюкозо-хелато-цитратно-сульфатно-бикарбонатной смеси в порошке".

Среда ГХЦ также выпускается в форме сухих заготовок или же ее готовят в лаборатории пункта. Для этого стерильным мерным цилиндром или мензуркой отмеривают необходимый объем прокипяченной дистиллированной воды и переливают ее в химическую стерильную колбу. Сюда же вносят взвешенные на точных весах необходимые компоненты, кроме saniрующих препаратов. Приготовленную среду кипятят в водяной бане 5-10 минут, охлаждают до 40-45°C и добавляют спермосан-3 из расчета 250-300 тыс. ед. на 1000 мл. Колбу закрывают стерильной пергаментной бумагой и фиксируют резиновым кольцом.

ЛГЖ - и ЛГЦЖ - среды, используемые для разбавления и замораживания спермы быка. В чистую стерильную колбу наливают необходимый объем бидистиллированной (дистиллированной) воды, закрывают колпачком из пергаментной бумаги и кипятят 10-15 мин. В горячую (90-95°C) воду вносят лактозу и перемешивают до полного растворения порошка; добавляют глицерин и содержимое еще раз тщательно перемешивают, а затем охлаждают до 20-30°C. В охлажденную среду добавляют saniрующий препарат, растворяют его, добавляют желток и натрия цитрат (в среду ЛГЦЖ, в которой лактозы 10,5 г и натрия цитрата 0,2 г). Колбу плавно покачивают до полного растворения и размешивания всех компонентов.

После приготовления часть среды (20%), предназначенную для первичного разбавления спермы, помещают в термостат при 27±1°C. Другую часть оставляют при комнатной температуре (18-20°C) и используют для

окончательного разбавления. Приготовленная среда должна быть использована в течение 3-4 часов.

Желточно-цитратно-глицериновая среда. Сначала готовят цитратный буфер. На аналитических или других точных весах отвешивают 29 г натрия цитрата ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Навеску вносят в мерную колбу на 1 л и добавляют приблизительно 500 мл бидистиллированной воды. Помешиванием раствора добиваются растворения кристаллов цитрата натрия. Затем добавляют необходимое количество воды, постоянно помешивая с помощью магнитной мешалки. Приготовленный буфер переносят в емкость для хранения и стерилизуют автоклавированием или вакуумной фильтрацией через мембранный фильтр 0,45 мкм в стерильной химической колбе. Определяют осмотическое давление и pH. Хранят в прохладном месте или бытовом холодильнике до момента использования (одна-две недели).

Перед разбавлением спермы буфер подогревают до 32...35°C, разделяют на две фракции, добавляют в каждую из них необходимое количество желтка и глицерина (в фракцию Б). В фракцию А вносят из расчета на каждый миллилитр среды 100 мкг тилозина, 500 мкг гентамицина и 300/600 мкг Линко-Спектина, растворенных в 0,02 мл бидистиллированной стерильной воды. Весовые количества антибиотиков необходимо приводить в соответствие с их активностью, которая может различаться в зависимости от партии препарата. Гентомицин и тилозин могут сохраняться в растворе при 5°C в течение 8 дней, а в парах жидкого азота до 6 месяцев.

Молочная среда. Для приготовления используют свежее или пастеризованное, гомогенизированное цельное молоко жирностью около 3,5% (или гомогенизированные сливки + обрат из расчета получения смеси, жирностью 3,5%). Такое молоко содержит вредные для сперматозоидов энзимы, но при нагревании его в течение 10 минут при 92-95°C они разрушаются. Прогревают молоко в закрытом двойном стеклянном бойлере или в водяной бане; затем охлаждают до комнатной температуры. Переливают охлажденное молоко в стерильную колбу, оставляя пену в бойлере или при необходимости фильтруют через стерильный фильтр. Разделяют на две фракции. При использовании гомогенизированных сливок и обрат после стерилизации и охлаждения смеси к ней приливают стерильный раствор фруктозы и дистиллированную воду, а затем разделяют на две фракции. В фракцию А молочных сред добавляют антибиотики, в фракцию Б - глицерин. Первую фракцию оставляют при температуре 32...35°C, а фракцию Б охлаждают до температуры 4°C.

Среды для разбавления и замораживания спермы барана. При приготовлении среды ВИКА токоферол может быть заменен ди-трет-бутил-крезолом (ДТБК) в количестве 0,05 г. Раствор сахарозы и натрий-кальциевую соль ЭДТА стерилизуют в водяной бане в течение 15 минут. Желток эмульгируют с токоферолом в стерильном мерном стакане в водяной бане при температуре 37°C в течение 5-7 минут, постоянно помешивая стеклянной палочкой (удобнее пользоваться магнитной мешалкой). Затем в этот стакан вносят последовательно стерильный раствор сахарозы с солью ЭДТА, спермосан-3 и глицерин. Техника приготовления ЛЖГТЦГ - среды более сложная, что обусловлено требованиями длительной стерилизации в водяной бане (30 минут для ЛЖ - среды и 60 минут для ЛЖГТЦГ - среды) всех компонентов, кроме

желтка и спермосана, контроля испарения воды в процессе стерилизации путем взвешивания колбы с содержанием и восполнения воды при значительных потерях ее.

Техника разбавления спермы быка. Зависит от свойств и состава среды. При использовании одно-фракционных сред признанную годной после предварительной оценки сперму быка вначале разбавляют 1:1 непосредственно в спермоприемнике; перед разбавлением температура среды и спермы должна быть одинаковой ($27 \pm 1^\circ\text{C}$). Для этого посуду со средой хранят в термостате или на подогреваемой магнитной мешалке (рис. 35). Через 15-20 мин. после предварительного разбавления проводят финальное разбавление при температуре $18-20^\circ\text{C}$. Разбавляют сперму так, чтобы в дозе спермы после оттаивания содержалось 10-15 млн. подвижных сперматозоидов.

При разбавлении используют шприц непрерывного действия. Разбавляют сперму средой постепенно. Для этого среду приливают к предварительно разбавленной сперме небольшими порциями в полиэтиленовый спермоприемник, осторожно смешивают после добавления каждой порции среды. При использовании градуированного смесителя разбавленную в стеклянном спермоприемнике 1:1 сперму быка переливают в смеситель и небольшими порциями по стенке добавляют среду. После добавления каждой порции смеситель наклоняют так, чтобы сперма оставалась внизу его расширенной части; вращая смеситель, смешивают сперму.

Если используется желточно-цитратно-глицериновая или молочная среды для быка, то сначала добавляют антибиотики непосредственно в сперму, осторожно смешивают и выдерживают 3-5 минут до момента разбавления. На каждый миллилитр спермы берут 100 мкг тилозина, 500 мкг гентамицина и 300/600 мкг Линко-Спектина, растворенных в 0,02 мл бидистиллированной стерильной воды.

После 3-5-минутной выдержки проводят предварительное разбавление спермы фракцией А, содержащей в расчете на 1 мл такие же количества антибиотиков; степень разбавления - от 1:1 до 1:4. Обычно объем этой фракции составляет около 50% от всего объема среды. Предварительно разбавленную сперму помещают в холодильник и охлаждают в течение 2 часов до 4°C . Чтобы поддержать такой режим охлаждения необходимо сперму поставить в чашку с водой, подогретой до температуры $27 \pm 1^\circ\text{C}$.

Фракция Б может содержать 5-10% концентрации антибиотиков, определенной для фракции А. Фракция Б добавляется из расчета 1:1 по отношению к объему спермы + фракция А. Финальная концентрация антибиотиков - 50 мкг тилозина, 250 мкг гентамицина и 150/300 мкг Линко-Спектина в расчете на каждый миллилитр замороженной спермы.

Сперму быка разбавляют с расчетом получения 10-15 млн. сперматозоидов с прямолинейно-поступательным движением при подвижности не менее 4 баллов. Для расчета степени разбавления используют формулу:

$$P = \frac{C \cdot A \cdot V}{\dots},$$

0,015·10

где Р — количество среды из расчета на 1 мл спермы;
С — концентрация сперматозоидов в сперме, млрд./мл;
А — подвижность сперматозоидов после оттаивания спермы (4 балла);
V — объем одной дозы спермы, мл;
0,015 -- необходимое число подвижных сперматозоидов в дозе после оттаивания, млрд./мл;
10 -- для пересчета подвижных сперматозоидов в абсолютное число вместо баллов.

Разбавление спермы барана и козла. После получения сперму постепенно охлаждают до 25-30°C. В момент разбавления сперма и среда должны иметь одинаковую температуру. Разбавляют сперму в спермоприемнике. На 1 мл спермы добавляют 1-2 мл среды. Охлаждают разбавленную сперму постепенно до 2-4°C в течение 2-3 часов. Желательно флаконы со спермой поместить в химический стакан с водой температуры 25-30°C и поместить в холодильник на 2 часа.

При использовании сред для замораживания и длительного хранения после получения сперму выдерживают не более 15 минут. Средой ВИКА разбавляют в один прием в соотношении 1:2 при концентрации сперматозоидов 2,5-3,3 млрд. в мл и 1:3 при концентрации их выше 3,3 млрд. в мл. Среду (температуры 30°C) добавляют в сперму осторожно по стенкам спермоприемника.

При использовании ЛЖГТЦГ - среды сперму разбавляют в два приема: сначала ЛЖ - средой в соотношении 1:0,5 при температуре 28±2°C, а затем добавляют один объем ЛЖГТЦГ - среды при температуре 20±2°C.

ГЖУК - трис-буферной средой свежеполученную сперму разбавляют в один прием в соотношении 1:3 при концентрации сперматозоидов 3-4 млрд. в мл и 1:4 при концентрации их свыше 4 млрд. в мл.

Сперму козла разбавляют в 5-20 раз. Из одного эякулята можно получить до 40 доз, а в неделю от одного самца во время полового сезона - до 300 доз.

Разбавление спермы хряка. После получения сперму выдерживают в течение 20-30 мин. при комнатной температуре и разбавляют в 2-10 раз. В неразбавленной сперме должно содержаться не менее 100 млн. сперматозоидов, подвижность - не ниже 7 баллов.

Разбавление спермы жеребца. Разбавляют сперму, если концентрация сперматозоидов не менее 150 млн. в мл и подвижность не ниже 6 баллов. Степень разбавления - 1:2 - 1:3. Среду приливают к сперме небольшими порциями и осторожно смешивают после добавления каждой порции среды.

Изучение влияния на сперматозоидов физических и химических факторов. Контроль осмотического давления и pH сред.

В процессе разбавления, расфасовки и хранения сперма подвергается воздействию различных факторов. При последовательном переходе от одной процедуры к другой изменяется, прежде всего, температурный режим, а при непосредственном контакте спермы со средой могут измениться pH и осмотическое давление или наблюдаться нежелательные биохимические процессы. Эти изменения не должны нарушать цикл естественных биохимических процессов.

мических процессов, целостность структуры сперматозоидов и способность их к участию в оплодотворении.

Цель занятия: изучить действие на сперматозоидов физических и химических факторов и познакомиться с методами определения рН и осмотического давления в средах для разбавления спермы.

Объекты исследования, материалы и оборудование: животные - бык, корова (чучело) или самец и самка другого вида; оборудование, материалы и инструменты для получения спермы (соответствующего вида животных); термостат для микроскопа; микроскопы с осветителями, микроскоп МБИ-11 (БИО-ЛАМ - М) с телевизионной камерой; обогревательные столики, металлическая пластина; дозаторы пипеточные и наконечники к ним, пипетки глазные, палочки стеклянные; предметные и покровные стекла; марлевые салфетки, полотенца; растворы натрия хлорида: физиологический, 0.5%-ный и 3%-ный; 1%-ный раствор молочной кислоты; лед, поваренная соль; криоскоп с термометром Бекмана и обычные ртутные термометры; рН-метр (рН-метр-милливольтметр рН-121 или рН-150 М или др.), раствор универсального индикатора (или бумажные индикаторные полоски).

Методические указания. Занятия проводят в ветеринарной клинике и лаборатории кафедры или в учебном пункте. Сначала преподаватель объясняет студентам действие на сперматозоидов некоторых факторов, знакомит их с методами контроля физических и химических свойств сред для разбавления спермы. Затем студенты готовят искусственную вагину для получения спермы (от быка или самца другого вида животных), получают сперму; одновременно приготавливают и среду для разбавления спермы. Разделившись на группы (по 2 человека за столом) изучают действие температуры, растворов с различным осмотическим давлением, молочной кислоты на подвижность и выживаемость сперматозоидов. В конце занятия преподаватель демонстрирует студентам определение осмотического давления среды для разбавления спермы методом криоскопии и рН среды - потенциометрическим методом.

Изучение действия высокой и низкой температуры. В выделенной сперме, имеющей температуру 38,5°C, сперматозоиды проявляют высокую метаболическую активность и подвижность. При повышении температуры до 41-43°C подвижность их возрастает, а скорость гликолиза в сперме быка достигает максимума при 43-46°C. При температуре около 50°C происходит денатурация белка и другие необратимые изменения, которые приводят к гибели клеток. Продолжительность жизни сперматозоидов при температуре выше 20°C ограничена несколькими часами. Это связано с быстрым расходом ими ряда химических соединений и неспособностью восстанавливать или поглощать их из внешней среды.

При понижении температуры интенсивность движения сперматозоидов уменьшается, а при температуре 7°C они приостанавливают свои движения. Интенсивность метаболических процессов снижается, но полностью они не прекращаются и протекают еще на достаточно высоком уровне (состояние анабиоза). Продолжительность сохранения оплодотворяющей способности сперматозоидов при таких температурах (0-5°C) увеличивается до нескольких дней.

После подогревания охлажденной спермы подвижность сперматозоидов восстанавливается. Однако, это наблюдается в том случае, если охлаждалась сперма медленно. В других случаях охлаждение может вызвать у сперматозоидов необратимые изменения и гибель их. Это происходит вследствие "холодового удара" ("температурного шока") в результате резкого охлаждения. Температурный шок наблюдается при температурах выше

0°C, но возможен и при отрицательных температурах, когда сохраняется жидкая фаза и имеются условия для протекания осмотических процессов.

Наиболее чувствительны к быстрому снижению температуры сперматозоиды хряка. В неразбавленной сперме быка температурный шок у сперматозоидов возможен при температуре ниже 24°C. В разбавленной желточно-цитратной или молочной средой сперме действие температурного шока может проявиться при резком снижении температуры ниже 16°C. В связи с этим в практике должны обращать внимание на скорость охлаждения разбавленной спермы.

Для изучения действия различных температур на сперматозоидов из полученной спермы готовят три мазка; предметные стекла предварительно подогревают до температуры спермы. *Один мазок* помещают поочередно на два подготовленные обогревательные столики с температурой 38°C и 43-45°C и определяют под микроскопом подвижность сперматозоидов; затем мазок снимают с обогревательного столика и оставляют при комнатной температуре на 5-7 минут. *Второй мазок* помещают на лед и охлаждают несколько минут. После охлаждения вначале определяют под микроскопом состояние сперматозоидов при комнатной температуре, а затем кладут на обогревательный столик и определяют подвижность при температуре 38°C. Так же поступают и с уже исследованным первым мазком: просматривают его при комнатной температуре, а потом после подогревания до 38°C.

При комнатной температуре в первом мазке сперматозоиды будут проявлять заметную подвижность, а после подогревания исходная подвижность восстановится. Во втором мазке при комнатной температуре только отдельные сперматозоиды проявят слабые движения, а после подогревания немногие из них восстановят подвижность; большинство же клеток будут неподвижными - они погибнут вследствие температурного шока.

В третьем мазке определяют подвижность сперматозоидов сначала при температуре 38°C, а затем мазок помещают на подогретую до 55°C пластину и оставляют на ней несколько минут. После этого опять определяют подвижность сперматозоидов. Все клетки погибнут и не проявят подвижность.

Изучение действия растворов (сред) с различным осмотическим давлением. Осмотическое давление спермы определяется количеством растворенных в плазме веществ: минеральных и органических. Выражается осмотическое давление в атмосферах; колеблется в пределах 6,7-8,7 атм. Определяется этот показатель на основании величины депрессии, т.е. точки замерзания, которая для спермы животных равна примерно минус 0,6°C, и исходя из правила, что раствор, содержащий в 1 л грамм-молекулу не электролита, дает депрессию минус 1,86°C и имеет осмотическое давление 22,4 атмосферы. Для получения равных по осмотическому давлению сперме растворов (изотонических) необходимо брать 1/3 грамм-молекулы

не электролита на 1 л дистиллированной воды. Если берется электролит, то количество вещества уменьшается во столько раз, на сколько ионов диссоциирует его молекула. Например, для приготовления изотонического раствора хлористого натрия необходимо взять не одну треть, а одну шестую грамм-молекулы, т.е. 58,5:6.

Если поместить сперматозоидов в *гипотонический* раствор или дистиллированную воду, то они быстро погибнут вследствие повышения внутреннего давления. Под влиянием гипотонического раствора хвостики сперматозоидов набухают и закручиваются. В *гипертоническом* растворе сперматозоиды погибают от обезвоживания. Они сморщиваются, а хвостики их приобретают зигзаговидную форму. Особенно губительно для сперматозоидов быстрое изменение осмотического давления. В *изотоническом* растворе (физиологический раствор, среда Дюльбекко и др.) сперматозоиды будут проявлять высокую подвижность в течение достаточно продолжительного периода времени.

Для изучения действия на сперматозоидов растворов с различной концентрацией солей из полученной спермы готовят три мазка. Для этого на подогретое предметное стекло наносят дозатором пипеточным или глазной пипеткой три капельки спермы и рядом с каждой из них капельку одного из трех растворов натрия хлорида: изотонического, 0.5%-ного и 3%-ного. Каждую пару капелек (сперму и раствор) осторожно накрывают покровным стеклом так, чтобы они соединились под покровным стеклом, но граница между ними четко просматривалась. Все три мазка исследуют под микроскопом и наблюдают за состоянием сперматозоидов на границе раствора и спермы, а также в растворе и в сперме.

Изучение действия рН среды. Если сперму быка или барана хранить при комнатной температуре, то в результате гликолиза накапливается молочная кислота, буферные свойства спермы ослабевают, а затем показатель рН начинает снижаться. Подвижность сперматозоидов замедляется, а затем приостанавливается полностью вследствие наступления состояния анабиоза. Тормозится подвижность сперматозоидов и в гипертонических солевых растворах. При повышении рН и температуры среды, или при добавлении воды в гипертонический раствор сперматозоиды восстанавливают свою подвижность.

Для перевода клеток в активное состояние температура должна быть тем выше, чем ниже рН. Так, в слабощелочной среде (рН 7,6) сперматозоиды двигаются при температуре 15-20°C, а при рН 6,0 движение их проявляется только при 35-40°C. При рН 4,5 одного повышения температуры уже недостаточно, чтобы вывести сперматозоидов из анабиоза; требуется одновременное повышение температуры и подщелачивание среды. Длительное воздействие на сперматозоидов среды с более низким значением рН приводит к их гибели. Слабые органические кислоты проявляют губительное

действие и при рН выше 5. Так, при температуре 4°C молочная кислота может необратимо иммобилизовать сперматозоидов уже при рН 6.

Сразу же после получения из неразбавленной спермы готовят несколько мазков. На одном предметном стекле помещают две капельки спермы. Рядом с одной капелькой помещают капельку 1%-ного раствора молочной кислоты и обе капельки накрывают покровным стеклышком. На другую капельку спермы наносят такую же капельку кислоты и обе капли смешивают стеклянной палочкой. При помощи универсального индикатора определяют рН смеси: оранжевая или желто-оранжевая окраска капли свидетельствует о том, что рН ниже 6,0. После этого просматривают под микроскопом мазок на границе раствора кислоты и спермы и наблюдают за гибелью сперматозоидов после попадания их в раствор кислоты.

На другое предметное стекло также наносят две капли спермы. Рядом с одной помещают капельку подкисленного физиологического раствора (к 10 мл 1%-ного раствора натрия хлорида приливают 2 мл 1%-ного раствора молочной кислоты) и обе капли накрывают покровным стеклом. На другую каплю спермы наносят каплю подкисленного физиологического раствора и обе капельки смешивают. При помощи индикатора определяют рН смеси - показатель рН около 6,0. Мазок исследуют под микроскопом сначала при температуре 20-25°C, а затем на обогревательном столике при 38°C. При комнатной температуре сперматозоиды будут неподвижны, но после подогревания некоторые из них могут возобновлять движения.

На третье предметное стекло также наносят две капли спермы. Рядом с ними помещают по капельке подкисленного физиологического раствора и по 1-2 капельки натрия цитрата. Первые три (четыре) капельки смешивают, накрывают покровным стеклом и исследуют под микроскопом, а другие три (четыре) капельки после смешивания используют для определения рН смеси. После добавления натрия цитрата рН смеси приобретает щелочную реакцию (желто-зеленая или зеленая окраска). Подвижность сперматозоидов в такой смеси может быть достаточно активной.

Изучение действия антисептических растворов. Пункты (лаборатории) по искусственному осеменению нередко расположены вблизи ветеринарных аптек, где могут храниться различные дезинфицирующие вещества. На сперматозоидов они действуют губительно. Это относится и к моющим средствам: даже следы мыла на руках или на посуде проявляют на половые клетки губительное действие.

В процессе занятия целесообразно изучить действие на сперматозоидов ряда дезинфицирующих средств. Из неразбавленной или разбавленной спермы готовят несколько мазков. На одно предметное стекло наносят 2-3 капельки спермы. Рядом с каждой капелькой ее помещают по одной капельке какого-либо раствора: марганцевокислого калия 1:2000, лизола 1%-ного, спирта 70%-ного, йода 5%-ного, мыльной воды и т.д. и каждую пару капелек накрывают покровным стеклышком. Все три мазка исследуют под

микроскопом и наблюдают за состоянием сперматозоидов на границе раствора и спермы, а также в растворе и в сперме.

Контроль осмотического давления и рН сред для разбавления спермы). Осмотическое давление определяют методом криоскопии, рН - потенциометрическим методом с помощью соответствующего прибора.

Криоскоп имеет внутреннюю пробирку (цилиндр на 100 мл без основания, с плоским дном), в которую вставляется резиновая пробка. Пробка имеет центральное отверстие для термометра Бекмана и небольшое отверстие в боковой части с металлической втулкой, через которую проходит проволочная мешалка; в процессе работы втулку смазывают капелькой машинного масла. Внутренняя пробирка с термометром Бекмана и мешалкой вставляется в более широкую пробирку (цилиндр на 250 мл без основания, с плоским дном) и укрепляется в ней посредством широкого (4-5 см) толстого резинового манжета. Широкая пробирка служит воздушной рубашкой для внутренней пробирки. Собранный прибор погружают через отверстие в крышке с резиновой втулкой в толстостенный стакан (высота 200 мм, внутренний диаметр 115-120 мм). Предварительно стакан заполняют охладительной смесью, состоящей из мелко раздробленного льда или снега и соли в весовом отношении 5:1. Температура охладительной смеси должна поддерживаться на 3-5°C ниже температуры замерзания синтетической среды путем добавления льда или снега. Причем смесь льда (снега) и соли периодически перемешивается проволочной мешалкой, которая вставляется через боковое отверстие в крышке сосуда.

Термометр Бекмана имеет два резервуара ртути: основной нижний и дополнительный в верхней части; оба резервуара соединены между собой капилляром; при необходимости можно ртуть перемещать из одного в другой. Возможность перераспределения ртути в резервуарах позволяет настроить термометр так, чтобы температура замерзания растворителя (воды) лежала в верхней части шкалы.

Основная шкала термометра длинная - около 25 см и разделена на 5-6°C, цена деления 0,01°. На шкале с помощью лупы можно делать отсчет с точностью до 0,001-0,002°C.

Перед работой необходимо настроить термометр, т. е. установить измеряемую температуру замерзания дистиллированной воды таким образом, чтобы при 0°C ртуть находилась в верхней части шкалы, примерно между делением 3 и 5. До начала настройки следует убедиться в том, что нижний резервуар при комнатной температуре полностью заполнен ртутью.

В стакан емкостью 200-250 мл наливают 150-200 мл дистиллированной воды и, добавляя кусочки льда, охлаждают до 2-3°C; контролируют температуру обычным термометром. В термометре Бекмана нагревают рукой ртуть в нижнем резервуаре и следят, чтобы она заполнила до верха капилляр, после чего термометр переворачивают вверх нижним резервуаром. Продолжая нагревать резервуар добиваются соединения столбика ртути с ртутью верхнего резервуара. После этого осторожно и плавно, чтобы не разорвать столбик ртути в капилляре, придают термометру обычное вертикальное положение и погружают нижний резервуар в подготовленную охлажденную воду. Выдерживают 3-5 мин., постоянно помешивая термометром (резервуаром) в воде кусочки льда. Затем осторожно вынимают термометр и резко опускают нижним резервуаром на ладонь руки. Столбик ртути должен оборваться между значениями шкалы 3 и 4. Если столбик оборвался выше, то подогреванием резервуара рукой смещают столбик ртути за изгиб капилляра к верхнему резервуару и пытаются оборвать столбик в небольшом расширении капилляра верхнего резервуара. Затем быстро помещают термометр в охлажденную воду. При температуре 2-2,5°C столбик ртути должен находиться между делением шкалы 4,5 и 5°C (при 0°C - между 3 и 4,5°C). После настройки термометр закрепляют с помощью штатива в вертикальном положении в стакане с охлажденной водой. Пробка с проволочной мешалкой должна постоянно оставаться на термометре (при неосторожном вставлении настроенного термометра в центральное отверстие пробки можно разорвать столбик ртути).

Для того чтобы определить температуру замерзания среды для разбавления спермы (и по ней вычислить осмотическое давление) необходимо сначала определить точку замерзания дистиллированной воды по шкале настроенного термометра. Для этого во внутреннюю пробирку криоскопа наливают 30 мл дистиллированной воды и помещают пробирку в охладительную смесь; охлаждают в течение нескольких минут до 1-3°C. Температуру контролируют обычным термометром. Пробирку извлекают из охладительной смеси, высушивают снаружи фильтровальной бумагой и закрепляют в наружной пробирке. Стенки внутренней пробирки не должны соприкасаться с стенками наружной пробирки. Соединенные обе пробирки вставляют через отверстие в крышке в сосуд (стакан) с охладительной смесью. Затем во внутреннюю пробирку вставляют настроенный термометр с пробкой и проволочной мешалкой и укрепляют его с помощью штатива. Основной резервуар с ртутью термометра должен быть полностью погружен в дистиллированную воду, но не касаться дна. По термометру Бекмана наблюдают за понижением температуры воды. Так как охлаждение дальнейшее ее идет медленно, вода переохлаждается и не замерзает ниже точки ее замерзания (0°C). Столбик ртути медленно опускается. Для равномерного охлаждения воды ее постоянно помешивают проволочной мешалкой. Наступает момент, когда в переохлажденной воде начинается процесс кристаллизации. При

этом выделяется скрытая теплота отвердевания и температура быстро повышается (температурный скачек). Воду продолжают помешивать и с помощью лупы наблюдают, когда столбик ртути полностью остановится. Это и будет точкой замерзания воды (например: 4,12₃. Последняя цифра приблизительная. Для получения точного результата определяют температуру замерзания воды два-три раза.

После этого осторожно извлекают термометр Бекмана из пробирки и помещают его в стакан с охлажденной до 2-3°C водой. Во внутреннюю пробирку криоскопа вместо дистиллированной воды наливают 30 мл охлажденной среды для разбавления спермы (без глицерина) и затем в нее вставляют термометр Бекмана. Процедуру охлаждения среды до замерзания осуществляют также, как и воды. После температурного скачка фиксируют на шкале термометра точку замерзания среды (например: 3,56₂).

Разница между первым числом (4,12₃) и вторым (3,56₂) укажет на фактическую точку замерзания среды - она будет равна 0,561°C. Для определения осмотического давления в милли осмомолях необходимо это число разделить на 0,00186. В данном случае осмотическое давление составит 301. При этом принимается во внимание, что одна осмомоля соответствует депрессии 1,86°C, а милли осмомоля - 0,00186°C.

Концентрацию водородных ионов (рН) в среде определяют при помощи рН-метров согласно наставлениям по применению приборов.

ХРАНЕНИЕ СПЕРМЫ

Цель занятий: изучить технологию охлаждения, замораживания и хранения спермы при температуре 16-20°C, 2-4°C и минус 196°C; приобрести навыки практического использования спермы, сохраняемой при различных условиях.

Объекты исследования, материалы и оборудование: разбавленная сперма быка (барана, жеребца, хряка); термоса, бытовой холодильник, сосуды Дьюара с канистрами или марлевыми мешочками, пены (стаканчики) для соломин, металлическая воронка для сбора гранул, лопатка для съема гранул с пластины, корнцанги и пинцеты, фторопластовые пластины; лед, жидкий азот; синтетические соломины (пайеты) для расфасовки спермы, стеклянные шарики для укупорки соломин, вакуумный насос, машины для маркировки (М6-ММС-2 или М6-ММС-3), наполнения и укупорки соломин (М6-АПА); прямоугольная теплоизолированная емкость (30 · 40 · 30 см) или широкогорлый цилиндрической формы сосуд Дьюара; оборудование для замораживания спермы в облицованных гранулах; биотермостаты, микроскопы, подогревательные столики; бюретка с резиновой трубкой, зажимом и стеклянным наконечником для дозирования спермы или автоматическое устройство для расфасовки спермы при замораживании в гранулах.

Методические указания. Занятия проводят в лаборатории кафедры или в учебном пункте. Сначала преподаватель знакомит студентов со способами и оборудованием для расфасовки, охлаждения и замораживания разбавленной спермы, условиями ее хранения, правилами подготовки и последующего использования для осеменения животных. Затем вместе со студентами расфасовывают сперму, охлаждают и упаковывают в термоса для хранения или замораживают и помещают на хранение в сосуд Дьюара. После этого каждый студент должен выполнить процедуру оттаивания замороженной в гранулах и соломинах спермы.

Вопросы:

1. Сперма каких животных храниться при температуре, близкой к 0 °С? Какие среды для разбавления используются?
2. Какое оборудование необходимо для хранения спермы при температуре 2-4 °С?
3. Сперма каких животных и в течение какого срока храниться при комнатной температуре? Каков принцип краткосрочного хранения и какие среды используются?
4. Каковы преимущества хранения спермы при низкой температуре (минус 196 °С)?
5. Какие среды применяют для разбавления и замораживания спермы быка, барана, жеребца?
6. Каковы преимущества двух фракционных сред и какие из них наиболее часто применяют?
7. Какие внутриклеточные процессы происходят в сперматозоидах при замораживании? Какова роль криопротектора (глицерина) при замораживании спермы?
8. Для чего необходима эквilibрация спермы после финального разбавления? Сущность этого процесса и при какой температуре он протекает?
9. Как расфасовывается сперма перед замораживанием?
10. Какое оборудование необходимо для расфасовки, замораживания и упаковки спермы?
11. Как храниться замороженная сперма в племпредприятии, на фермах?
12. Какие термоса используются для перевозки спермы?

13. Как часто необходимо пополнять азотом сосуд Дьюара? Какие меры предосторожности необходимо соблюдать при работе с такими сосудами?

14. Как оттаивают сперму, замороженную в гранулах и соломинах? Какое оборудование необходимо для оттаивания?

15. В течение какого времени необходимо использовать оттаянную сперму?

В настоящее время сперму производителей сельскохозяйственных животных хранят в течение одного - трех дней или длительное время в замороженном состоянии. При краткосрочном хранении при температуре +2...4°C сперму быков используют в течение 72 часов, жеребцов - до 48 час. и баранов - в течение 24 часов. Хранят сперму в холодильниках или пищевых термосах со льдом.

Сперму хряков сохраняют одни - двое суток при температуре +16...20°C, используя для хранения и транспортировки термосы-ящики.

Для хранения спермы производителей в течение длительного времени без потери оплодотворяющей способности применяют замораживание ее в жидком азоте при -196°C.

Хранение спермы при температуре 16-20°C

Хранение спермы хряка. Для разбавления и хранения спермы хряка при температуре 16-20°C в течение трех суток применяют синтетические среды ГХЦС и ГХЦ. Разбавляют сперму через 20-30 минут после получения и определения ее качества. Для разбавления используют эякуляты с концентрацией сперматозоидов не менее 100 млн. в 1 мл спермы. Степень разбавления варьирует от 1:1 до 1:9. После разбавления в 1 мл спермы должно содержаться около 30-50 млн. сперматозоидов, а в дозе для осеменения (100-150 мл) - не менее 3 млрд. клеток. Разбавленную сперму расфасовывают в стеклянные колбы или полиэтиленовые флаконы и хранят в темноте при температуре 16-20°C в стерильном боксе-термостате или в специальных термосах для хранения и транспортировки. Колбы прикрывают не герметично целлофаном или пергаментной бумагой без закрепления резиновыми кольцами. На флаконы слегка навинчивают крышки. Во время хранения сперму осторожно перемешивают не менее двух раз в сутки. При хранении и транспортировке необходимо строго следить за температурным режимом. Отклонение температуры от оптимальной (16-20°C) отрицательно влияет на оплодотворяющую способность спермы.

Хранение спермы при температуре 2-5°C (6-10°C)

Хранение спермы быка. Сперму, сохраняемую при 2-5°C, фасуют в одноразовые стерильные полиэтиленовые ампулы, полиэтиленовые пробирки объемом по 1 мл или во флаконы из под антибиотиков; их наполняют полностью. Полиэтиленовые ампулы запаивают, а пробирки и флаконы закрывают стерильной нетоксичной пробкой, закрепляют пробку резиновым кольцом. На каждой ампуле заранее пишут тушью номер быка и дату взятия спермы. На стеклянные флаконы наклеивают бумажные этикетки. Подготовленные флаконы и ампулы со спермой оставляют при комнатной температуре (18-25°C) на 20-30 минут, упаковывают и помещают в холодильник при температуре 2-5°C или в пищевые термоса со льдом.

Быстрое охлаждение разбавленной спермы не желательно. Поэтому целесообразно, чтобы понижение температуры от 32°C до 2-5°C происходило постепенно в течение 2-3 час. Для этого сначала необходимо поместить разбавленную сперму в стеклянный стакан или ванночку с водой такой же температуры, как и температура спермы (32°C), а затем перенести их в водяную баню температуры 22°C на 20 минут, после чего производить фасовку и дальнейшее охлаждение спермы. Хранят в течение трех дней. Используют сперму с активностью не ниже 7 баллов.

Хранение спермы барана. При искусственном осеменении овец широко используют свежеполученную неразбавленную сперму, которая обеспечивает наиболее высокую оплодотворяемость маток. Разбавление и хранение спермы несколько ухудшает результаты. Однако рациональное использование ценных производителей легче достигается при условии разбавления и хранения спермы.

Для разбавления и хранения спермы при температуре не ниже 0°C используют синтетические среды ГЦЖ и ГФЖ. Разбавляют сперму в соотношении 1:1 - 1:2 при температуре 25-30°C. После разбавления сперму можно использовать для осеменения в течение 4 часов, если хранить ее при температуре не ниже 16°C. Если же сперму охлаждают до 2-5°C, то срок хранения увеличивают до 24 часов. Хранят ее в пищевых термосах со льдом. Перед помещением в термос флаконы со спермой обертывают ватой или вставляют в гнезда в специальных поролоновых амортизаторов и затем упаковывают в полиэтиленовые мешочки. Мешочки кладут на лед в термос, а сверху их также помещают небольшое количество льда.

Хранение спермы жеребца. Для разбавления и краткосрочного (в течение 48 часов) хранения спермы при температуре 2-5°C используется среда ЛХЦЖ. Разбавляют свежеполученную сперму с подвижностью сперматозоидов не ниже 6 баллов и концентрацией 150 млн. в мл в соотношении 1:3; температура среды в момент разбавления должна быть 25-30°C. Расфасовывают сперму в стерильные флаконы емкостью 50-100 мл с притертыми пробками; пробки закрепляют резиновыми кольцами. Флаконы со спермой заворачивают в марлевые салфетки или бумагу и упаковывают в полиэтиленовые пакеты. Пакеты со спермой помещают в термос со льдом. Охлаждение спермы должно проходить постепенно. Поэтому особое внимание уделяют подготовке термосов и теплоизоляционных прокладок; лед в термос помещают в полиэтиленовых мешочках. Более надежно использовать специальный термос (рис. 36). Он состоит из оцинкованного железного бачка и двухстенного теплоизоляционного фанерного футляра с крышкой. В бачке по бокам расположены две емкости для загрузки льдом, а посередине его - емкость цилиндрической формы для баночек со спермой, где температура сохраняется на уровне 2-5°C.

Хранение спермы хряка. При необходимости хранения спермы при температуре 5-10°C (но не ниже 5-6°C) к 1 л среды добавляют 30-40 мл желтка куриных яиц. После разбавления ГХСЦ или ГХЦ средой с желтком сперму хряка хранят в термосах со льдом. Тающий лед кладут на дно термоса, примерно одну четверть объема, покрывают влагонепроницаемым материалом, а сверху настилают сухую серую вату слоем 1-1,5 см. На такую прокладку помещают флаконы со

спермой. При таких условиях достигается близкая к рекомендуемой скорость охлаждения: около 4-5°C в час до 18°C и 2°C в час до 6-10°C. Весь период охлаждения длится 7-8 часов. Флаконы должны быть заполнены не полностью. Один раз в день сперму слегка взбалтывают.

Замораживание и хранение спермы.

Замораживание спермы быка в гранулах. Разбавленную сперму выдерживают в холодильнике при температуре +2...4°C в течение 4-5 часов.

В теплоизолированную емкость или широкогорлый сосуд Дьюара наливают на $\frac{2}{3}$ жидкий азот. Фторопластовую пластину обтирают спиртовым тампоном, опускают в жидкий азот и охлаждают в течение нескольких минут до прекращения кипения азота. Затем пластину держателем поднимают к верхнему краю сосуда и после испарения азота протирают сухим стерильным ватным тампоном. С помощью бюретки, шприца или автоматического устройства разливают сперму в лунки пластины (рис. 37). Пластина в это время должна иметь температуру минус 160...170°C. После того, как в последней лунке сперма затвердеет, пластину опускают ближе к жидкому азоту и выдерживают на расстоянии 5-10 см от поверхности азота в течение 1-2 минут. Далее пластину погружают на 1 минуту в жидкий азот, где происходит дальнейшее охлаждение гранул и отделение их от пластины. Затем пластину поднимают из жидкого азота до верхнего уровня сосуда, с помощью лопатки и воронки сгребают гранулы в охлажденный контейнер и переносят в сосуд Дьюара на длительное хранение.

Замораживание спермы быка в полипропиленовых соломинках. После финального разбавления спермы ЛГЖ средой при температуре 18-20°C сперму расфасовывают в стерильные полипропиленовые соломины внутренним диаметром 2 мм, емкостью 0,25 мл. Соломины должны быть промаркированы. Это делается на машине М6-ММС-2 с помощью сменяемого клише, изготовляемого для каждого быка, или М6-ММС-3 кодовой надписью набираемых цифр. На соломинке печатается наименование племпредприятия (первые 3 цифры), порода быка (две последующие цифры), номер быка (пять цифр), а затем последовательно по две цифры год, месяц и день получения спермы.

Маркированные соломины в коробках помещают в настольную бактерицидную камеру и стерилизуют в течение двух часов.

Для автоматического наполнения соломин разбавленной спермой и их закупорки имеется специальная машина М6-АПА (рис. 38). В коробку машины помещается 700 соломин, а в ее бункерочек - 6000 стеклянных шариков. До использования стеклянные шарики выдерживают сутки в растворе соляной кислоты (10 мл концентрированной кислоты на 1 л дистиллированной воды), промывают проточной водой, затем 3-4 раза дистиллированной водой и засыпают на сито с отверстиями 1,7 x 2,0 мм, чтобы удалить облом-

ки. Высушенные шарики помещают в стеклянную банку и стерилизуют в сушильном шкафу при температуре 180°C в течение 1,5 ч.

Перед работой корпус машины протирают марлевой салфеткой; детали, непосредственно соприкасающиеся с соломинами и стеклянными шариками (бункера для шариков и соломин, укупориватели), обрабатывают спиртовым тампоном. Наконечники и сопла, медицинские поливинилхлоридные трубки и уплотнители стерилизуют кипячением.

Коробку с маркированными стерильными соломинами фиксируют рычагом у механизма подачи их на барабан, подсоединяют поливинилхлоридную трубку с соплом для подачи спермы, конец трубки с надетым наконечником погружают в емкость с разбавленной спермой. После включения машины сперма нагнетается в соломинку с обеих сторон и закупоривается двумя стерильными цветными стеклянными шариками. В процессе работы следят, чтобы столбик воздушного пузырька был длиной 5-12 мм, а стеклянные шарики заталкивались на глубину 1,5-2 мм.

Наполненные спермой соломины берут в руку воздушными пузырьками вниз и встряхивают несколько раз для того, чтобы пузырьки переместились на середину. После этого соломины раскладывают по 143 шт. в металлические рамки и сверху прижимают держателем; рамки кладут одна на другую по 5 штук, помещают в коробку и ставят в холодильник ХЖС-300, в котором поддерживается температура около 4°C. В холодильнике сперма постепенно и равномерно охлаждается до температуры 4°C в течение часа (со скоростью 0,3-0,5°C в минуту). Выдерживают сперму при такой температуре в течение 3-4 часов и потом замораживают в биологических хранилищах на замораживающем устройстве - медном щите, который закрепляют на расстоянии 6-8 см от поверхности жидкого азота.

Для поддержания стабильной температуры на щите (минус 130...150°C) после загрузки рамок с соломинами и обеспечения оптимальной скорости замораживания спермы необходимо под давлением 0,2-0,3 атм. подавать газообразный азот с вентиля газосброса транспортной цистерны. Конец шланга должен лежать на дне биологического хранилища. Если замораживание производится без обдува, тогда щит замораживающего устройства должен касаться поверхности жидкого азота.

Замораживание спермы ведется в течение 7 мин. После этого соломины переносят с помощью специальной воронки в пластмассовые стаканы, наполненные жидким азотом и закрепленные в гнездах щита замораживающего устройства. Затем стаканы с соломинами быстро переносят в подготовленные канистры и размещают их в биологических хранилищах ХБ-0,5 или ХБ-0,2-1.

Зарубежные организации по искусственному осеменению используют высокотехнологичное оборудование (MINITUB) для маркировки соломин, наполнения и укупорки их стеклянными шариками или по методу Кассу, для автоматического контроля замораживания и упаковки замороженных соломин (рис. 39).

Замораживание спермы барана. Разбавленную сперму охлаждают в течение 2-3 часов до +2...4±2°C. При этом флаконы (полиэтиленовые капельницы) со спермой погружают в кювету с теплой

(20...25°C) водой и ставят в бытовой холодильник. После охлаждения кювету с флаконами погружают в тающий лед до момента замораживания спермы.

Сперму замораживают на поверхности сухого льда или на охлажденной до минус 80°C фторопластовой пластине. Для обеспечения такой температуры пластину после охлаждения в жидком азоте поднимают и устанавливают с помощью штатива на уровне верхнего края широкогорлого сосуда и выдерживают 4-6 минут. После этого в лунки пластины накапывают сперму по 0,2 мл. Как только сперма затвердеет, пластину опускают ниже и выдерживают над поверхностью жидкого азота на расстоянии 3-5 см в течение 1,5-2,0 минут, а затем погружают на 1 минуту в жидкий азот. После окончания замораживания пластину извлекают из азота и собирают гранулы в алюминиевые тубы или мешочки из тонкой алюминиевой фольги. Емкости должны быть промаркированы. Замороженную сперму помещают в сосуд Дьюара на карантинное хранение на 28 дней.

Замораживание спермы жеребца. Для замораживания и длительного хранения в жидком азоте сперму разбавляют ЛХЦЖ средой с добавлением глицерина. Разбавляют также в соотношении 1:3, в один прием. Разбавленную сперму объемом не более 100 мл при высоте слоя 2,5 см в колбе выдерживают в холодильнике 2 часа и замораживают на поверхности сухого льда или в алюминиевых пакетах в парах жидкого азота. При замораживании в форме гранул сперму наносят каплями по 0,2 мл в лунки на поверхность сухого льда; выдерживают в течение 5 минут, после чего гранулы собирают и упаковывают в алюминиевые тубы или пластмассовые стаканы и помещают на хранение в жидкий азот. В каждой упаковке должно быть 125-130 гранул, что составляет около 25 мл оттаянной спермы.

При использовании алюминиевых туб (пакетов) в зависимости от их величины сперму расфасовывают по 25 мл или 13 мл. В обоих случаях толщина пакета со спермой не должна быть больше 4-5 мм. Перед использованием пакеты охлаждают, а после заполнения спермой осторожно вытесняют из них воздух и концы закатывают дважды. Пакеты со спермой помещают в специальные держатели с пенопластовыми поплавками и переносят в широкогорлый сосуд Дьюара. Выдерживают в течение 5-7 минут в парах жидкого азота, на расстоянии 10-12 мм от его поверхности. После этого пакеты помещают в жидкий азот на хранение.

При замораживании спермы и в гранулах и в пакетах в одной дозе (125-130 гранул, один пакет объемом 25 мл или 2-3 пакета по 13 мл) должно содержаться около 800 млн. сперматозоидов, а после оттаивания - 300-400 млн. подвижных клеток.

Для хранения спермы на пунктах искусственного осеменения используют узкогорлые сосуды Дьюара различной емкостью — 5, 20, 50 и 500 литров (рис. 40). Сосуд изготовлен из нержавеющей стали, двустенный. Межстенное пространство заполнено порошковой или порошково-вакуумной термоизоляцией. На горловине сосуда подвешиваются металлические канистры или марлевые мешочки для спермы. Крышка сосуда имеет пенопластовую втулку, которая размещается в горловине. Чтобы температура спермы во время хранения не повышалась, в сосуде любого типа должно оставаться не менее 30-40% жидкого азота (от полной емкости), поэтому сосуд необходимо регулярно (через 30-40 суток) пополнять азотом.

Оттаивание спермы

Оттаивание спермы в гранулах. Для оттаивания необходимы ампулы с 1 мл 2,9%-ного раствора натрия цитрата и водяная баня (биологический

термостат, оттаиватель) с контролируемой температурой 38-40°C. Приборы подключаются к электрической сети, но многие зарубежные образцы имеют автономный источник питания (рис. 41).

Сначала необходимо включить в сеть оттаиватель и довести температуру воды до 38-39°C. После этого берут ампулу с натрия цитратом и у основания шейки делают круговой надрез пилкой по стеклу. Надпиленный участок протирают спиртовым тампоном и отламывают верхнюю часть ампулы. Если отверстие недостаточно для прохождения гранулы, то его расширяют путем откалывания стерильным пинцетом небольших участков стекла. Для этого одну ветвь пинцета вставляют в ампулу, по кругу продвигают пинцет и обламывают стекло. Ампулу с цитратом натрия помещают в водяную баню заблаговременно (за 3-5 минут) для подогрева. Корнцанг для извлечения спермы обтирают спиртовым тампоном и опускают в сосуд Дьюара для охлаждения. После чего извлекают гранулу из сосуда и помещают в ампулу с цитратом натрия (находящуюся в водяной бане). Дождавшись момента полного растворения гранулы, ампулу извлекают из водяной бани. Размороженная сперма должна быть использована в течение 15 минут.

Оттаивание спермы в соломинах. Стерильным, охлажденным корнцангом извлекают соломинку из сосуда Дьюара, легко встряхивают ее и быстро помещают в водяную баню или оттаиватель с температурой 38°C на 10-11 секунд. В водяной бане соломинку удерживают в вертикальном положении и постоянно перемещают в воде. После размораживания сперма должна быть использована в течение 15 минут.

При плохой герметичности соломин в период нагревания их в результате быстрого испарения жидкого азота резко повышается давление, что приводит к разрыву оболочки соломины.

Перевозка спермы

Перевозят сперму с племпредприятия в районные станции или на пункты искусственного осеменения на специально оборудованных машинах. Нередко сочетают доставку азота и спермы. Сосуды Дьюара или емкости, заполненные жидким азотом, необходимо надежно закрепить на транспортном средстве. Сосуды, которые предполагается транспортировать самолетом, надо заполнять не более чем на половину емкости.

Транспортируют сперму хряка в специальных термосах (рис.), бытовых сумках-холодильниках, термосах-ящиках, в которых для теплоизоляции применяется поролон. На период транспортировки колбы и флаконы плотно закупоривают, а после доставки на пункт ослабляют резиновые кольца, фиксирующие бумагу на кольцах, или расслабляют крышки флаконов. Сперму транспортируют через 30 минут после разбавления. Допускается кратковременное (1-3 часа) постепенное снижение температуры до 14-15°C или повышение до 24°C.

Техника безопасности при работе с жидким азотом

Жидкий азот - прозрачная, бесцветная, легко испаряющаяся жидкость; удельный вес 0,8 кг/л, кипит при температуре минус 196°С. Не токсичен, однако в результате испарения и накопления его в помещении содержание кислорода в воздухе уменьшается, что может вызывать у людей головную боль, головокружение и даже потерю сознания. При попадании на открытые участки тела вызывает обморожение (ожог).

Помещение, в котором находятся сосуды Дьюара или стационарные хранилища с жидким азотом, должно быть оборудовано приточно-вытяжной естественной или принудительной вентиляцией. Курение в таком помещении категорически запрещается. Температура жидкого азота поддерживается на постоянном уровне (- 196°С) в результате его непрерывного испарения. Поэтому горловина сосуда Дьюара не должна быть плотно закрыта, особенно при перевозке. Персоналу, работающему с азотом, следует закрывать горловину сосуда Дьюара крышками, предназначенными только для них. Если плотно закрыть сосуд, то возможен взрыв его. Не допускается эксплуатация сосудов у которых верхняя часть горловины обрастает льдом.

При длительной эксплуатации сосудов Дьюара приходится постоянно доливать жидкий азот, в котором имеются примеси кислорода. Кислород кипит при более высокой температуре - минус 183°С. Поэтому концентрация его в сосуде постепенно возрастает и остающаяся смесь газов становится огнеопасной. Племпредприятия должны контролировать содержание кислорода в сосудах и при достижении содержания его 15% перенести сперму в другой сосуд, а из контролируемого слить остатки азота вдали от предметов органического происхождения (дерева, бумаги, тряпок, особенно промасленных) и наполнить его свежим азотом. Во избежание взрыва запрещается удалять обогащенную кислородом жидкость из сосуда путем выпаривания.

Работать с жидким азотом необходимо в защитных очках и свободных кожаных перчатках, чтобы при необходимости их можно было легко сбросить. Брюки должны быть без манжет и прикрывать верхнюю часть обуви. Если жидкий азот попадает на незащищенную кожу, ее следует обмыть водой. Особую осторожность следует соблюдать при оттаивании спермы, замороженной в соломинах. При плохой герметизации и быстром испарении азота в период нагревания может резко повыситься давление в соломине, что приведет к разрыву ее оболочки.

При заправке сосудов или биологических хранилищ азотом гибкий шланг опускают до дна заправляемой емкости, чтобы предупредить выброс конца шланга из горловины сосуда и попадание азота на стоящих рядом людей. Заливать азот в сосуд надо медленно.

Если при испытании сосуда Дьюара обнаруживается нарушение теплоизоляции - утрата вакуума (покрыт вблизи горловины слоем инея), его запрещается оставлять на обогрев в помещении, где могут находиться люди.

Необходимо после слива азота поместить сосуд на 3-5 суток в изолированном помещении.

ОСЕМЕНЕНИЕ САМОК СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

Цель занятий: приобретение студентами практических навыков диагностики течки, полового возбуждения, охоты и овуляции и освоение техники осеменения самок сельскохозяйственных животных и птиц существующими способами;

ознакомление студентов с методами подготовки самцов-пробников.

Объекты исследований, материалы и оборудование: животные в охоте - корова, кобыла, коза (овца), свинья; самцы-пробники; станки, случная шлейка, веревки для фиксации животных; половые органы убитых самок и самцов; муляжи, рисунки, слайды; термоса или сосуды Дьюара с сохраняемой спермой; микроскопы, обогревательные столики, предметные и покровные стекла, чашки Петри; дозаторы пипеточные (глазные пипетки) или стеклянные палочки; инструмент для осеменения (шприцы ШО-3, ШО-4 и чехлы полиэтиленовые к ним, перчатки полиэтиленовые пятипалые и трехпалые; влагалищные зеркала с осветителем или специальные расширители, ложка Фолькмана; шприцы-катетеры, стеклянные баночки с стерильным физиологическим раствором и 70%-ным спиртом, спиртовые тампоны, сухие ватные тампоны; пипетки полистироловые одноразовые и полиэтиленовые шприцы с соединительной муфтой; катетеры и ампулы полиэтиленовые; микро-шприцы для осеменения овец, шприц полуавтомат; резиновый катетер с ампулой (шприцем) для осеменения кобыл; приборы УЗК-5 и ПОС-5; металлические или пластмассовые подставки для инструмента; полотенце, вата серая и вата белая, марлевые и бумажные салфетки; пинцеты и корнцанг, ножницы прямые и Купера; набор хирургических инструментов; раствор йода, раствор фурацилина, стрептоцид, смесь антибиотиков, коллодий, обезболивающие средства; мыло, кюветы, тазы, кружка Эсмарха, ведра.

Методические указания. Проводят несколько занятий в акушерской клинике, в учебном пункте и затем на фермах. На первом занятии (4 ч.) в клинике (в учебном пункте) преподаватель объясняет и демонстрирует студентам на муляжах, рисунках, фантомах, животных технику искусственного осеменения коров различными способами; знакомит с инструментом для осеменения и способами обеззараживания и подготовки его для использования. Затем студенты самостоятельно готовят инструмент и выполняют процедуру осеменения на подопытных животных, которых содержат на кафедре. Для освоения способов осеменения коров каждый студент обязан выполнить процедуру осеменения каждым способом под контролем преподавателя хотя бы на одном животном. На последующих двух-трех занятиях (по 2-4 ч.) на фермах студенты осваивают способы выявления животных в охоте и технику ректо-цервикального способа осеменения. В процессе таких занятий используются выбракованные небеременные животные. Студенты работают по парам. Каждой паре выделяется одна-две коровы. Справившись с зданием, пары меняются животными. Так за отведенное время каждый студент может ввести пипетку в шейку матки четырех-шести животным.

Технику осеменения кобыл целесообразно изучить во время занятия, на котором получают сперму от жеребца. После получения и оценки качества спермы по густоте и подвижности, часть эякулята можно использовать для осеменения кобылы, на которую получали сперму.

Освоение техники осеменения свиней можно организовать на свиноводческом комплексе, одновременно продемонстрировав студентам и получение спермы от хряка в искусственную вагину или мануальным способом.

Технику осеменения овец изучают в клинике кафедры, или же в овцеводческом хозяйстве, если период учебных занятий совпадает с сезоном осеменения этих животных.

Отдельно планируется занятие по подготовке оперативными методами быков-пробников.

Осеменение коров и телок

Диагностика течки, половой охоты и овуляции.

Процесс введения спермы в половые пути самки является последним, очень важным этапом метода искусственного осеменения. Сперма должна быть введена в наиболее подходящее место и в оптимальное время в период половой охоты; поэтому своевременному выявлению животных в охоте должно уделяться большое внимание. Знание признаков (внешних проявле-

ний) половой охоты и ее продолжительности, а также правильный выбор метода выявления этих признаков имеют большое значение.

Половая охота проявляется в фазу эструс, когда хорошо выражены и другие феномены полового цикла - течка и половое возбуждение. Длиться охота 12-18 часов, хотя может быть более продолжительной или слишком кратковременной.

Течка - процесс выделения слизи из половых органов как следствие морфологических изменений в половом аппарате самки. Характеризуется гиперемией трубчатых половых органов, новообразованием и разрастанием секреторных клеток и желез слизистой оболочки яйцепроводов, рогов, тела и шейки матки.

Наиболее заметным изменениям подвергаются эпителиальные клетки передней части влагалища и секреторные клетки шейки матки. В середине цикла клетки влагалища варьируют от уплощенных до низких цилиндрических. В стадии про-эструс происходит размножение и рост высоких цилиндрических слизеобразующих поверхностных клеток. В период эструса этот процесс усиливается, что приводит к сильному утолщению эпителия передней части влагалища. *За 12-24 часа до появления первых признаков охоты* начинается обильная секреция слизи из передней части влагалища и шейки матки. Количество слизи *увеличивается в течение охоты* и затем *постепенно уменьшается к четвертому дню после охоты*. В конце течки слизь содержит хлопья из лейкоцитов; максимальная лейкоцитарная инвазия слизистой оболочки влагалища наблюдается через 2-5 дней после охоты. Эластичность слизи варьирует, максимальная она во время охоты. В связи с эластичностью изменяется и способность слизи к кристаллизации. Наиболее хорошо выражена кристаллизация во время охоты и в течение двух последующих дней, а в другое время отсутствует. Под микроскопом в мазках кристаллы слизи расположены в виде листка папоротника (рис. 3). Этот феномен (*арборизация*), также как количество и свойства слизи, зависит от уровня эстрогенов. В начале охоты слизь клейкая, прозрачная, светлая, а к концу охоты становится более вязкой. Период яркого проявления охоты характеризуется наименьшей вязкостью слизи и максимальным понижением электрического сопротивления ее, а также максимальным увлажнением слизистой оболочки преддверия влагалища. Этот период совпадает с оптимальным временем осеменения. В конце охоты по мере возрастания вязкости слизи увеличивается и электрическое сопротивление ее. Электропроводность слизи можно контролировать с помощью специальных приборов (рис. 42). Однако результаты использования величины электрического сопротивления слизи для определения оптимального срока осеменения не высоки. Это связано с недостаточным контактом датчика прибора со слизью в момент пробы, измерением сопротивления вскоре после мочеиспускания и др.

Диагностируют течку осмотром наружных половых органов, влагалища, шейки матки, исследованием выделяющейся из половых органов слизи, клиническими и лабораторными методами.

В мазке-отпечатке с боковой стенки преддверия влагалища в фазу проэструс обнаруживаются малые и большие промежуточные эпителиальные клетки, эритроциты, иногда лейкоциты. В фазу эструс преимущественно большие промежуточные эпителиальные клетки, безъядерные клетки или клетки вакуолизованные с небольшим пикнотическим ядром и эритроциты. Лейкоциты встречаются редко, только в начале эструса, а в конце этой стадии доминируют безъядерные эпителиальные клетки. В фазу мет-эструс в мазке обнаруживается много лейкоцитов, исчезают безъядерные клетки, уменьшается число больших промежуточных клеток, появляются парабазальные клетки и малые промежуточные эпителиальные клетки, которые в последующем становятся вакуолизованными. При анэструсе в мазке преобладают парабазальные и малые промежуточные эпителиальные клетки (рис. 3).

Половое возбуждение (общая реакция) - изменение в поведении самки, возникающее в связи с созреванием фолликулов. Проявляется позднее течки и характеризуется ярко выраженной общей реакцией организма в виде беспокойства, отказа от корма, другими признаками. Самка проявляет "интерес" к самцу, может прыгать на него или других самок, но садку самца на себя не допускает.

Половая охота - строго специфическая, положительная сексуальная реакция самки на самца. Во время охоты самка стремится к самцу, принимает позу для полового акта, часто производит акт мочеиспускания, допускает садку и коитус. Половую охоту можно точно установить рефлексологическим методом, т.е. используя самца-пробника. Однако у коров и телок при контакте их с другими самками проявляются такие характерные для охоты признаки, которые позволяют практически безошибочно распознать ее. Знание этих признаков и умение их использовать помогают животноводам успешно организовать искусственное осеменение коров и телок без использования быков-пробников. Наиболее важными являются следующие признаки.

1. *Незадолго до начала охоты* корова обнюхивает и облизывает соседних коров, особенно их половые органы, а также подошедших близко людей. При этом спина впереди крестца выгибается, а затем сильно прогибается, хвост поднимается и опускается. Такое движение можно вызвать поглаживанием поясницы или прикосновением к вульве.

2. Слизистая оболочка преддверия влагалища припухшая, ярко розового или красного цвета, влажная и покрыта прозрачным секретом, который нередко вытекает из половой щели; поэтому пучок волос в нижнем углу вульвы всегда бывает влажным.

3. Постоянно переступает с ноги на ногу, а находясь в группе коров пытается приблизиться к другим животным в охоте (или не в охоте) и вспрыгнуть на них, иногда даже на человека.

4. *Корова в охоте* проявляет признаки общего возбуждения, чаще стоит; если кто-нибудь проходит сзади, она поднимает голову и провожает проходящего взглядом.

5. Глаза более живые, неподвижные и блестящие, зрачки расширены.

6. У некоторых коров охота сопровождается громким мычанием в течение нескольких часов или всего дня.

7. У многих животных наблюдается снижение удоя, но оно может пройти незамеченным; более обычным является затрудненное доение, так как корова задерживает молоко. Ослабевают деятельность рубца.

Если животные находятся в стаде, то признаки охоты выражены более отчетливо. Корова в охоте в 2-3 раза увеличивает двигательную активность (регистрируемую с помощью педометров), следует за другими животными и вспрыгивает на них, независимо от того, в охоте эти животные или нет. Наибольшая активность прыгать проявляется в конце про-эструса, в эструс и в начале мет-эструса. Если замечено, что корова повторяет прыжки, то следует продолжить наблюдение за ней, так как возможно наступление охоты. Но этот признак не является определяющим. Он может наблюдаться и у животных, не находящихся в охоте.

8. Более важным для выявления состояния охоты является поведение коровы в момент, когда на нее вспрыгивает другое животное: если она стоит спокойно или слегка уклоняется, то это указывает на наличие у нее охоты. В разгар охоты у коров проявляется, как правило, только такой типичный признак (*рефлекс неподвижности*) и лишь изредка - активный обнимательный рефлекс, но без совокупительных движений. В это время хорошо выражены и специфические изменения в наружных половых органах. Слизь вытекает в виде длинной вязкой нити, приклеивается к ягодицам и хвосту. Если животное лежало, то сзади его можно увидеть скопление мутноватой или голубоватого цвета слизи. У телок наблюдается и четкий подъем температуры во влагалище.

У животных с "тихой овуляцией" эти изменения также имеют место. Отмечается у них и возбужденное состояние, рев, попытки вспрыгивать на других коров. Но сами они не допускают садки других животных и не являются особо "привлекательными". При осеменении таких животных может произойти оплодотворение.

При контакте коровы в охоте с быком-пробником животные облизывают друг друга, после чего корова пытается вспрыгнуть на быка прежде, чем допускает садку сама. Если корова в охоте долгое время находилась в стаде, то вследствие садок других животных у нее стирается волос и появляются ссадины на корне хвоста и седалищных буграх. Эти признаки сохраняются 4-6 дней. Но если ссадины влажные с выделением экссудата или

кожа болезненна и имеет повышенную температуру, то это говорит о том, что корова в охоте или охота только что прошла.

Иногда коровы в охоте следуют за другими коровами, с фырканьем обнюхивают их половые органы, опираются головой на поясницу, поднимают хвост и помахивают им. Нередко за такими коровами активно следуют другие животные.

После охоты (в течение 10 ч) у коров наблюдается выделение прозрачной слизи; в этот период животное не допускает на себя садку других животных.

Наблюдается повторяемость признаков проявления и длительности половых циклов у одного и того же животного в различные годы.

Для выявления охоты у коров целесообразно трехкратное в день наблюдение по 20-30 мин. до раздачи корма во время их движения. При беспривязном содержании животные должны быть помечены бирками или ошейниками с хорошо заметными номерами. На крупных фермах наблюдение можно проводить с помощью телеустановок. Очень важное значение имеет степень освещенности помещений, особенно в осенне-зимнее время. В случае планирования сроков осеменения после отела (через 40-45 дней) и предоставлении животным прогулок эффективно использование специальных детекторов (KaMaR), которые прикрепляются на крестце животного (рис. 42), а также педометров.

С целью более полного и своевременного выявления охоты у коров и определения оптимального времени их осеменения используют быков-пробников, а также специально подготовленных коров - выявительниц или натренированных собак.

Использование быков-пробников. Так как половая охота строго специфическая реакция самки на самца, то ее можно достоверно определить с помощью пробника. Без пробника при регулярном визуальном наблюдении за стадом пропуски половой охоты у коров достигают 20% и более. Бык-пробник не только безошибочно выявляет охоту, но является мощным естественным стимулятором, способствующим своевременному и полноценному проявлению половой цикличности после родов.

Способы подготовки быков-пробников. Пробников готовят из числа бычков в возрасте 8-10 мес., предназначенных для выращивания на мясо. Отбирают хорошо развитых, проверенных на инфекционные заболевания животных, проявляющих высокую половую активность. Подготовленных быков-пробников используют в течение 5-10 месяцев. На 150-200 коров достаточно иметь одного быка-пробника.

Предложено много оперативных способов подготовки быков-пробников. Ампутация пениса (пенектомия), фиксация пениса к брюшной стенке и частичное сужение отверстия препуция предотвращают выдвигание пениса, возможность осуществления коитуса и эякуляцию. Однако эти методы приводят к быстрому ослаблению, а затем и полной потере полового

влечения (либидо). Отведение полового члена в сторону является более рациональным из оперативных методов на половом члене и препуции. Но наиболее распространенным в мире является способ подготовки пробников путем удаления участка спермиопроводов - *вазэктомия*.

Вазэктомия является самой простой и быстро выполнимой операцией, доступной в условиях любого хозяйства. В результате операции самец сохраняет способность к половому акту, но не может оплодотворить самку, так как эякулят содержит только секреты придаточных половых желез.

В физиологическом отношении вазэктомированные самцы - лучшие пробники. При их использовании у самок после полового акта укорачивается половая охота, ускоряется процесс овуляции, повышается сократительная функция матки и другие функции, что обуславливает повышение процента оплодотворения самок.

Существуют несколько способов вазэктомии быков, которые следует вначале отработать на свежих половых органах, а затем на животных. Впервые эту операцию описал А.Я. Краснитский (1946).

Способ Шипилова. Вазэктомию делают через один или два разреза. В отличие от способа А.Я. Краснитского разрезают переднюю (а не заднюю) стенку шейки мошонки. В этом случае не рассекаются волокна наружного поднимателя семенника, что значительно облегчает нахождение и извлечение спермиопровода. Операцию у быка делают в возрасте 8-10 мес.

Бычка фиксируют в спинном положении и готовят операционное поле. Удаляют волосы, тщательно обмывают мошонку тёплой водой с мылом и обтирают чистой салфеткой. Семенники максимально отодвигают ко дну мошонки. Кожу шейки мошонки протирают 70%-ным этиловым спиртом. Место разреза смазывают дважды раствором йода. У быков длина разреза 5-6 см. Для обезболивания применяют 1%-ный раствор новокаина. После обезболивания разрезают кожу, рассекают мышечно-эластическую оболочку, фасцию и общую влагалищную оболочку. Затем указательным пальцем выводят наружу семенной канатик, высвобождают спермиопровод из брыжейки, накладывают на него лигатуру (ближе к паховому каналу) и иссекают участок не менее 2 см. После этого разрезают продольную перегородку мошонки, рассекают мышечно-эластическую оболочку и фасцию. Обнажают общую влагалищную оболочку второго семенника, выводят его семенной канатик и иссекают участок спермиопровода. Рану присыпают белым стрептоцидом и на кожу накладывают 5-6 стежков узловатого шва. Края раны смазывают раствором йода, покрывают тонким слоем гигроскопической ваты и заливают коллодием или заклеивают лейкопластырем.

При вазэктомии у крупных животных делают на передней поверхности шейки мошонки два разреза.

Способ Андреевского. Животное фиксируют на левом боку. Мошонку тщательно обмывают, а нижнюю её часть в области хвоста придатка семенника выстригают и смазывают раствором йода. Для анестезии применяют

3%-ный раствор новокаина; вводят его в глубь нижней стенки мошонки и в толщу хвоста придатка в дозе 2-3 мл. Общее количество вводимого раствора новокаина должно составлять 8-10 мл.

Через 5-7 минут приступают к операции. Сначала оперируют нижний, а затем верхний семенники. Сжимают верхнюю часть мошонки и сильно отесняют семенник вниз так, чтобы контуры хвоста придатка семенника хорошо выделялись через натянутую кожу мошонки. Отступают от шва мошонки на 3-4 см и параллельно её шву в области нижнего края семенника разрезают кожу, мускульно-эластическую оболочку, фасцию и общую влагалищную оболочку. Разрез делают такой длины, чтобы через рану мог пройти только хвост придатка.

Затем хирургическим пинцетом захватывают хвост придатка, осторожно отделяют его от семенника и отсекают вместе с частью спермиопровода. На края раны накладывают несколько стежков узловатого шва. Рану смазывают раствором йода, покрывают тонким слоем марли и заливают коллодием.

Оперативные методы отведения полового члена в сторону. В отличие от животных вазэктомированных, быков-пробников с отведённым в сторону пенисом можно использовать для получения спермы в искусственную вагину и осеменять ею коров. Существует несколько способов отведения пениса в сторону. Впервые подобная операция выполнена W. Rommel (1961).

Способ Шипилова. Перед операцией животное сутки выдерживают на голодной диете и не поят, чтобы ослабить напряжение кожи живота, предупредить акт мочеиспускания и попадание мочи в рану. Фиксируют быка в спинном положении, используя, как и при вазэктомии, деревянный станок типа "козёл". При отсутствии станка животное валят вплотную к стене или забору и фиксируют к нему передние и задние конечности в вытянутом положении. После фиксации животного готовят операционное поле. Выстригают и выбривают волосы на передней части живота вокруг препуция кзади на расстоянии 12 см от его отверстия и спереди до пупочного бугорка. Выбритую поверхность тщательно моют тёплой водой с мылом. Кожу обтирают и подсушивают, затем протирают 70%-ным этиловым спиртом и дважды смазывают раствором йода. Волосы вокруг отверстия препуция укорачивают ножницами до 1-2 см. Раствором йода намечают в области отверстия препуция и начальной части препуциального мешка линию первоначального разреза кожи.

Препуций окружён рыхлой соединительной тканью и легко смещается под кожей в любую сторону. В области же отверстия он фиксируется краиниальными и каудальными препуциальными мышцами, которые оттягивают препуций вперёд или назад. Поэтому достаточно отвести в правую сторону под углом 70-80° (при меньшем угле возможен коитус) лишь переднюю, очень незначительную часть препуция (от отверстия препуция у годовалого бычка не более чем на 12 см), чтобы сделать невозможным половой акт.

После местного обезболивания 2%-ным раствором новокаина разрезают кожу и подкожную клетчатку, отделяют от брюшной стенки начальную часть препуция с отверстием. Образовавшуюся небольшую рану припудривают порошком антибиотиков и зашивают узловатым швом. Под углом 70-80° вправо от линии живота намечают новое место расположения начальной (отделенной от брюшной стенки) части препуция.

После обезболивания делают линейный разрез кожи и подкожной клетчатки, равный длине отпрепарированной части препуция. Рану припудривают порошком антибиотиков и затем помещают в неё эту часть препуция. Края раны и кожи препуция соединяют узловатыми швами, смазывают раствором йода и закрывают коллоидной повязкой. Небольшие раны заживают по первичному натяжению; отёки незначительны. На 12-13-й день после операции швы снимают. Никаких послеоперационных осложнений не наблюдается и на 18-21-й день быков можно использовать как пробников.

Методика использования быков-пробников. Подготовленных оперативным путём быков-пробников используют с 13-14 мес. возраста для выявления охоты у тёлочек и с 15-16 мес. - у коров. К пробникам с низкой живой массой коровы иногда проявляют агрессивность; с помощью таких пробников пробуют коров на наличие охоты под контролем человека. До начала использования от вазэктомированного пробника необходимо дважды получить в искусственную вагину и проверить под микроскопом выделенный им секрет: если операция сделана правильно, сперматозоидов в секрете не будет.

Использование пробников эффективно при правильной организации работы с ними. Главным условием является непродолжительное пребывание пробников в загоне среди коров или тёлочек (утром и вечером не более 1.5-2 ч). С этой целью необходимо на каждой ферме иметь специальный загон, в который выпускают вместе с пробником коров после отёла (за одну-две недели до планируемого осеменения), бесплодных коров, ремонтных тёлочек (с 15-16 мес.), а также осеменённых коров и тёлочек (с 17-го по 25-й день после осеменения). В летний период пробу проводят в загоне перед выгоном животных на пастбище и после возвращения их с пастбища. Коров, у которых выявлена охота, немедленно выводят из загона и осеменяют, а пробника оставляют для общения с другими самками.

Пробника нельзя оставлять постоянно в стаде, так как половая активность его будет снижаться. В зимний период быка-пробника выпускают на прогулку вместе с коровами утром или днём. Вечером пробника медленно проводят по проходу скотного двора. В плохую погоду вечернюю и утреннюю пробу на охоту проводят в коровнике.

В молочном комплексе на 800 коров при пункте осеменения содержат четырёх пробников и используют их попеременно (по два в день). Во всех случаях строго соблюдают принцип "дозированного" общения пробников с коровами и тёлочками и постоянно контролируют их использование.

Способы и техника осеменения.

Для осеменения коров и телок применяют цервикальный метод осеменения, т.е. в шейку матки. Существуют три принципиально различающиеся по технике исполнения способа введения спермы в канал шейки: *визо-цервикальный*, *ректо-цервикальный* и *мано-цервикальный*. Независимо от способа введения спермы осеменение коров и телок должно проводиться на пункте или в подготовленном для этой цели помещении, где содержатся животные, с соблюдением технологических и ветеринарно-санитарных требований. При осеменении необходимо предупреждать болезненные и стрессовые реакции у животных, а также исключить возможность распространения инфекционных болезней. При маршрутно-кольцевом обслуживании нескольких пунктов оператор по искусственному осеменению может перевозить только сосуд со спермой. Другие необходимые инструменты и материалы должны быть на каждом пункте.

Перед осеменением животного специалист уточняет время, прошедшее после отела, или порядковый номер повторного осеменения; при необходимости знакомится с результатами акушерского и гинекологического исследования. Затем осматривает животное, его половые органы и выделяемую слизь. При наличии в слизи примесей гноя или крови животное не осеменяют и после осмотра его ветеринарным специалистом проводят соответствующее лечение.

После обследования животного оператор по искусственному осеменению снимает рабочий халат темного цвета, моет руки и надевает белый халат. Включает оттаиватель (биотермостат) и доводит температуру воды до 38-39°C. На стол кладет полиэтиленовую пленку или лист (40x60 см) пластика, протирает их спиртовым тампоном. Обрабатывает подставку для инструмента, пинцет, корнцанг, ножницы. Готовит инструмент для осеменения, оттаивает сперму и осеменяет животное одним из способов.

Визо-цервикальный способ осеменения - наиболее простой и доступный. Сущность его заключается в том, что во влагалище коровы или телки вводят теплое стерильное влагалищное зеркало, которое предварительно увлажняют теплым изотоническим раствором натрия хлорида или натрия гидрокарбоната. В момент введения зеркало держат левой рукой так, чтобы ветви его были плотно закрыты, а ручки обращены в сторону. Начальной частью ветвей делают движение сверху вниз между половыми губами и под небольшим углом вверх и затем вперед вводят его во влагалище до упора. После этого поворачивают зеркало ручками вниз и надавливая на них раскрывают зеркало. Во влагалище зеркало размещают так, чтобы можно было видеть отверстие шейки матки. При осеменении в недостаточно освещенном помещении к зеркалу присоединяют осветитель (рис. 43). Затем инструмент для осеменения (стеклянный шприц-катетер, полистироловую пипетку с изогнутым концом и с присоединенным к ней с помощью полиэтиленовой

муфты пластмассовым шприцем, шприц конструкции Львовской академии ветеринарной медицины) вводят через зеркало в шейку матки на глубину 4-6 см и нажатием на поршень выдавливают дозу спермы. Если сперма расфасована в соломинах пользуются инструментом ШО-3 или ШО-4. Перед введением спермы зеркало несколько извлекают и уменьшают степень раскрытия влагалища.

Нередко используют металлическое зеркало с вырезом на верхней ветви. Изготавливают его из обычного инструмента. Для этого срезают правый край верхней ветви в виде полоски шириной от 11-12 мм в передней, до 55-60 мм в задней части ее. Кроме того, у основания зеркала делают дополнительный косой срез под углом 20-30° (рис. 43). Через такое зеркало шприц-катетер (или другой инструмент) обычным путем вводят в шейку матки. После этого катетер слегка прижимают к верхнему краю половой щели, а зеркало, повернув срезанной частью к шприцу, вынимают осторожно из влагалища. Через 20-30 с вводят сперму в шейку матки. В момент введения спермы снимаются болевые ощущения, связанные с нахождением во влагалище металлического инструмента, это способствует естественному проявлению сократительной функции матки, глубокому размещению спермы в канале шейки и повышению процента плодотворного осеменения.

В ряде стран вместо металлического влагалищного зеркала используют стеклянный расширитель (рис. 43).

Для асептического проведения осеменения этим способом необходимо животное зафиксировать в станке (рис. 44), подмыть теплой водой половые органы и вытереть салфеткой. Воду для подмывания наливают в полиэтиленовую бутылку емкостью 500-1000 мл, а в пробке делают одно или несколько отверстий. Такую бутылку можно поместить в карман халата. Влагалищное зеркало и шприц-катетер перед осеменением каждого животного необходимо обеззараживают одним из подходящих способов. Обычно зеркало (металлическое) стерилизуют кипячением в дистиллированной воде, а в полевых условиях - фламбированием; осветитель тщательно протирают спиртовым тампоном, шприц-катетер обеззараживают кипячением или 70%-ным спиртом.

Для обработки стеклянного шприца-катетера необходимы три баночки с притертыми пробками для физиологического раствора (баночки №№ 1, 3 и 4) и одна баночка (№ 2) для 70%-ного спирта. Кроме того, необходимы спиртовые тампоны и сухие ватные тампоны (в тампонницах), а также стерильные марлевые салфетки. Следует также иметь отдельную баночку для отработанного спирта, тампонницу для отработанных спиртовых тампонов, толстостенную чашку для отработанных растворов и специальную пластмассовую подставку.

Перед началом работы из шприца-катетера, сохраняемого с 70%-ным спиртом, удаляют спирт; затем промывают его раствором из баночек №2 и №4 по три-четыре раза из каждой. После последнего промывания инстру-

мент поворачивают катетером вниз и двигая медленно поршнем шприца удаляют остатки раствора. Наружную поверхность катетера протирают тампоном, смоченным 96%-ным спиртом. Подготовленный инструмент опускают в ампулу с оттаянной спермой и медленно оттягивая поршень вверх, набирают ее в шприц. Затем шприц поворачивают катетером вверх, несколько оттягивают поршень вниз, чтобы собрать сперму из катетера, после чего медленным движением поршня вытесняют воздух из шприца и катетера (до появления капельки спермы на кончике катетера). После осеменения животного катетер протирают сухим тампоном, промывают из баночки № 1 физиологическим раствором, набирают 1-2 мл 70%-ного спирта и хранят до использования.

Ректо-цервикальный способ - наиболее надежный из всех используемых в скотоводстве; заключается во введении инструмента для осеменения со спермой в шейку матки, которую фиксируют рукой через прямую кишку (рис. 45). Этот способ в одинаковой мере пригоден как для осеменения коров и телок, так и для пересадки зародышей реципиентам.

При использовании спермы, замороженной в гранулах, необходимо иметь одноразовые полистироловые пипетки, полиэтиленовый шприц с соединительной муфтой и полиэтиленовую перчатку. Для осеменения спермой в соломинах используют металлический шприц ШО-3 или ШО-4, поверх которого одевают защитный чехол.

Оттаяв сперму в гранулах, оператор берет пакет с одноразовыми пипетками, протирает уголок его спиртовым тампоном (со стороны не зашлифованного конца пипеток) и ножницами делает небольшое отверстие. Выдвинув на одну треть длины пипетку, соединяет ее со шприцем. Затем извлекает пипетку полностью, отверстие в пакете зажимает скрепкой и после этого медленно набирает оттаянную сперму из ампулы; сперма должна заполнить переднюю часть пипетки без столбика воздуха. Подготовленный инструмент оператор помещает в свободный стерильный пакет и кладет на стол.

После оттаивания спермы в солоmine оператор берет стерильный инструмент, поршень оттягивает примерно на 10 см и другой рукой вставляет соломину до упора. Конец ее с пузырьком воздуха отрезает острыми ножницами перпендикулярно возле самого конца инструмента (соломина не должна выступать более чем на 3-4 мм). На инструмент одевает защитный одноразовый чехол, фиксирует его в замковом устройстве. Конец чехла изнутри должен плотно охватывать срезанную часть соломины и при надавливании на поршень сперма должна выходить через отверстие чехла и не попадать под чехол.

Если притупился край фиксирующей пружины замкового устройства, то необходимо отвернуть два крепежных винта, снять пружину и подточить край ее округлым надфилем, слегка подогнуть, чтобы крепко фиксировал чехол.

Для осеменения этим способом руку в перчатке вводят в задний участок прямой кишки животного. Затем несколько отодвигают ее назад и располагают так, чтобы большой палец разместился в области промежности выше угла половой щели, а остальные четыре пальца надавливали на нижнюю стенку прямой кишки впереди ануса. Это приводит к раскрытию половой щели. Подготовленный инструмент для осеменения (полистироловая пипетка, соединенная с помощью специальной муфты с полиэтиленовым шприцем; металлический инструмент типа ШО-3 или ШО-4 с полипропиленовой соломиной, зафиксированной в инструменте с помощью защитного чехла; специальный металлический инструмент для облицованных гранул) вводится в половые пути по верхней стенке преддверия влагалища вначале пол углом 30-40°, чтобы не попасть в отверстие мочеиспускательного канала, а затем горизонтально до упора в свод влагалища. Если инструмент упирается в складку стенки влагалища, необходимо осторожно рукой через стенку прямой кишки надавить на передний конец инструмента и продвинуть его вперед. Иногда это удается сделать только после отодвигания шейки матки вперед и распрямления верхней стенки влагалища. Можно инструмент для осеменения продвигать в половые пути раньше, чем будет введена рука в прямую кишку. Для этого одной рукой раскрывают половые губы, а другой инструмент направляют во влагалище по верхней стенке. Затем руку вводят в прямую кишку. Чтобы рука легче проходила через анальное отверстие, перчатку слегка намыливают или смазывают вазелином. Перед введением можно смазать и анальное отверстие.

Манипуляции по освобождению прямой кишки от каловых масс следует проводить тогда, когда сильно затруднено фиксирование шейки матки; введенный инструмент при этом оберегают от загрязнения. После полного введения инструмента во влагалище рукой через прямую кишку фиксируют шейку матки и направляют инструмент в канал шейки матки. Это наиболее трудная и ответственная операция. Чтобы мастерски овладеть ею, необходим большой практический навык. Для начинающих осваивать этот способ можно рекомендовать два следующих приема.

Если по толщине шейка матки не слишком большая, то сначала необходимо отодвинуть и прижать ее к боковой стенке тазовой полости. При работе правой рукой прижимают шейку к левой стенке, а если левой то к правой стенке. Затем полностью обхватывают заднюю часть шейки так, чтобы указательный, средний и безымянный пальцы размещались снизу шейки, а большой палец фиксировал ее сверху. Мизинец должен находиться сзади устья шейки матки и на нем располагают конец инструмента. Изменяя положение кисти руки с шейкой матки в сагиттальной плоскости, можно выбрать такой момент, когда кончик инструмента совпадет с наружным отверстием шейки, после чего его достаточно легко ввести в заднюю часть канала. Подталкивая инструмент вперед, руку в прямой кишке перемещают на переднюю часть шейки, фиксируют ее и, изменяя положение от-

носителем инструмента в различных направлениях, "насаживают" на него полностью. Когда пальцы ощутят инструмент через тонкую стенку тела матки его несколько отодвигают назад и, надавливая на поршень шприца или толкатель других инструментов, медленно вводят сперму. Можно инструмент извлекать постепенно из канала шейки так, чтобы по крайней мере часть вводимой спермы осталась между складками шейки матки. Это способствует формированию первичного депо сперматозоидов. Более глубокое расположение такого депо, чем при естественном осеменении, позволяет уменьшить объем вводимой спермы и количество в ней подвижных сперматозоидов без снижения результатов осеменения.

Иногда диаметр шейки матки настолько велик, что трудно обхватить заднюю часть ее рукой. В этом случае четырьмя пальцами прижимают влагалищную часть шейки к лонным костям, а большим пальцем отыскивают наружное отверстие шейки и под контролем его направляют инструмент вперед. После этого манипулируя передней частью шейки матки, полностью вводят инструмент в канал шейки матки.

При ректо-цервикальном осеменении сперму можно ввести в половые пути на различную глубину. Однако следует учитывать чувствительность к травмам и инфицированию слизистой оболочки матки (она более чувствительна, чем слизистая оболочка шейки), возможность осеменения стельной коровы и нарушения беременности (около 4-5% стельных коров проявляют охоту и нередко их осеменяют), в естественную или стимулированную охоту проводится осеменение и др. Наиболее рациональным при этом способе осеменения является введение спермы в тело матки при первом осеменении (а также при осеменении в стимулированную охоту) и в переднюю часть шейки матки при повторном осеменении.

Результативность ректо-цервикального способа осеменения коров и телок выше, чем других способов. При благоприятных условиях при первом осеменении после отела оплодотворяется 63-66% или более коров, т.е. столько же, сколько и после естественного осеменения. Это, а также использование одноразовых стерильных инструментов или минимального количества инструментов многократного пользования и легкость их стерилизации, предупреждение раздражения, травм и инфицирования половой системы, приспособленность ко всем технологиям расфасовки и хранения спермы, контролируемое введение спермы в половые пути и небольшие затраты труда и времени при осеменении животного - являются основными достоинствами ректо-цервикального способа.

Мано-цервикальный способ. Он применяется только для осеменения коров с достаточно широким половым каналом.

При осеменении мано-цервикальным способом сперму вводят в канал шейки матки с помощью короткого полиэтиленового катетера с присоединенной к нему ампулой непосредственно рукой. На руку одевают стерильную полиэтиленовую перчатку. Для введения спермы в облицованных

гранулах используется специальный инструмент - зоошприц, который состоит из цилиндрического корпуса, съемного фланца и толкателя (рис. 45).

Сначала готовят животное: фиксируют хвост, а наружные половые органы подмывают теплой водой (при необходимости с мылом) и дезинфицируют раствором фурацилина. Оператор по искусственному осеменению извлекает из упаковки полиэтиленовую ампулу, срезает колпачок наискось острым скальпелем или ножницами и соединяет ее с катетером. Затем набирает сперму, опять вкладывает в упаковку и кладет на подставку. На руку одевает полиэтиленовую перчатку, увлажняет ее 1%-ным раствором натрия хлорида или натрия гидрокарбоната и осторожно вводит во влагалище коровы. После нахождения влагалищной части шейки матки пальцами обхватывает ее и, поворачивая руку относительно продольной оси в одну и другую стороны, делает массаж. В это время корова обычно успокаивается и до конца осеменения стоит неподвижно. Шейка матки и матка периодически сокращаются. В момент расслабления матка проявляет всасывающую функцию. В это время техник, не вынимая кисти руки из влагалища, другой рукой подает подготовленный для осеменения инструмент и располагает его на ладони так, чтобы большой палец прижимал ампулу, а кончик катетера находился вблизи указательного пальца. Не меняя положения инструмента, вводит кисть руки до шейки матки и под контролем указательного пальца продвигает катетер на глубину 1,5-2 см в цервикальный канал. Затем кончиками пальцев снова начинает массировать шейку матки, а ладонью подталкивает ампулу так, чтобы катетер вошел в канал на всю глубину (6-7 см). После этого ампулу приподнимает вверх на 2-3 см и выдавливает сперму из нее большим и указательным пальцами в момент расслабления матки. Чтобы сперма не оставалась, ампулу сжимать надо начиная с верхнего угла доннышка по направлению к шейке. После введения спермы ампулу не разжимают и вместе с катетером извлекают из канала шейки матки. Далее инструмент необходимо положить на дно влагалища и дополнительно массировать шейку матки и только после этого извлечь руку с инструментом из влагалища.

Многие считают, что этот способ полнее других имитирует естественное осеменение, а массаж влагалищной части шейки матки снимает оборонительную реакцию самки на введение руки и инструментов, усиливает сократительную функцию матки, способствует засасыванию спермы и продвижению ее к яйцепроводам. Это, а также достаточно глубокое введение спермы в цервикальный канал и использование одноразовых стерильных инструментов обеспечивают близкую к стандартной оплодотворяемость коров - 55-57%.

При использовании каждого из трех способов наилучшие результаты получают при осеменении коров через 9-16 ч после начала охоты; подходящее время и в период между 6 и 9 ч, а также с 16 до 28 ч. Если время начала охоты неизвестно, корову (телку) осеменяют немедленно; осматривают за-

тем через 10-12 часов и при сохранении признаков охоты - осеменяют повторно. При длительно протекающей охоте животное следует тщательно исследовать ректально и при отсутствии патологии яичников осеменить третий раз.

Вопросы:

1. Как проявляется течка у коров, какова ее продолжительность? Какими способами выявляют течку?
2. Какие изменения в наружных половых органах, во влагалище и в матке происходят в период течки и охоты? Какое состояние этих органов в середине полового цикла?
3. Как проявляется половая охота у коров? Какие признаки наблюдаются до начала охоты, во время охоты и после окончания ее? Какова продолжительность охоты?
4. Каковы способы и режим выявления половой охоты?
5. Когда происходит у коров овуляция относительно половой охоты? Как определить, что овуляция произошла? В какой период охоты осеменяют коров? Почему?
6. Какие способы подготовки быков-пробников применяют?
7. Как используют быков-пробников для выявления коров в охоте?
8. Какие способы искусственного осеменения коров и телок применяют в практике? Какой из них наиболее эффективен?
9. Какой способ расфасовки спермы наиболее совершенен и почему?
10. Как подготовить животное для осеменения?
11. Как подготовить инструмент для осеменения коровы спермой, расфасованной в соломинах?
12. Как подготовить инструмент для осеменения коровы спермой, расфасованной в гранулах?
13. Как подготовить влагалищное зеркало (расширитель) и инструмент для осеменения коровы визцервикальным способом?
14. Какой объем спермы необходим для осеменения коровы? Сколько сперматозоидов подвижных должно содержаться в одной дозе для осеменения?
15. В какой участок половых путей вводится сперма при осеменении? Кратность осеменения коровы в течение охоты?
15. Почему все инструменты, применяемые для осеменения, должны сохраняться опрятными, чистыми, стерильными?
16. Как стерилизуют инструмент для осеменения? Как утилизируют инструмент для одноразового использования?
17. Какие записи должен вести техник-осеменатор и какие - заведующий фермы (бригадир)?

Осеменение овец

Диагностика течки и половой охоты

Течка у овец непродолжительна и обнаружить ее трудно. Проявляется гиперемией слизистых оболочек, увеличением числа слоев влагалищного эпителия и ороговением поверхностных клеток, иногда точечными кровоизлияниями, повышением тонуса мускулатуры матки, усилением секреции слизи клетками шейки матки. Слизь в начале охоты прозрачная, слегка опалесцирующая, затем становится более мутной и в конце охоты приобретает сало-образную консистенцию.

Половая охота у овец проявляется не так ярко, как у других видов, и определить ее у большинства животных без барана-пробника практически невозможно. Сопровождается охота выделением специфических пахучих веществ - аттрактантов (*феромонов*), которые легко воспринимаются самцами. Продолжительность охоты 36-38 ч (от 12 до 72 ч).

В отаре овцы, находящиеся в охоте, стучат копытами, помахивают хвостом, стремятся приблизиться к производителю, иногда группой ходят за бараном. Овца считается в охоте, если допускает садку барана.

У коз много общего с овцами в проявлении половой функции. Однако половая цикличность нередко нерегулярная, продолжительность цикла составляет 19-21 день, хотя возможны и более короткие циклы (5-9 дней). Охота длится 22-33 ч; овуляция наступает через 27-34 ч после начала охоты.

Для выявления охоты у овец используют баранов-пробников. Чтобы баран не мог осеменить овцу, а только выявил охоту, ему подвязывают на живот фартук из плотного материала, длиной 60 см и шириной 40 см. Иногда делают вазэктомию; операция у баранов (козлов) проводится также, как и быков. На 80-100 овцематок готовят одного пробника. Обычно используют молодых, энергичных баранов. Если баран не вазэктомирован, то племенная ценность его должна быть не ниже 1 класса.

Перед началом работы как интактным, так и вазэктомированным баранам подвязывают под брюхо фартуки для предотвращения коитуса. Чтобы облегчить процесс выборки овец в охоте, пробникам прикрепляют в области груди красящие метчики. Делая садку на овец бараны окрашивают их с помощью таких устройств. Если вазэктомированным баранам не подвязывать фартуки, то у них торможение половых рефлексов возникает не так быстро, и проявляется не так часто, как у баранов с фартуками. Более того, многократный коитус усиливает сократительную функцию матки у овец и ускоряет овуляцию, что позволяет ограничиться однократным осеменением вместо обычного двукратного. Для поддержания половой активности на протяжении случного сезона интактным баранам-пробникам позволяют в неделю сделать одну садку на матку в охоте, или же от него получают в искусственную вагину один-два зякулята.

Выбирают овец в охоте один раз (иногда два раза) в сутки, обычно утром. Для проведения выборки в первые 8-10 дней загон (баз) разделяют на две части. Пробников используют поочередно, по группам. Матку считают в охоте, если она не убегает при вскакивании на нее барана, а стоит спокойно. Таких маток вылавливают и помещают в станки из переносных щитов, которые размещают по углам загона. Когда поголовье не проявивших охоту овец уменьшится, выборку проводят в одном загоне, но площадь его постепенно ограничивают переносными щитами по мере перевода овец в группу осеменения. При выборке надо следить, чтобы овцы в загоне не собирались группами, а были распределены в нем равномерно. По завершении выборки баранов-пробников удаляют из отары, а маток выпускают на пастбище. Овец в охоте перегоняют на пункт осеменения, где осеменяют и содержат отдельно до следующего утра, а после выборки животных с продолжающейся охотой соединяют с ранее осемененными овцами. Из них формируют отдельную отару. С 10-го дня после начала искусственного осеменения организуют выявление овец, проявляющих половую охоту повторно. После осеменения маток метят специальной краской "Овцевод". Среди осемененных коз выборку животных в охоте начинают с 5-го дня от начала осеменения.

Способы и техника осеменения.

При осеменении овец и коз применяют влагалищный и цервикальный методы. Яркам и переяркам из-за узости преддверия влагалища сперму вводят без применения влагалищного зеркала во влагалище (парацервикально). Для взрослых маток наиболее подходящим является цервикальный метод. При обоих методах для введения спермы используют стеклянный шприц-катетер (микрошприц) с дозирующим приспособлением, шприц-полуавтомат, металлический шприц (рис. 47).

При влагалищном методе осеменения катетер вводят по верхней стенке преддверия влагалища и влагалища до упора, затем отводят назад примерно на 1 см и выталкивают сперму, надавливая пальцем на поршень. Если влагалищное осеменение практикуют часто, то изготавливают укороченный шприц-катетер. Для этого в обычном инструменте обрезают тонкую изогнутую конечную часть катетера, а место среза шлифуют или оплавливают на пламени. Объем вводимой во влагалище неразбавленной спермы 0,15-0,20 мл, разбавленной и сохраняемой при 2-5°C спермы - 0,2 мл и замороженной спермы - 0,4 мл.

При цервикальном методе используют влагалищный расширитель с продольной прорезью сверху или металлическое влагалищное зеркало. Инструмент, обеззараженный и подогретый (металлическое зеркало), увлажняют 1%-ным раствором натрия хлорида и вводят во влагалище. После отыскания шейки матки кончик шприца-катетера направляют в канал шейки и вводят на максимальную глубину (1-3 см). Чтобы сперма не вытекала из влагалища, перед нажатием на поршень зеркало слегка оттягивают назад. При пользовании влагалищным расширителем перед введением спермы сначала извлекают расширитель, после чего осторожно надавливая на поршень шприца вводят необходимое количество спермы. При цервикальном осеменении вводят самке неразбавленной спермы 0,05 мл, разбавленной и охлажденной до 2-5°C - 0,1-0,15 мл и замороженной спермы - 0,2 мл. Если не удастся ввести инструмент в канал шейки матки, то сперму выдавливают на наружную часть шейки, увеличивая при этом дозу вдвое.

Перед осеменением каждой овцы катетер аккуратно обтирают тампоном, пропитанным 70%-ным спиртом, оберегая кончик инструмента от попадания в него спирта. После осеменения 3-4 овец необходимо капельку спермы из шприца нанести на предметное стекло, накрыть покровным и определить подвижность сперматозоидов. Если подвижность их резко понизилась, то эту сперму не используют.

После расходования всего зякулята микро-шприц промывают физиологическим раствором, а затем обеззараживают 70%-ным спиртом. Перед тем, как набрать новую порцию сперму от другого барана, микро-шприц 4-5 раз промывают физиологическим раствором из других баночек. Влагалищное зеркало после осеменения каждой овцы моют горячей водой, насухо вытирают полотенцем и обеззараживают на огне с не коптящим пламенем.

Осеменяют овец в манеже пункта искусственного осеменения. Для фиксации животных устанавливают станок (деревянный или металлический). Размещают его напротив окна или осветительной лампы. Маток поочередно фиксируют в станке или конвейерной установке для подачи их в манеж к рабочему месту оператора по искусственному осеменению. Во многих хозяйствах комната-манеж располагается в кошаре и проемом в стенке сообщается с другим не отапливаемым помещением, куда загоняют маток в охоте. В этом помещении имеется станок для фиксации овец. Осеменение их проводят через проем.

При осеменении в теплое время года нередко организуют временный (передвижной) пункт на пастбище. Осеменяют овец в загоне летнего лагеря. Обычно такой пункт работает с приобретаемой в племпредприятии спермой (замороженной или охлажденной до 2-5°C).

Оптимальным временем для осеменения овец является период в пределах 9-12 часов после начала охоты. Обычно же осеменяют овец дважды: первый раз сразу после выборки в охоте, второй раз спустя 8-10 часов. Маток с продолжительной охотой осеменяют и третий раз. Второе осеменение через 24 часа допускается при использовании свежеполученной спермы высокого качества.

Осеменение овец сезонное: при планировании ягнения в январе осеменение маток проводят в августе, а при ягнении в феврале - осеменяют их в сентябре. Благоприятные условия осени способствуют повышению плодовитости по сравнению с другими периодами на 15-20%. Осеменение проводят на протяжении двух половых циклов (35-40 дней). По окончании работы пункта организуют вольную случку маток, не оплодотворившихся после искусственного осеменения. В племенных хозяйствах для этой цели в течение 15-25 дней используются бараны, по качеству не уступающие основным, а в других хозяйствах - не ниже 1 класса.

Осеменение коз проводят в сентябре - ноябре.

Вопросы:

1. Как проявляется течка и половая охота у овец, какова продолжительность их? Какими способами выявляют охоту?
2. Какие способы подготовки баранов-пробников применяют? Как их используют для выявления овец в охоте?
3. Какие способы искусственного осеменения овцематок и ярочек применяют в практике? В какой участок половых путей вводится сперма при осеменении?
4. В какой период охоты осеменяют овец? Кратность осеменения в одну охоту?
5. Как готовятся микро-шприц или шприц-полуавтомат для осеменения овец?
6. Какой объем спермы свежеполученной, разбавленной и сохраняемой при температуре 0-4°C или минус 196°C необходим для осеменения овцы? Сколько сперматозоидов подвижных должно содержаться в одной дозе для осеменения?
7. В какой период года проводится осеменение овец? Какова продолжительность периода осеменения?

Осеменение свиней.

Диагностика течки и половой охоты

У свиней в период созревания фолликулов вульва (петля) набухает и приобретает красный цвет, слизистая оболочка влагалища становится отечной, розоватого или ярко-красного цвета. Из половой щели может выделяться слизь. В начале охоты слизь светлая, а к концу охоты беловатая. Выделяется слизи немного. Четкие изменения вульвы в период эструса наблюдаются только у 75% самок. Набухание и покраснение ее редко сохраняется до конца охоты и обычно исчезает во время спаривания или ранее.

За 3-12 ч до наступления стадии эструса происходят изменения в поведении свиньи. Она становится беспокойной, часто мочится, издает характерное хрюканье, мало ест, обнюхивает половые органы других животных, вспрыгивает на них и может позволять делать садку на себя другим свиньям, пытается выбраться из станка. Некоторые самки активно преследуют хряков за день до наступления эструса. В этой стадии явления течки и охоты усиливаются.

Характерным признаком половой охоты (готовности свиньи к спариванию с самцом) является неподвижность. В присутствии самца она настораживает уши, выгибает дугой спину и застывает в такой позе. Если в это время положить ей на крестец руку или сесть верхом, то она не уклоняется, а продолжает стоять спокойно. Но без хрюка такая реакция наблюдается только у половины животных.

Главными раздражителями рефлекса неподвижности являются обонятельные и слуховые. Внешний вид самца тоже имеет значение. Но наблюдения показывают, что если самка не видит хрюка, но слышит хрюканье и воспринимает запах его, то влечение к нему ослабляется незначительно. Записанное на магнитофон хрюканье хрюка вызывает рефлекс неподвижности более чем у половины свинок, которые не проявляли рефлекса без хрюка. Очень сильные и обонятельные раздражители. Свыше 60% свинок в охоте, которые не реагируют на надавливание рукой, проявляют неподвижность при переводе их в станок хрюка. Запах жидкости, взятой из препуция хрюка и подогретой до температуры тела, дает такой же эффект, как и запах самого хрюка. Реакция зависит от стероидного вещества, вырабатываемого в препуции и придающего характерный запах свинине. Оно синтезировано и используется при выявлении охоты (препараты суидор, феромаксин и др.). Достаточно 0,1-1 мг такого вещества смешать со 100 г инертного вещества и распылить или разбрызгать в виде жидкости (аэрозоли) в свиарнике, чтобы стимулировать половую активность у свиноматок в охоте. Спустя 1-2 мин. после применения его более половины свиней в охоте, у которых не были замечены признаки ее, проявляют рефлекс неподвижности и без хрюка.

Использование хряков-пробников.

Наиболее точный способ выявления охоты у свиней - это использование хрюка-пробника в группе из 4-8 самок. Целесообразно помещать в станок первым хрюка, чтобы он привык к окружающей обстановке, а затем

вводить маток. Если хряк обладает хорошей половой активностью, то бывает достаточно 5-минутного контакта с каждой самкой. Так как коитус у свиней длится долго, то можно использовать хряков без какого-либо хирургического вмешательства. После садки хряка можно столкнуть с матки. Надежно использование и вазэктомированных хряков. Существует несколько способов вазэктомии.

Способ Шипилова. Хряков, выдержав сутки на голодной диете, фиксируют в спинном положении и проводят резекцию спермиопроводов так же, как у быков.

Немецкая фирма "Шипперс" предложила механическое подвижное чучело, с дистанционным управлением. Помещено чучело на легкую тележку и поэтому его можно катать по проходу; оно имеет цвет, запах и форму живого хряка. В нем размещается устройство для воспроизведения звуковых раздражителей.

При выявлении охоты у свиней животноводы должны учитывать и такие признаки, как повышенную возбудимость, потерю аппетита, характерное хрюканье, припухание и покраснение вульвы и др. Отдельно взятый признак не является надежным показателем охоты, но по их совокупности опытный работник, знающий всех животных индивидуально, легко может определить самок в охоте. Прогон хряка по проходу свинарника, где содержатся матки, существенно облегчает эту задачу.

Способы осеменения свиней.

При искусственном осеменении свиней сперма вводится в матку. В практике применяется два способа осеменения: фракционный и нефракционный. При обоих способах используется разбавленная сперма с содержанием подвижных сперматозоидов в 1 мл 30-50 млн., но объем вводимой спермы различный.

При фракционном способе сначала вводится разбавленная сперма в объеме 50 мл взрослым маткам и 40 мл молодым свинкам, а затем глюкозо-солевой раствор (1 л дистиллированной воды, 30 г глюкозы и 4,5 г натрия хлорида) соответственно 100 мл и 70-80 мл. Для осеменения используются универсальный термос-прибор, универсальный зонд УЗК-5 и упрощенный зонд УЗК-6.

Универсальный термос-прибор приспособлен для осеменения свиноматок и переноски спермы на ферме. Состоит из деревянного футляра, металлических колонок с горячей водой (обогревательного бачка), трех стеклянных ампул, спиртовки для сухого спирта, катетера (зонда), шаров Ричардсона, резиновых трубок, зажимов и термометра. Зонд состоит из двух частей: одна изготовлена из металлической нержавеющей трубки длиной 25 см, другая присоединяется к первой при помощи винтовой резьбы и представляет собой спираль из никелированной проволоки. Внутри металлической трубки и спирали вставляется резиновая трубка, задний свободный конец которой служит для соединения зонда с ампулами прибора. На конец

металлической спирали плотно надевается резиновая головка зонда диаметром 20 мм. К заднему концу зонда прикрепляется ручка. Другая модель зонда представляет собой металлическую трубку длиной 55 см без спирали.

В комплект более современного, широко используемого прибора УЗК-5 (рис. 48) входит один полужесткий металлический катетер (зонд) с резиновой головкой и 10 пластмассовых катетеров в пластмассовых чехлах. В предохранительный колпак прибора помещается два флакона: один с разбавленной спермой, а другой - с глюкозо-солевым раствором. Стеклообразные флаконы изготавливаются специально для прибора, но нередко их заменяют бутылочками для молочного питания детей или пластмассовыми флаконами из прибора ВИЖ. Содержимое флаконов выдавливается путем нагнетания в них воздуха при помощи шаров Ричардсона. В вариантах 2 и 3 прибора нет защитного колпака. К прибору прилагается термос-ящик для флаконов со спермой и раствором.

В упрощенном приборе УЗК-6 зонд состоит из прозрачной пластмассовой трубки длиной 40 см; на одном конце ее укрепляется резиновая головка диаметром около 20 мм, а на втором - резиновая ручка. В трубку-зонд вмещается до 50 мл спермы. Раствор (вторая фракция) находится в пластмассовом гофрированном флаконе, который присоединяется к резиновой ручке зонда при помощи специального наконечника. При сжатии флакона раствор через резиновую ручку поступает в зонд, надавливает на поршень и проталкивает содержащуюся там сперму. В конце зонда поршень не плотно прилегает к внутренним стенкам и способен пропускать вокруг себя раствор из гофрированного флакона. Через 20-30 с после введения спермы и раствора в матку животного извлекают зонд и удаляют остатки раствора.

Комбинированный прибор конструкции Е.Н. Анисько (рис. 48) можно было использовать для искусственного осеменения свиней фракционным и нефракционным способами.

При нефракционном способе осеменения разбавленную сперму вводят за один прием. Доза спермы - 100-150 мл. Для введения спермы применяют приборы УЗК-5 или конструкции ВИЖ и ПОС-5. Два последних прибора состоят из полиэтиленовых тонкостенных флаконов, емкостью 100-150 мл с навинчивающимися крышками, и катетеров с соединительными муфтами. Разница между ними состоит в том, что флаконы прибора ВИЖ плоскодонные, а флаконы от прибора ПОС-5 с округлым дном и имеют грубую градуировку (цена деления 25 мл).

Стерильные катетеры хранятся в полиэтиленовых чехлах. Перед осеменением ножницами отрезают часть чехла и извлекают конец катетера с соединительной муфтой и навинчивают на флакон вместо крышки. Чехол оставляют на катетере до момента введения в половые пути самки.

Маток в охоте перегоняют в манеж для осеменения и размещают в индивидуальных станках. Однако более удобно и надежно фиксировать животных во время осеменения в специальном устройстве. Такое устройство

похоже на обычную клетку для взвешивания животного, но оборудовано лямками, которые не позволяют свиноматке лечь. Если манеж не оборудован станками или устройствами для фиксации, тогда осеменяют животных в станках, где их содержат. Однако это менее желательно, так как практически невозможно обеспечить необходимые санитарно-гигиенические условия в момент осеменения и надежно зафиксировать животное. Хотя свиньи в охоте проявляют состояние неподвижности, большинство из них (особенно молодые) не стоят во время осеменения, пытаются двигаться и это создает трудности для удержания оператором по искусственному осеменению катетера в нормальном положении.

Перед осеменением наружные половые органы матки обрабатывают ватным тампоном, смоченным лигнином или раствором фурацилина 1:5000. При сильном загрязнении половые органы сначала обмывают теплой водой или 1-2%-ным раствором натрия гидрокарбоната, а затем дезинфицирующим раствором. После этого усиливают состояние неподвижности матки надавливанием на крестец рукой или левым плечом (рис. 48), в то время как другой раздвигают половую щель и вводят в нее катетер. При осеменении крупных свиноматок техник может сесть на заднюю часть туловища животного спиной к его голове. Присутствие в момент осеменения вблизи матки хрюка усиливает проявление неподвижности. Катетер продвигают по верхней стенке влагалища до упора в шейку матки. В период половой охоты складки (выросты) шейки матки значительно расходятся и катетер с суживающегося кпереди влагалища может проскочить один-два "замка" шейки. Легче это происходит, если на конце катетера имеется утолщение в виде головки или оливообразное расширение, баллончик для воздуха, или же если конец сделан в форме полового члена хрюка. При прохождении сначала первой, а затем второй складки ощущается небольшое сопротивление; слегка подталкивая катетер вперед удается преодолеть его. Расширение на конце катетера предупреждает вытекание спермы. Катетер со спиралевидным концом одновременно продвигают и вращают в левую сторону до столкновения со складками шейки матки. У молодых маток кончик катетера может упираться в начало цервикального канала.

После введения катетера в половые пути матки флакон со спермой приподнимают выше спины животного, переворачивают его вверх дном и, слегка нажимая рукой, начинают вводить сперму. При фракционном способе осеменения после введения катетера до упора в шейку матки техник открывает зажим флакона со спермой и начинает нагнетать во флакон воздух. Если канал шейки матки открыт, то сперма будет поступать в матку и уровень ее во флаконе заметно понизится. После введения дозы спермы (половина стеклянного флакона) техник закрывает этот зажим, одновременно открывает зажим другого флакона и вводит необходимое количество раствора. Сперму и раствор необходимо вводить медленно. У взрослых свиноматок благодаря интенсивным всасывающим движениям матки спер-

ма часто поступает самотеком через открытый канал шейки матки, но у молодых свинок это бывает реже. При осеменении в оптимальное время для введения спермы требуется 3-4 минуты. Если канал шейки закрывается, то сперма начинает вытекать из влагалища. В этом случае давление на флакон (или давление воздуха) уменьшают, выжидают 10-20 секунд (иногда до 40 секунд), пока опять канал не расслабится, а затем продолжают введение.

Перед осеменением сперму, сохраняемую при 16-20°C, помещают в водяную баню (30-35°C) не менее чем на 10 минут. За это время флакон переворачивают несколько раз для того, чтобы сперма подогревалась равномерно. Не подогретая сперма, введенная в половые пути свиноматок, часто выталкивается обратно. Одновременно подгревают не более 5 доз спермы, чтобы использовать ее в течение получаса.

Время осеменения свиноматок. Осеменяют маток обычно в первую охоту после отъема поросят. Кормление подсосных маток должно быть полноценным, чтобы к этому моменту они имели хорошую упитанность и в течение последующих 4-7 дней проявили половую охоту. Маток слабо упитанных выделяют в отдельную группу, улучшают кормление. Не проявившим охоту в течение 8 дней маткам вводят ПГ-600.

Половая охота у свиней длится 40-60 часов, а овуляция происходит через 30-36 часов после начала охоты. Продолжается овуляция не более 4-7 часов. Введенные в половые пути свины сперматозоиды сохраняют способность к оплодотворению не более 30 часов. Поэтому оптимальным временем для осеменения считается интервал в пределах от 12 до 16 часов перед овуляцией. Но это при условии использования свежеполученной спермы. Когда же осеменение проводится разбавленной или оттаянной после замораживания спермой, то оптимальное время для осеменения будет несколько ближе к овуляции - за 6-8 часов до нее. Обычно же при определении оптимального времени осеменения исходят не из срока овуляции, а из времени начала проявления рефлекса неподвижности. Наилучшим сроком для осеменения взрослых маток является конец первых и начало вторых суток, а для молодых - после 30 часов от начала половой охоты.

В практических условиях время осеменения определяется кратностью выборки животных в охоте. При четырехкратном контроле молодых свинок можно осеменять в течение 17-18 часов, а свиноматок - в течение 21-24 часов после определения состояния неподвижности. Если выборка проводится два раза в день (с промежутком в 10-12 часов), то требуется двукратное осеменение: после выборки свиноматок в охоте утром осеменение их проводят вечером, а после вечерней выборки - утром следующего дня. Второй раз животных осеменяют, как правило, через 10-12 часов после первого осеменения. Молодых свиноматок, выбранных утром, можно осеменять через 2-5 часов и повторно на другой день утром. Так поступают и при однократной выборке охоты у свиней. Если половая охота длится более 10 часов

после повторного осеменения, то свиноматку целесообразно осеменить еще один раз.

Организация осеменения в хозяйствах

В нашей республике используется в основном хозяйственный способ. На крупных фермах и комплексах, в селекционно-гибридных центрах собственными силами и средствами создается пункт (станция) искусственного осеменения. Обслуживается пункт группой специалистов, в задачу которых входит подбор племенных хряков, использование их, обработка и хранение спермы, проведение осеменения. Сперму от хряков получают по мере необходимости, поэтому хранится она после разбавления не более суток. Сервисный способ может быть использован при обслуживании небольших ферм совхозов и колхозов, в которых содержится небольшое количество свиноматок, а также фермерских и индивидуальных хозяйств. По заказам владельцев животных оператор по искусственному осеменению с крупного пункта (или предприятия, если оно содержит хряков) может выезжать, везя с собой сперму и инструменты, и осеменять выявленных в охоте животных.

Вопросы:

- 1. В какой степени выражены изменения вульвы у свиней в период течки? Как долго они сохраняются?*
- 3. Как проявляется половая охота? Какие признаки наблюдаются до начала охоты и во время охоты? Какова продолжительность ее?*
- 4. Когда происходит у свиней овуляция относительно охоты? В какой период охоты осеменяют их? Кратность осеменения?*
- 5. Способы и режим выявления половой охоты?*
- 6. Какие способы подготовки хряков-пробников применяют? Возможно ли замена хряка-пробника искусственным манекеном?*
- 7. Как используют хряков-пробников (искусственных пробников) для выявления свиней в охоте?*
- 8. Как подготовить свиноматку для осеменения? Где проводится осеменение, нужна ли фиксация животного?*
- 9. Какие способы искусственного осеменения свиней применяют в практике? Какой необходим инструмент? В какой участок половых путей вводится сперма при осеменении?*
- 10. Какой объем спермы необходим для осеменения свиньи? Сколько сперматозоидов подвижных должно содержаться в одной дозе для осеменения?*
- 11. При какой температуре и как долго храниться разбавленная сперма хряков?*
- 12. Как стерилизуется инструмент для осеменения? Что делают с использованным инструментом?*

Осеменение кобыл

Диагностика течки, половой охоты и овуляции

После выжеребки половая цикличность возобновляется с 8-10-го дня (от 5 до 14 дней). Первая охота короче - 2-4 дня, а последующие длятся в среднем 5-6 дней.

В стадии эструса вследствие гормонального влияния яичников усиливаются кровоснабжение и гиперемия половых органов, канал шейки матки приоткрывается и в него можно ввести сначала один, а затем и два пальца. Шейка матки укорачивается по длине и принимает по отношению к влажной центральной положение. Количество слизи увеличивается, она стано-

вится более водянистой и прозрачной. К концу этой стадии слизь приобретает мутноватый цвет и вязкую консистенцию.

Признаки охоты хорошо выражены, вульва набухает, отмечается мигание половой щели. При этом кобыла открывает и закрывает половую щель, поднимает хвост, выпячивает клитор и испускает небольшое количество мочи и слизи. Во время охоты кобылы сильно возбуждены, непослушны, щекотливы, часто ржут. Услышав или увидев жеребца, они принимают позу для спаривания (рис. 49). Во время садки жеребца стоят спокойно.

На протяжении всего этого периода степень проявления признаков охоты прогрессирующе увеличивается. Поэтому различают несколько степеней охоты. *Охота первой степени:* при приближении жеребца кобыла стоит спокойно, однако не проявляет других признаков. *Охота второй степени:* кобыла допускает жеребца, поднимает хвост, отмечается мигание половой щели. *Охота третьей степени:* те же признаки и выделение мочи и слизи в момент мигания половой щели. *Охота четвертой степени:* в дополнение к перечисленным признакам - при обнюхивании жеребцом кобыла клонится в его сторону, раскидывает тазовые конечности, во время садки стоит спокойно.

По мере нарастания признаков охоты в яичниках происходит созревание фолликулов. Ректальной пальпацией можно определить степень их зрелости. *Вначале созревания* фолликула (диаметр 1-1,5 см) яичник принимает форму неправильного боба за счет увеличения одной его стороны; эта часть проявляет признаки незначительного размягчения. *Созревающий* фолликул приводит к увеличению яичника и изменению его формы до грушевидной; в самом фолликуле заметна флюктуация жидкости. *Почти зрелый* фолликул шарообразный, хорошо флюктуирует и придает яичнику явную грушевидную форму. *Полностью созревший* фолликул имеет форму шара, стенки его истончены, флюктуация легко ощущается. *При овуляции* напряженность стенок фолликула ослабевает, уменьшается его размер и изменяется форма. После окончания овуляции сильно уменьшается в размерах и яичник. Происходит овуляция примерно за одни-два суток до окончания охоты.

В период осеменения необходимо у всех кобыл охоту выявлять не реже, чем через день, но лучше ежедневно, чтобы не пропустить тех животных, у которых она продолжается всего 2-3 дня. Для выявления охоты используют жеребца-пробника. Пробу проводят под контролем человека. Для этого раскованную на задние конечности кобылу выводят в открытый двор, держат ее под уздцы. Пробника (не имеющего племенной ценности здорового энергичного жеребца) подводят на двух длинных поводках к кобыле спереди. Если кобыла стоит спокойно, то пробника постепенно допускают к паху, а затем и к крупу кобылы. При отсутствии охоты кобыла уже при первом контакте с жеребцом проявляет агрессивность, поворачивается быстро к не-

му задом и стремиться ударить его ("отбивает"). Кобыла в охоте проявляет характерные признаки, соответствующие степени охоты.

Пробу подсосных кобыл целесообразнее проводить через деревянный барьер длиной 2,5 м и высотой 1,2-1,3 м. Жеребца ставят с одной стороны барьера, а кобылу - с другой.

Для выявления половой охоты без жеребца-пробника используют акустические (звуковое подражание заигрывания жеребца) и тактильные стимулы (пальпация области холки, боков и половых органов). Они позволяют определить состояние эструса (спокойное поведение, поднятие хвоста, мигание половой щели и выделение слизи, раскидывание задних конечностей) или диэструса (нервозность, лягание и ржание).

Оптимальное время осеменения. После выявления признаков охоты проверку продолжают ежедневно, чтобы определить оптимальное время осеменения. Осеменяют первый раз кобыл при ярком проявлении признаков охоты (3 и 4-я степени) и затем повторяют осеменение через каждые 36-48 часов до затухания признаков охоты. Такие длительные промежутки между осеменением возможны благодаря тому, что сперматозоиды жеребца сохраняют способность к оплодотворению в половых путях кобылы до 140 часов. Если пальпацией определяют степень зрелости фолликула, то первое осеменение проводят при наличии почти зрелого или полностью созревшего фолликула; повторно осеменяют через 1-2 дня, если овуляция не наступила.

Способы осеменения.

При осеменении кобыл сперму вводят в матку (маточный метод осеменения). В практике применяют два способа введения спермы: мануальный и визуальный.

При *мануальном* способе (рис. 49) используют резиновый катетер И.И. Иванова и шприц емкостью 30-50 мл или ампулу. Катетер представляет собой толстостенную мягкую резиновую трубку с узким внутренним каналом. Передний конец его сужен, а задний имеет выступ в виде кольца и расширенное отверстие канала для соединения с канюлей шприца. Катетер вводят рукой во влагалище кобылы. Указательным пальцем находят устье шейки матки и под контролем пальца продвигают катетер в канал шейки матки на глубину 10-12 см. К катетеру присоединяют шприц со спермой и, нажимая на поршень, вводят сперму в матку.

При *визуальном* способе используют стеклянный или эбонитовый катетер длиной 50 см, шприц и влагалищное зеркало. Обеззараженное влагалищное зеркало вводят в половые пути и размещают его так, чтобы хорошо видна была шейка матки. Под контролем зрения катетер через зеркало направляют в цервикальный канал. После введения в матку к стеклянному катетеру присоединяют посредством резиновой муфты шприц. Эбонитовый катетер с канюлей шприца соединяют заранее при помощи металлического хомутика с резиновой прокладкой.

Перед осеменением кобылу заводят в специальный станок или же фиксируют с помощью случной шлеи. Спокойных животных удерживают за повод и поднимают переднюю ногу, чтобы они не могли ударить оператора по искусственному осеменению. Конюх забинтовывает хвост кобылы и отводит в сторону; вульву обмывает теплой водой и вытирает насухо ватой. После этого оператор при участии помощника, который подает ему инструменты для осеменения, проводит осеменение кобылы.

Для осеменения одного животного используют от 20 до 40 мл спермы. Крупным, старым, а также ожеребившимся кобылам следует вводить максимальную дозу спермы.

Организация осеменения в хозяйствах.

В хозяйствах осеменение кобыл практикуется редко, хотя каких-либо особых условий для его проведения не требуется. Государственные заводские конюшни, которые содержат высококлассных племенных жеребцов-производителей, могут организовывать основные пункты искусственного осеменения, получать сперму и разбавлять ее для хранения при 4°C в течение 48 часов, или же замораживать и хранить в жидком азоте. Заготовленная сперма может быть использована для осеменения кобыл в хозяйствах по их заявкам.

Вопросы:

- 1. В какой период года проявляется половая цикличность у кобыл? Когда после родов наступает первая охота?*
- 2. Какова продолжительность охоты? Одинаково ли проявление признаков охоты всем протяжении ее? Когда происходит у кобыл овуляция относительно охоты?*
- 3. Способы и режим выявления половой охоты? Каким способом можно определить время приближения овуляции?*
- 4. Как подготовить кобылу для осеменения? Где проводится осеменение, как зафиксировать животное? В какой период охоты осеменяют их? Кратность осеменения?*
- 5. Какие способы осеменения кобыл применяют в практике? Какой необходим инструмент? В какой участок половых путей вводится сперма при осеменении?*
- 6. Какой объем спермы необходим для осеменения кобылы? Сколько сперматозоидов подвижных должно содержаться в одной дозе для осеменения?*
- 7. Какие способы хранения разбавленной спермы жеребцов применяют в практике?*

Осеменение сельскохозяйственных птиц

Цель занятий: ознакомление с техникой получения спермы от самцов птиц и оценкой качества ее, составом сред для разбавления спермы, организацией и техникой осеменения самок.

Объекты исследований, материалы и оборудование: петухи, индюки, гусаки, куры, индейки, гусыни; станок с металлической сеткой для фиксации индейки, столик передвижной; электрический спермосборитель, вакуумные и обычные спермоприемники; стеклянные флаконы емкостью 15-20 мл с резиновыми пробками; микроскопы, обогревательные столики, предметные и покровные стекла; дозаторы пипеточные (глазные пипетки) или стеклянные палочки; инструмент для осеменения (стеклянные и полиэтиленовые пипетки с полиэтиленовыми или резиновыми баллончиками, микро-шприц или шприц полуавтомат для осеменения овец с укороченным катетером; стерильный физиологический раствор, раствор фурацилина, 70%-ный спирт, натрия хлорид, калия хлорид, кальция хлорид, магния хлорид, натрия ацетат, натрий двузамещенный фосфорнокислый, калия цитрат, натрий глютаминовокислый, фруктоза, глюкоза, дистиллированная вода; спиртовые тампоны, сухие ватные тампоны; полотенце, стерильные марлевые и бумажные салфетки; анатомический пинцет.

Методические указания. Занятие проводят в лаборатории кафедры, в учебном пункте или на одной из близлежащих птицефабрик. Сначала преподаватель объясняет студентам технику получения спермы, знакомит с методами оценки качества ее и инструментом для осеменения, демонстрирует технику осе-

нения самок птиц. Затем студенты небольшими группами (2-4 человека) самостоятельно готовят инструмент, среду для разбавления спермы, получают сперму и разбавляют ее, выполняют процедуру осеменения птиц. При проведении занятия на птицефабрике студенты знакомятся со всеми технологическими процессами метода последовательно в составе производственных групп.

Искусственное осеменение птиц применяют для уменьшения числа самцов при получении яиц для инкубации и повышения выводимости цыплят (индюшат, гусят), для снижения распространения инфекций половым путем, а также для предупреждения повреждений самок в процессе естественного спаривания, при котором отход маточного поголовья, например индеек, в течение года вследствие нанесения травм самцами достигает 20-30%. При искусственном осеменении, кроме того, можно замораживать сперму самцов и длительное время сохранять отдельные линии и породы птиц.

Получение спермы. Для получения спермы от самцов птиц предложены различные методы (спермособирателя, электроэякуляции, искусственной вагины), однако наиболее удобным и эффективным оказался метод массажа живота.

Получение спермы от петухов. Петухов изолируют от самок и через 15-20 дней начинают приучать к ручному массажу. Перед получением спермы клоаку освобождают от каловых масс и протирают ее стерильной марлевой салфеткой. Затем помощник ставит петуха на стол, придерживая левой рукой в области груди. Одновременно ладонью правой руки поглаживает несколько раз спину его от последних шейных позвонков до корня хвоста. На поглаживание петух реагирует подниманием хвоста. После этого левой рукой фиксирует конечности петуха и берет его под мышку. Правой рукой нажимает на заднюю часть брюшной стенки петуха, что приводит к выпячиванию клоаки. Техник подставляет стерильный спермоприемник (флакон, широкую короткую пробирку) к клоаке петуха, а другой рукой слегка надавливает на нее с обеих сторон и делает массирующие движения. Это вызывает эрекцию копуляторного органа и эякуляцию. Сперма медленно стекает в подставленный спермоприемник.

Получают сперму от петухов один раз в день или через день. Объем эякулята у самцов различных пород колеблется от 0,2 до 0,9 мл, чаще 0,2-0,5 мл. Концентрация сперматозоидов в сперме 3,0-3,5 млрд. в мл.

Получение спермы от индюков. Подготовку самцов начинают за 1,5 месяца до намеченного срока осеменения. Их переводят на рационы племенного периода; продолжительность светового дня увеличивают с 7-8 ч. до 14 ч. в сутки. Используют индюков с 8-месячного возраста. Получают сперму методом ручного массажа. Индюка помещают на специальный столик (станок) в горизонтальном положении. Оператор-массажист левой рукой фиксирует его так, чтобы кисть руки была свободной; потом кистями обеих рук в течение нескольких секунд делает легкий двусторонний массаж вдоль лонных костей по направлению от грудной клетки к хвостовой части. Тех-

ник по взятию спермы в это время при помощи анатомического пинцета проводит обработку клоаки и области вокруг нее стерильным ватным тампоном, смоченным 0,02%-ным раствором фурацилина, а после - сухим тампоном. Затем оператор-массажист ребром правой ладони делает 8-10 легких ударов по задней мягкой части живота. Техник в это время большим и указательными пальцами правой руки поглаживает вокруг клоаки самца, а затем сжимает с боковых сторон кольцо клоаки до появления копуляторного органа и извержения спермы.

На ряде птицефабрик сперму получают на специальном столике, который на роликах передвигается вдоль рядов клеток, где содержатся самцы. Плоскость столика находится на уровне пола клетки. Перед взятием спермы индюка извлекают из клетки и ставят на стол. При легком поглаживании мягкой части живота у приученного, натренированного индюка появляется половое возбуждение, эрекция и эякуляция. Чтобы получить большие эякуляты, техник по взятию спермы должен производить пальцами движения вокруг копуляторного органа, имитирующие выдавливание. На получение спермы от одного самца затрачивается около одной минуты.

Более часто для получения спермы от индюков используют специальные станки (рис. 50). В станке, используемом на птицефабриках СНГ, имеется углубление длиной 25 см, шириной 22 см, глубиной 12 см. В углублении фиксируют индейку и накрывают ее щитком (30x30 см, высотой 12 см), изготовленным из проволочной сетки. Щиток прикреплен к столу одной из боковых сторон и свободно откидывается. Он предохраняет индейку от травм, которые может нанести самец в момент проявления рефлекса топтания. На столик помещают индюка. При виде самки индюк возбуждается и делает попытку к спариванию. После этого у него слегка массируют мягкую часть живота или вокруг клоаки. Это способствует подготовке половых органов к эякуляции (рис. 50). В момент эрекции и появления копуляторного органа техник большим и указательными пальцами левой руки надавливает на него с боков. В правой руке он удерживает вакуумный или обычный стеклянный спермоприемник, в которые собирается сперма при эякуляции. Выделение спермы происходит обычно через 35-40 секунд после начала подготовки самца.

Вакуумный спермоприемник состоит из термостабильной пробирки (сосуда), резиновой пробки с двумя отверстиями, двух термостабильных стеклянных трубок, изогнутых под углом 90°, резинового шланга длиной 70 см и стеклянного мундштука.

После 2-3 процедур у самцов вырабатывается условный рефлекс на массаж и для получения спермы достаточно манипуляций, связанных с обработкой клоаки. Сначала от самца получают 0,05-0,15 мл спермы, а после выработки условного рефлекса - 0,3-0,4 мл. Максимальный объем одного эякулята достигает 1,25 мл.

Индюков, у которых не удается выработать условного рефлекса на массаж, стимулирующего эякуляцию (3-5%), а также выделяющих сперму

низкого качества, выбраковывают. Сперму получают не более двух раз в неделю.

Сперму у гусаков получают также, как и у индюков. Гусаки выделяют 0,1-1,3 мл спермы с концентрацией 0,3-0,9 млрд. сперматозоидов в 1 мл.

Оценка качества спермы. Для оценки спермы определяют ее внешние свойства (цвет, консистенцию), объем, густоту, подвижность и концентрацию сперматозоидов. Объем эякулята определяют по верхнему мениску градуированного спермоприемника или градуированной пипеткой. Цвет и густоту спермы определяют визуально.

У индюка *густая сперма* имеет консистенцию сметаны; в 1 мл содержит 8 млрд. сперматозоидов или более. Она почти не стекает по желобку копуляторного органа, в массе своей имеет выпуклую форму. *Средняя сперма* с консистенцией густых сливок, медленно стекает по желобку толстым слоем; в 1 мл 6-8 млрд. клеток. *Редкая сперма* с консистенцией густого молока или редких сливок, тонким слоем стекает быстро по желобку; в 1 мл содержит 3-5 млрд. сперматозоидов.

Подвижность сперматозоидов оценивают под микроскопом, нередко в смешанных эякулятах (от 7-10 самцов), а концентрацию - путем подсчета в счетной камере и с помощью ФЭК или спектрофотометра. Вследствие высокой концентрации оценка подвижности сперматозоидов по 10-балльной системе затруднена. Н. Канарейкин (1975) использовал 6-балльную систему оценки качества спермы индюков: 1 балл - движение сперматозоидов настолько энергично, что едва можно различить отдельные клетки; 2 балла - движение сперматозоидов энергичное, но можно различить отдельные клетки; 3 балла - движение спокойное поступательное; 4 балла - слабое (ленивое) замирающее движение; 5 баллов - слабое колебательное движение; 6 баллов - сперматозоиды неподвижные. Для осеменения рекомендует использовать сперму индюков с оценкой 1 и 2 балла.

Разбавление спермы. Оплодотворяющая способность свежеполученной спермы птиц сохраняется не долго. Сперму петухов и индюков можно использовать в течение 30 мин., а чтобы обеспечить стабильно высокие результаты выводимости цыплят и индюшат - ее используют в течение 15-20 минут. После разбавления сперму можно хранить до 2-3 часов. Для разбавления используют несколько сред (табл. 6). Разбавляют сперму 1:1 - 1:3.

Таблица 6

Состав сред для разбавления спермы птиц

Наименование реактива	ВИРГЖ-2	Лейка	Тироде
Натрия хлорид	-	-	0,8
Калия хлорид	-	-	0,02
Кальция хлорид	-	-	0,02
Магния хлорид	-	0,0676	0,01
Натрия ацетат	-	0,613	0,1
Натрий двузамещенный фосфорнокислый	-	-	0,005
Калия цитрат	-	0,128	-

Натрий глутаминовокислый	2,8	1,92	-
фруктоза	-	1,0	1,0
Глюкоза	1,8	-	-
Дистиллированная вода	100 мл	100 мл	100 мл

Искусственное осеменение кур. Осеменяют кур, как правило, во второй половине дня, после яйцекладки. Для введения спермы используют индивидуальные стеклянные или полиэтиленовые пипетки с полиэтиленовым или резиновым баллончиком, длиной 100-150 мм и диаметром 6-7 мм. Удобен и микрошприц (шприц-полуавтомат) для осеменения овец с укороченным напополю катетером. Осеменение обычно проводят вдвоем. Помощник берет курицу и не вынимая из клетки фиксирует левой рукой за хвост, несколько отгибая его к спине. Правой рукой надавливает на левую сторону живота между лонными костями и задним концом грудной кости. После того как клоака курицы начнет выпячиваться, техник левой рукой слегка растягивает ее, надавливает вокруг, пока не покажется отверстие яйцепровода. Затем вводит пипетку со спермой в канал яйцепровода на глубину 4-5 см. В этот момент помощник прекращает давление на живот курицы и убирает руку.

Для осеменения используют свежеполученную или разбавленную сперму в дозе 0,025-0,03 мл, с содержанием в дозе не менее 100-150 млн. сперматозоидов и подвижностью не ниже 7 баллов. При первом осеменении вводят двойную дозу (0,05 мл), чтобы создать хорошую насыщенность яйцепровода сперматозоидами. Повторно осеменение проводят через каждые 5 дней.

Искусственное осеменение индеек. Осеменяют индеек при помощи шприца-полуавтомата, который применяют для осеменения овец, или индивидуальных пипеток из стекла или полистирола. Повторно употреблять пипетки можно после тщательного промывания их и стерилизации. Для осеменения индейки помощник прочно фиксирует ее левой рукой за обе ноги и надавливает на живот. Правой рукой заворачивает хвост на спину; при этом голова птицы должна находиться внизу. Техник левой рукой выворачивает клоаку до появления отверстия яйцепровода и вводит пипетку со спермой в канал его на глубину 4-5 см. В момент введения спермы помощник отпускает хвост индейки и несколько ослабляет общее фиксирование. Сперму выдавливают из инструмента только после того, как яйцепровод втянется в брюшную полость. Затем не разжимая пальцев на резиновом наконечнике пипетки извлекают ее из клоаки индейки. Индейку осторожно опускают на пол.

Первое осеменение индеек в стаде проводят через 14-17 дней после начала подготовки к яйцекладке и затем осеменяют еще дважды через 3-4 дня. После этого в течение 3-х месяцев яйцекладки осеменяют самок через 10-14 дней. В течение 4-5-го месяца интервалы между осеменением уменьшают до 9-10 и 8-10 дней, а в течение 6-го месяца осеменяют еженедельно. Оптимальная доза разбавленной 1:1 или неразбавленной спермы - 0,025 мл.

Осеменение гусынь проводят в специальном станке (табуретка с широким желобом) во второй половине дня. Помощник держит птицу левой рукой у основания крыльев, а правой рукой слегка отгибает хвост. Техник вводит в клоаку гусыни

указательный палец правой руки в перчатке и нащупывает отверстие яйцепровода, которое расположено левее и ниже входа в клоаку на 2-4 см. Затем вводит в его канал пипеткой 0,05 мл неразбавленной спермы с содержанием в ней 30-50 млн. подвижных сперматозоидов. Осеменение проводят каждые 6 дней.

Сперматозоиды у птиц размещаются в складках яйцепровода и сохраняют способность к оплодотворению у кур в течение 12-14 дней, у индюшек - 30-40 дней.

Учет и отчетность на племпредприятиях и пунктах искусственного осеменения сельскохозяйственных животных

Цель занятий: ознакомиться с формами учета производственной деятельности племпредприятий, районных станций и пунктов искусственного осеменения.

Объекты исследований, материалы и оборудование: инструкция по взятию, оценке и замораживанию спермы быков-производителей на племпредприятиях (1998 г., РБ), инструкция по организации и технологии работы предприятий и пунктов по искусственному осеменению сельскохозяйственных животных; инструкция по искусственному осеменению и воспроизводству стада в скотоводстве (1999 г., РБ); инструкции по искусственному осеменению коров, овец, свиней, кобыл; журналы и бланки форм учета на племпредприятиях и пунктах искусственного осеменения животных; календари оператора по искусственному осеменению, другие формы оперативного учета и контроля воспроизводительной функции животных и результатов осеменения их; персональный компьютер, оснащенный соответствующими программами для ведения учета.

Методические указания.

Занятие проводится в лаборатории кафедры или учебном пункте. Студентов обеспечивают бланками форм учета и отчетности. Преподаватель знакомит студентов с содержанием журналов, бланков и правилами заполнения их и внесения соответствующих данных в компьютер. Затем студентам выдается задание и они заполняют под руководством преподавателя необходимые данные по учету и отчетности. С отдельными документами и правилами оформления их студентов знакомят во время посещения племпредприятия.

Документы, которые отражают производственную деятельность племпредприятия и пунктов искусственного осеменения животных в зоне его деятельности, хранятся в отдельных папках. Данные основных документов вносятся в память компьютера и записываются на дискеты.

В папке индивидуального учета производителя находятся: фотография производителя; племенное свидетельство; заводская карточка; журнал учета использования производителя и показателей спермопродукции (форма № 1-ио); ветеринарный паспорт производителя (форма № 13-ио); акты перевода производителя из младшей в старшую группы, о выросте и выбытии, результаты испытания по качеству потомства. В ветеринарном паспорте отражаются данные о состоянии здоровья животного, ветеринарных диагностических исследованиях, обработках и др.

По каждому производителю предприятие ведет лабораторный журнал учета качества спермы (форма № 2-ио) с приложением ведомостей на отправку спермы в хозяйства. В этот журнал заносят данные по всем эякулятам не зависимо от их качества, а также о времени взятия их. Данные журналов №№ 1 и 2-ио заносятся также в компьютер.

На пункты хозяйств сперму производителей доставляют с сопроводительным документом - *ордером* (накладной) на отправку спермы (форма №

3-ию), который составляют в двух экземплярах. На лицевой стороне ордера приводятся сведения о производителе, количестве и качестве спермы. На обратной стороне документа оператор по искусственному осеменению вносит данные о животных, осемененных этой спермой, а также о ее качестве. Такие сведения обычно представляются на отдельных листах в районную станцию.

Форма № 4-ию - *график доставки спермы* производителя на пункты искусственного осеменения. Обычно используется в случае краткосрочного хранения спермы и необходимости регулярной доставки ее на пункт осеменения. В отдельности по каждому хозяйству племпредприятие (районная станция) ведет *ведомость учета использования спермы* производителя (форма № 5-ию), в которой указывается число осемененных животных и общий расход спермы на осеменение. На каждого производителя в конце года составляется *сводная ведомость учета искусственного осеменения маток по оплодотворяющей способности спермы* (форма № 6-ию). Данные ведомости являются основанием для оценки производителя по плодовитости (воспроизводительной способности). По данным, предоставляемым пунктами искусственного осеменения, районные станции по племенной работе и искусственному осеменению ведут *картотеку* искусственного осеменения коров и телок по каждому обслуживаемому хозяйству.

Оплодотворяемость коров и телок определяют путем ректального исследования животных, по результатам которого составляется специальный *акт* (форма № 8-ию) с приложением списка животных. Данные проверки сводят в ведомости (форма № 9-ию).

Племпредприятие ведет также: *папку с документами по закреплению производителей за хозяйствами* и сроками их использования; *папку с договорами*, заключаемыми между племпредприятием и сельхозпредприятиями, отдельными фермерами; *папку с планами искусственного осеменения животных* в хозяйствах зоны обслуживания племпредприятия; *папку с ведомостями учета использования спермы* производителей и вторыми экземплярами ордеров на сперму; *папку с результатами анализов* кормов, воды, крови, бактериальной загрязненности спермы, смывов из препуция и др.

Ежегодно племпредприятие (районная станция) заключает с каждым хозяйством своей зоны *договор на проведение искусственного осеменения*, который подписывают директор племпредприятия (районной станции) и руководитель хозяйства. В договоре излагаются обязательства каждой из сторон. Племпредприятие обязуется организовать в хозяйстве искусственное осеменение животных, своевременно обеспечивать пункты спермой закрепленных за ними производителей и снабжать их хладоагентом (жидким азотом), инструментами и оборудованием для осеменения; оказывать содействие хозяйству в приобретении (или поставлять) термосов и сосудов Дьюара, в подготовке и переподготовке операторов по искусственному осеменению, организации зооветеринарного контроля воспроизводства животных; осу-

ществлять систематический контроль за результатами осеменения животных и ведением племенной работы.

Хозяйство обязуется подготовить и оборудовать помещение для пункта (лаборатории); выделить (подготовить) специалиста для работы на пункте и снабдить его транспортным средством; вести точные записи осеменения животных и своевременно представлять отчеты о результатах осеменения; приобретать необходимые инструменты, материалы, оборудование; своевременно выплачивать племпредприятию названную в договоре сумму за каждую дозу спермы (за осемененную и оплодотворенную самку).

На каждом пункте искусственного осеменения крупного рогатого скота необходимо иметь *книгу учета осеменений* (журнал искусственного осеменения). Оператор по осеменению животных обязан ежедневно, сразу же после осеменения самки сделать в книге (журнале) соответствующую запись. Эти записи могут дублироваться на компьютере. О результатах своей работы оператор должен отчитываться ежемесячно.

На пункте искусственного осеменения овец и коз помимо *журнала искусственного осеменения*, в который ежедневно вносятся данные об осеменении всех овец по каждой отаре в отдельности, должна быть *ведомость прикрепления маток к производителю, карточки по учету использования баранов-производителей* с регистрацией качества полученной спермы, *ордера* на отправку спермы, *бланки отчета* о ходе искусственного осеменения.

На пункте искусственного осеменения свиней также ведется *журнал искусственного осеменения*, в который вносятся данные о всех выявленных в охоте и осемененных животных, в том числе и повторно. В *лабораторный журнал учета качества спермы* вносятся сведения о времени получения, качестве, степени разбавления и использовании спермы производителя, а также об осемененных свиноматках.

Аналогичные журналы и документы ведутся на пунктах искусственного осеменения кобыл (случной журнал, форма № 3; карточка кобылы, форма № 2 и журнал использования жеребца, форма № 1).

Для своевременного выявления охоты у коров и осеменения их операторы по искусственному осеменению используют специальный календарь. Вместо календаря можно рекомендовать по каждой хозяйственной группе коров вести ведомость отелов и осеменения их на листах бумаги или в компьютере.

Календарь оператора можно сделать из брезента, полотна, фанеры или плотного картона размером 100x55 см. На лист такой величины нашивают (прикрепляют) 32 кармана размером 12x12 см. Можно календарь сделать из дерева или пластика (рис. 51). В верхних трех рядах делают по 7 передвижных, а в четвертом нижнем ряду устанавливают 15 неподвижных ящичков. Двенадцать неподвижных ящичков рассчитаны на месяцы в году,

тринадцатый - для карточек ветврачу, четырнадцатый - для карточек выбраковываемых коров и пятнадцатый - контрольный.

На каждую корову и телку изготавливают карточку. Ежедневно оператор вносит в карточки сведения об отелившихся животных. Такие карточки он помещает в ящик календаря, который будет соответствовать дате предполагаемой охоты (можно с 18 дней после отела). Например, коровы № 824 и 2400 отелились 26 марта, их карточки оператор помещает в передвижной ящик с цифрой 13 (13 марта). Если наблюдением в этот день охота у животных не выявлена, карточки перекадывают в следующий карманчик (14) и т.д. Если корова не проявит половую охоту в течение 20-22-х дней (т.е. до 40 дней после отела), ее карточку помещают в карманчик "Ветврачу". В этот ящик помещают и карточки коров с акушерскими и гинекологическими болезнями. Карточки животных осемененных и не проявивших повторно охоту в течение 50-75 дней помещают в контрольный ящик (для диагностики стельности). Карточки стельных коров помещают в ящики по месяцам года исходя из предполагаемого срока отела.

Широко практиковалось ранее ведение специальных карточек, в которых отражались данные об отеле и приплоде, продуктивности коров, о заболеваниях и лечении их, датах осеменения и результатах исследования на стельность. Данные легко можно было перенести в ведомость. Многие фермеры за рубежом и ныне предпочитают такие ведомости более сложным формам учета. Правильно и постоянно заполняемая ведомость позволяет не только контролировать сроки осеменения, но и быстро и в любой момент определить основные показатели плодовитости по каждому животному и в среднем по стаду.

Нами (Медведев Г.Ф., Экхорутонвен О.Т., Блохин Н.Г., 2001) приспособлены и успешно используются такие ведомости для анализа и контроля воспроизводительной функции коров в племсовхозе им. Чкалова.

Племсовхоз им. Чкалова

Доярка: Автомеенко
Оператор по искусственному осеменению Капустин В.Н.

Корова	Лактация	Дата отела	Дата наблюдения охоты	Производитель	Планируемое осеменение	От отела до 1-го осеменения, дней	Дата 1-го осеменения	Интервал между осеменениями	Дата 2-го осеменения	Интервал между осеменениями
824	1	13.10.99	07.11.99		27.11.99	47	29.11.99	44	12.01.99	39
2400	9	28.12.99			11.02.00	52	18.02.00	21	10.03.00	

Дата 3-го осеменения	Интервал между осеменениями	Дата 4-го осеменения	Интервал между осеменениями	Дата 5-го осеменения	Интервал между осеменениями	Дата 6-го осеменения	Число осеменений	Сервис период	Дата запуска	Заболевания, осложнения, назначаемое лечение
20.02.99	20	12.03.99					4	150		Эндометрит

ТРАНСПЛАНТАЦИЯ ЗАРОДЫШЕЙ

Оплодотворенная яйцеклетка попадает в матку и развивается там до состояния зрелого плода. Развитие яйцеклетки при удачной трансплантации (пересадке) может происходить и в матке другого животного (реципиента), если в момент пересадки стадии полового цикла коровы - донора эмбрионов и реципиента совпадают.

Впервые пересадка зародышей была осуществлена Хиппом в 1890 году у крольчих. С тех пор работы в этом направлении проводились и на других видах животных и это сделало трансплантацию зародышей одним из фундаментальных методов исследования воспроизводительной функции, в частности, процессов оплодотворения и беременности. В настоящее время трансплантация зародышей имеет огромное практическое значение. Во многих странах функционируют коммерческие центры по трансплантации зародышей крупного рогатого скота и других животных.

Цель занятий: познакомить студентов с основными приемами (процессами) метода трансплантации зародышей сельскохозяйственных животных.

Объекты исследований, материалы и оборудование: коровы-доноры зародышей и телки реципиенты (другие животные); станки для фиксации животных; оборудование и инструменты для извлечения и пересадки зародышей; микроскопы МБС-9 или МБС-10, инвертированный микроскоп “Labovert” или стереомикроскопом “Nikon”; микроманипулятор ПМ-2 или манипулятор французской фирмы “JMV” марки REF-4080; стеклянная микропипетка-игла; термостат, бытовой холодильник, сушильный шкаф, автоклав, бактерицидные лампы, шприцы для инъекций; сосуд Дьюара, жидкий азот, замораживатель эмбрионов ЗЭМ 4; среда Дюльбекко, фетальная сыворотка, глицерин, этиленгликоль; пенициллин, ампициллин, гентамицин или другие антибиотики; гонадотропины (FSG-P, ФСГ-СУПЕР, фоллигон и др.), простагландины, миорелаксанты, 2%-ный раствор новокаина, этиловый спирт 96%-ный, спиртовые тампоны, стерильный вазелин; чашки Петри одноразовые различного диаметра, стекла часовые, соломины для замораживания зародышей.

Методические указания.

Проводится два занятия: одно в лаборатории кафедры, другое в биотехнологическом центре (на пункте трансплантации зародышей) или на ферме.

На первом занятии преподаватель знакомит студентов с методом трансплантации зародышей у крупного рогатого скота и других животных, его основными технологическими элементами (приемами), значением для селекции и воспроизводства животных, масштабами применения в Республике Беларусь и других странах. Демонстрирует инструменты, оборудование, материалы, применяемые при трансплантации зародышей, и объясняет правила их подготовки и использования. Затем знакомит с методами вызова суперовуляции у коров-доноров и подготовки реципиентов. После этого вместе со студентами определяется место и план работы, назначаются ответственные студенты за выполнение каждого технологического элемента.

Второе занятие планируют так, чтобы оно совпало с 7 или 8-м днем после осеменения коровы-донора. Для этого заранее вне занятий назначенные студенты под контролем специалиста или преподавателя инъецируют отобранной корове гонадотропин и простагландин согласно схемы их применения, вызывают суперовуляцию. Одновременно проводят работу по отбору телок-реципиентов и синхронизируют у них охоту. В процессе занятия преподаватель объясняет студентам правила подготовки коровы-донора и телок реципиентов к соответствующим процедурам, знакомит их с методикой извлечения зародышей, отыскания их и оценки качества, условиями кратковременного хранения или замораживания, техникой пересадки реципиентам. После этого определяют у коровы-донора степень реакции яичников на гонадотропины и выполняют все процедуры метода трансплантации зародышей.

Вопросы:

1. Как используется трансплантация зародышей в разведении крупного рогатого скота? Каково значение, масштабы использования этого метода и какие достижения?
2. Какие гормональные препараты используются для стимуляции суперовуляции у коровы?
3. Кратность введения и дозы ГСЖК и ФСГ при стимуляции суперовуляции?
4. Как синхронизировать половые циклы коровы-донора эмбрионов и животного реципиента?
5. Какие инструменты используются для извлечения и пересадки зародышей у коров?
6. Сущность нехирургического способа извлечения и пересадки зародышей? На какой день после осеменения коровы-донора производят извлечение зародышей? Объяснить.
7. Как оценивают зародыши? В течение какого срока их можно хранить до пересадки?
8. Как можно сохранить зародыши в течение длительного срока?
9. Как часто можно вызывать у коровы-донора суперовуляцию?
10. Сколько телят трансплантатов можно получить за год от одной коровы-донора?

Стимулирование суперовуляции у коров-доноров

Трансплантация зародышей может быть эффективной в том случае, когда за один прием от донора будет получено по крайней мере несколько половых клеток. А это возможно только в результате искусственного стимулирования суперовуляции.

Вызвать суперовуляцию можно путем применения гонадотропина СЖК или очищенного ФСГ. Эти гормоны применяют в отдельности или в комплексе с гонадотропин-рилизинг гормоном, простагландином, эстрогенами, хорионическим гонадотропином.

Существуют два основных способа вызова суперовуляции с помощью ГСЖК (фоллигон, сергон, прегмагон и др. препараты).

Ирландский способ (по Т. Greve, 1977).

Дни цикла:

16 или 17	1500-3000 ЕД ГСЖК внутримышечно (в/м);
19 или 20	10 мг эстрадиола-бензоата в/м;
21	Половая охота; 1500-3000 ЕД хорионического гонадотропина (ХГТ) в/м.
1	Первое осеменение
2	Второе осеменение
5	Хирургическое извлечение зародышей
6-8	Нехирургическое извлечение зародышей

Датский способ (по N.O. Rasbech, 1976)

Дни цикла:

8-12	1500-3000 ЕД ГСЖК в/м;
10-14	25 мг ПГ Ф2 альфа или 500 мкг клопростенола в/м. Через 48 часов:
0	половая охота.
1	Первое осеменение
2	Второе осеменение
6-8	Нехирургическое извлечение зародышей.

Будевич И.И., Н.Ф. Жук и А.И. Будевич* рекомендуют вводить сергон или прегмагон в середине цикла (11 или 12-й день) в дозе 2500-3000 МЕ, а эстрофан через двое суток в дозе 3 мл (750 мкг клопростенола). Через 48 час. (т.е. в день охоты) инъектировать диригистран (гонадорелин) в дозе 200 мкг при использовании сергона или через 56 час. - анти-СЖК 600 МЕ при использовании прегмагона. Осеменять животных в 20 и 19 час. в день охоты и в 8 и 7 час. на следующий день. Извлекать зародыши на 7-й день. (*Эти и ниже цитируемые сведения предоставлены лично авторами).

Гонадотропин СЖК оказывает более продолжительное действие, чем эндогенный или экзогенный ФСГ, а соотношение ФСГ и ЛГ в различных сериях препарата неодинаково. В результате гормональной обработки нередко отмечается увеличение массы яичников, образование после овуляции различного числа и разной величины желтых тел. Высока изменчивость числа овуляций, иногда низкий выход качественных эмбрионов. Для предотвращения нежелательных явлений вводят дополнительно антисыворотку на СЖК. Эстрогены вводятся для повышения оплодотворяемости, а ХГТ и простагландины для ускорения овуляции.

Главное достоинство применения ГСЖК для вызова суперовуляции - однократное введение животному всей дозы препарата. Однако более стабильные результаты получают при использовании очищенного ФСГ, получаемого из гипофиза свиней или кобыл. Общая доза на обработку препарата ФСГ-П (США) - от 32 до 50 мг или более. Инъектируют гормон два раза в день с промежутком 12 часов.

Дни цикла:			
8...12	утро	(8 ⁰⁰)	ФСГ-П 7 мг
	вечер	(20 ⁰⁰)	ФСГ-П 7 мг
9...13	утро	(8 ⁰⁰)	ФСГ-П 6 мг
	вечер	(20 ⁰⁰)	ФСГ-П 6 мг
10...14	утро	(8 ⁰⁰)	ФСГ-П 4 мг + клопростерол 500 мкг (эстрофан 2 мл)
	вечер	(20 ⁰⁰)	ФСГ-П 4 мг + клопростерон 500 или 250 мкг (эстрофан 2 или 1 мл)
11...15	утро	(8 ⁰⁰)	ФСГ-П 3 мг
	вечер	(20 ⁰⁰)	ФСГ-П 3 мг
12...16			
(1)		Половая охота.	Осеменение в 20 ⁰⁰
(2)			Осеменение в 8 ⁰⁰ и 20 ⁰⁰

Используют и другие схемы гормональной обработки коров-доноров эмбрионов (в течение 5 дней по 10 мг ФСГ-П, простагландин на 4-й день, начало обработки на 8-й день полового цикла; в течение 4-х дней: 15 мг, 12 мг, 10 мг и 5 мг ФСГ-П, простагландин на 3-й день и т.д.). Дозу гормона регулируют в зависимости от серии препарата, срока его хранения, индиви-

дуальной чувствительности животных и других факторов. Препарат "ФСГ-СУПЕР" (Россия) применяют в течение 3-х дней: вводят по 7 мг (8 мг) два раза в день. Простагландин инъецируют на 3-й день. Будевич И.И., Жук Н.Ф. и Будевич А.И. рекомендуют 7 или 8 инъекций этого гонадотропина: в первый день по 9 ЕД., во второй день - по 8 ЕД., в третий день по 5 ЕД и в четвертый день одна инъекция 6 ЕД или две инъекции по 3 ЕД; эстрофан необходимо инъецировать на третий день дважды по 2 и 1 мл.

В результате применения гонадотропинов не все крупные фолликулы завершают развитие овуляцией. Присутствие в яичниках таких фолликулов может привести к нарушениям гормонального статуса доноров. С целью исключения длительной стимуляции роста фолликулов и наступления синхронной овуляции И.И. Будевич, Н.Ф. Жук и А.И. Будевич рекомендуют инъецировать в день охоты донора утром и вечером сурфагон по 20 мкг. Этот аналог ГнРГ способствует выделению ЛГ и овуляции фолликулов в фиксированное время. При 4-х дневной обработке (ФСГ-П, ФСГ-супер, ФСГ-Б) на 6-9% увеличивалось количество овуляций и на 11-19% число эмбрионов, пригодных к пересадке.

У обработанных животных число овуляций варьирует от 0 до 91, чаще 10-15. Это зависит от дозы и качества гормональных препаратов, индивидуальных особенностей животных и ряда других факторов. Увеличение дозы ГСЖК увеличивает число зрелых фолликулов, но процент овуляций может снижаться. Большие дозы препарата нередко вызывают образование кист яичников, геморрагических фолликулов или их лютеинизацию. Некоторые животные совершенно не реагируют на введение гонадотропных гормонов; процент таких коров может достигать 20-40. В Беларуси (Брестский центр трансплантации, В.Ю. Бабенков, С.К. Буткевич) от коровы Королева черно-пестрой породы, продуктивностью более 8 тыс. кг молока после обработки ФСГ-П получено 44 зародыша, в т.ч. 42 пригодных.

В качестве коров-доноров эмбрионов отбирают ценных в генетическом отношении животных, хорошо реагирующих на введение гонадотропинов и дающих биологически полноценные зародыши. Молочная продуктивность донора за ряд лет должна быть выше стандарта данной породы в среднем на 50-60 %, а содержание жира в молоке - на 20 % и более. Используют обычно коров, имеющих не менее двух - трех лактаций, в возрасте не более 8-9 лет. После родов гормональную обработку не следует начинать ранее, чем через 2-3 месяца. До обработки животное должно проявить один-два половых цикла.

Извлечение эмбрионов.

При нехирургическом извлечении зародышей у коров катетер вводят поочередно в рога матки через шейку матки под ректальным контролем. Оптимальное время для извлечения - 7-8-й день от начала половой охоты. К этому времени большинство зародышей будет находиться в верхушках рогов матки на протяжении около 10 см от соединения матки с яйцепрово-

дом. Используют двух- или трехходовые катетеры Фоллея (рис. 52) из латексной резины или телескопический комбинированный трехходовой инструмент с внутренним выдвигающимся эластическим катетером фирмы IMV.

Перед извлечением зародышей путем ректального исследования подсчитывают число желтых тел в яичниках коровы-донора. Наличие 10 или более желтых тел указывает на хорошую ответную реакцию животного на гормональную обработку, а менее 5 желтых тел - на слабую реакцию. Для проведения операции корову фиксируют в станке в положении стоя. Желательно, чтобы тазовые конечности животного находились несколько выше передних. Для предупреждения частой дефекации и снятия мышечного напряжения делают сакральную анестезию. В эпидуральное пространство между крестцовой костью и первым хвостовым позвонком вводят 5 мл 2 %-ного раствора новокаина. Строптивым коровам вводят внутримышечно миорелаксант (рампуно) 0,5 -0,7 мл или маточный релаксант комбилиен 0,7-1,0 мл, или ханегиф 10 мл, или аминазин 5 мл. Теплой водой с мылом моют наружные половые органы и корень хвоста, вытирают бумажными салфетками или ватными тампонами.

Металлический катетер и переходники стерилизуют кипячением, а латексный катетер обеззараживают в 96%-ном спирту, после чего промывают средой Дюльбекко. В латексный катетер затем вставляют стерильный металлический стилет и фиксируют в замковом узле катетера. Предварительно стилет смазывают стерильным вазелином или вазелиновым маслом. Снаружи катетер также можно слегка смазать вазелиновым маслом, после чего его помещают в защитный полиэтиленовый чехол.

Катетер в чехле вводят во влагалище и направляют в канал шейки матки. Придерживая инструмент в таком положении, сдвигают полиэтиленовый чехол назад, а катетер проводят через шейку матки и направляют в один из рогов матки. При этом металлический стилет вынимают из катетера постепенно, по мере введения катетера в рог матки. Важно правильно разместить катетер в роге матки. В большинстве моделей инструментов из латексной резины баллончик для воздуха находится на расстоянии около 5 см от кончика его. На этом участке в катетере проделано с различных сторон на различных уровнях четыре отверстия для выхода и входа промывной жидкости. Желательно, чтобы кончик катетера находился на расстоянии около 6 см от соединения яйцепровода с маткой (рис. 52). В этом случае расстояние от тубо-маточного соединения до баллончика составит приблизительно 10 см. Это как раз тот участок, за пределы которого зародыши еще не вышли. Нагнетают воздух в баллончик в количестве 10-20 см³ или дистиллированную воду - 5-6 мл. При этом обязательно контролируют рукой степень наполнения его и расширение рога матки, чтобы не допустить разрыва маточной стенки.

Как только баллончик будет наполнен воздухом (водой), приступают к промыванию перекрытого (баллончиком) участка рога матки. Для этого полиэтиленовый шприц емкостью 50 мл с фосфатно-буферной средой присоединяют к катетеру и вводят осторожно 30-35 мл среды. Затем шприц отсоединяют и жидкость из матки собирают в подготовленный сосуд; при этом открытый конец катетера оберегают от загрязнения. Можно отсасывать жидкость шприцем, после чего отсоединить от катетера. Затем присоединяют другой шприц и вводят столько же среды. В момент присоединения и отсоединения шприца катетер впереди металлического замкового устройства сдавливают пальцами. С каждым последующим введением количества среды увеличивают, доводя до 50-60 мл. А всего для промывания рога матки используют 500 мл среды. Обычно пользуются несколькими шприцами, что при быстром заполнении и смене их значительно уменьшает затраты времени на промывание. Для предотвращения контакта жидкости для промывания матки с внешней средой и обеспечения асептики при извлечении зародышей при помощи двухходовых катетеров нами включен в систему: катетер - шприц дополнительно трехходовой переходник фирмы IMV, из которого предварительно извлекаются клапана и отсоединяется передняя канюля. К боковому патрубку переходника присоединяют эластичную трубку с зажимом. Свободный конец трубки помещают в сосуд для сбора поступающей из матки среды. После введения катетера в матку подготовленный переходник передним концом соединяют с замковым устройством катетера. Задний конец переходника служит для присоединения шприца со средой. В процессе промывания при открытом зажиме на эластичной трубке среда из рога матки поступает в сосуд, не контактируя с воздухом; шприц в таком положении должен оставаться присоединенным с переходником. После закрытия зажима и сдавливания пальцами катетера производят замену освобожденного шприца другим, заполненным средой. Такое усовершенствование процедуры обеспечивает стерильность среды для промывания и предупреждает потери зародышей, что возможно при собирании поступающей из матки жидкости через открытый задний конец катетера. Можно сделать и совершенно замкнутую систему, если емкость со средой соединить трубкой (с зажимом) с задним концом переходника. В этом случае емкость должна быть расположена выше тазовой части животного, чтобы среда поступала в матку самотеком.

После использования всего объема среды (500 мл) в рог матки можно ввести шприцем 30-40 мл воздуха. Иногда вводят воздух два-три раза. Это необходимо для более полного возвращения вводимой в матку среды. При этом имеет значение и умение специалиста контролировать состояние матки рукой через прямую кишку. Отсутствие больших потерь среды (из 500 мл не более 10-15 мл) и примесей в ней крови указывает на достаточно техническое проведение операции.

Когда будет завершено промывание одного рога матки, воздух (воду) из баллончика выпускают и катетер извлекают из половых путей. Другой подготовленный катетер вводят в другой рог матки и всю процедуру повторяют заново. Можно пользоваться и одним катетером, переводя его из одного рога в другой.

В качестве среды для промывания матки используют фосфатно-солевой буфер (ФСБ) Дюльбекко. Непосредственно перед употреблением в ФСБ вводят следующие компоненты (в расчете на 1 л): fetalная сыворотка теленка - 10-20 мл, пенициллин (калиевая соль) - 100 тыс. ЕД, глюкоза 1 г., натрия пируват - 0,036 г. После этого выдерживают в термостате при температуре 37,5°C в течение одного часа и используют для промывания матки.

Завершив промывание, катетер полностью не извлекают и через него вводят в тело матки в 35-50 мл ФСБ пенициллина и стрептомицина по 1 млн. ЕД и тетрациклина 500 тыс. ЕД. Это необходимо для предупреждения эндометрита. Если корову донора используют неоднократно, то целесообразно в день половой охоты перед началом гормональной обработки (т.е. за 8-12 дней до нее) также ввести в матку противомикробные средства. Это будет хорошей гарантией нормального состояния эндометрия в день извлечения зародышей.

Отбор и подготовка животных-реципиентов

В момент трансплантации зародыша организм реципиента должен находиться в той же стадии полового цикла, что и донора - эмбрионов. У крупного рогатого скота разница во времени проявления половой охоты у донора и реципиента не должна превышать 12 часов. Если разница составляет более 24 ч, то приживаемость пересаженных эмбрионов резко снижается.

При наличии многочисленной группы реципиентов (телок) в день трансплантации можно подобрать животных с желательной стадией полового цикла. Однако чаще половые циклы донора и реципиента искусственно синхронизируют. Достигается это инъекцией простагландина $\text{F}_{2\alpha}$ животным-реципиентам в тот же срок, что и коровам-донорам.

В качестве реципиентов могут быть как телки, так и коровы. Телок используют чаще, так как приживаемость зародышей у них выше, чем у коров. Телки-реципиенты должны иметь хорошее развитие, живую массу 350 кг или более и проявлять естественную половую цикличность. Отбирают их на второй день после начала гормональной обработки коров-доноров эмбрионов. Выбирают только животных с хорошо пальпируемыми желтыми телами в яичниках. После введения простагландина за животными наблюдают и регистрируют время начала половой охоты. В день трансплантации зародышей их исследуют ректально и используют только тех телок, у которых в яичниках будут обнаружены хорошо сформированные, нормальные по величине желтые тела.

И.И. Будевич, Н.Ф. Жук и А.И. Будевич для синхронизации охоты у доноров и реципиентов рекомендуют комплексное использование в лютеиновой фазе полового цикла инъекций гонадотропина с простагландином $\Phi_{2\alpha}$ и ГнРГ. Животным с хорошо выраженным желтым телом вводят ФСГ-супер в общей дозе 10 Арм.ед. для телок и 15 Арм.ед. для коров двукратно по 5 и 7,5 Арм.ед. через 12 часов. На следующий день однократно инъецируют эстрофан по 2 мл, а затем через 60 ч - сурфагон по 25 мкг. Начало обработки осуществляется не параллельно: доноров за 15 дней до стимуляции суперовуляции, а реципиентов – на второй день после начала обработки доноров.

Ввиду слабой выраженности охоты и течки у мясных животных, а также высокой частоты гипофункции яичников авторы рекомендуют комплексное применение ПГ $\Phi_{2\alpha}$ с ФСГ-П в дозе 10 мг для коров и 7 мг для телок, или с сывороточным гонадотропином (сергон, Чехия) в дозе 1000 ИЕ для коров и 700 ИЕ для телок. Внутримышечное введение гонадотропина осуществляется соответственно за 24 или 48 часов до инъекции ПГ $\Phi_{2\alpha}$. В отдельных случаях для точного установления охоты у мясных коров необходимо ректальное исследование половых органов.

Оценка качества зародышей

После завершения промывания матки емкости со средой помещают на 20 минут в термостат при 37°C. Можно оставить их и при комнатной температуре (20-25°C). За это время зародыши, находящиеся в верхних слоях жидкости, оседают на дно. С помощью шприца и короткой эластичной трубки осторожно собирают пузырьки воздуха, которые располагаются по бокам сосуда на поверхности жидкости. Затем верхний слой жидкости удаляют с помощью сифона. Удобно при этом пользоваться специальной металлической трубкой. Нижняя часть такой трубки на протяжении 1-1,5 см не имеет просвета, а сбоку на этом уровне в ней проделано отверстие. Вверху трубка изогнута под прямым углом. К этой части ее присоединяется эластичная трубка со шприцем. Длина эластичной трубки должна превышать высоту емкости, чтобы свободный конец ее опускался ниже дна емкости. Металлическая трубка помещается через отверстие в пробке (для устойчивости) до самого дна емкости. Шприцем слегка засасывают жидкость, чтобы она заполнила эластичную трубку, и затем отсоединяют шприц. Жидкость самостоятельно вытекает из емкости. Остается только нижняя часть ее высотой 1-1,5 см. Эту жидкость разливают в маркированные чашки Петри (2-4), дно которых расчерчено на полосы шириной около 1 см для удобства поиска зародышей. Содержимое чашек просматривают под биноклярным микроскопом МБС-9 или МБС-10 при 15-25-кратном увеличении. В качестве источника освещения лучше использовать лампу дневного света.

В настоящее время во многих лабораториях для отыскания зародышей не декантируют промывную жидкость, а фильтруют ее через специальный фильтр.

Обнаруженные зародыши микроманипулятором или короткой пипеткой Пастера с резиновой трубкой или присоединенным к ней шприцем (рис. 52) переносят в среду для краткосрочного хранения (ФСБ+20% фетальной сыворотки). Таковую среду готовят заранее и разливают по 2,5 мл в небольшие полиэтиленовые чашки Петри (2 мл ФСБ со всеми компонентами +0,5 мл фетальной сыворотки) или наносят на часовые стекла по 0,5-1 мл.

Оценивают качество зародышей в проходящем свете под микроскопом МБС-9 (или специальным инвертированным микроскопом) при 100-160-кратном увеличении. Часовые стекла или чашки Петри осторожно покачивают с целью осмотра зародышей со всех сторон. К моменту извлечения (7-8-день) нормально развитые зародыши находятся на стадии развития поздней морулы, ранней или поздней бластоцисты. Они имеют неповрежденную равномерную по ширине опалесцирующую прозрачную оболочку и цитоплазму в состоянии дробления, соответствующем возрасту эмбриона. Морула ранняя (Мо 1) или поздняя (Мо 11) представляют собой скопление бластомеров, не всегда одинаковых по размеру из-за асинхронности дробления. Цитоплазма бластомеров гомогенная, а связь их полигональная. В пространстве прозрачной оболочки не имеется гранул или других включений. У бластоцисты ранней (Бл 1) хорошо различимы группы зародышевых клеток (эмбриобласт) и поверхностных клеток (трофобласт), которые разделены полостью (рис. 53). Пространство прозрачной оболочки почти целиком заполнено. Поздняя (8-суточная) бластоциста (Бл II) имеет большую полость; клетки трофобласта уплощены, соприкасаются с прозрачной оболочкой, которая истончена и растянута; клетки эмбриобласта сгруппированы на одном полюсе. На 9-й день прозрачная оболочка разрывается и бластоциста полностью высвобождается из нее. Морула ранняя с признаками дегенерации характеризуется несимметричным расположением бластомеров, различной величиной их, наличием в пространстве прозрачной оболочки гранул и других включений. Отдельные бластомеры могут быть разрушенными, но другие продолжают дробиться, достигая стадии поздней морулы или бластоцисты ("частичный" зародыш). У бластоцист также отмечается частичное разрушение клеток (в основном трофобласта), сжатие полости и увеличение пространства прозрачной оболочки. Сама оболочка может иметь небольшие трещины. Дегенерированные зародыши отстают на 3-4 деления от нормально развивающихся. Для них характерен распад бластомеров, смещение или фрагментации цитоплазмы (рис. 53). Прозрачная оболочка имеет значительные дефекты, а в пространстве ее находятся фрагменты разрушенных бластомеров.

Морфологическую оценку морул и бластоцист проводят по 5-балльной шкале. Для трансплантации отбирают морфологически нормальные зародыши с оценкой *отлично* и *хорошо*. При наличии свободных реципиентов допускается использование зародышей с оценкой *удовлетворительно* и *условно-годные*. У морул и бластоцист с оценкой *хорошо* отмечается наличие в пространстве прозрачной оболочки гранул и включений, некоторые различия в величине бластомеров, слабо выражена полость бластоцисты. С оценкой *удовлетворительно* - у морул разрушены единичные бластомеры, "частичный" зародыш, у бластоцист полость не выражена, нет дифференциации между клетками трофобласта и эмбриобласта; у морул и бластоцист увеличено пространство прозрачной оболочки и в нем находятся

гранулы и другие включения. С оценкой *условно-годные* - сжатие и частичное разрушение бластомеров и нарушение связи между ними, фрагментация цитоплазмы, дефекты прозрачной оболочки и наличие в ее пространстве гранул, других включений. Выбраковывают неоплодотворенные яйцеклетки и зародыши с оценкой непригодные (несоответствие стадии развития возрасту зародыша, значительные дефекты прозрачной оболочки, распад бластомеров, сильное сжатие их).

Оттаянные после замораживания зародыши оценивают по тем же морфологическим признакам, что и свежеполученные.

Микрохирургическое деление эмбрионов
(по И.И. Будевичу, Н.Ф. Жук и А.И. Будевичу, БелНИИЖ)

Для деления отбираются зародыши как свежеполученные, так и замороженные, только хорошего или отличного качества на стадии поздней морулы или бластоцисты. Микроманипуляции на эмбрионах проводятся с помощью микроманипулятора ПМ-2 или манипулятора французской фирмы "JMV" марки REF-4080 в чашке Петри под инвертируемым микроскопом "Labovert" или стереомикроскопом "Nikon".

В качестве рабочего инструмента для деления используется стеклянная микропипетка-игла, изготавливаемая из стандартных капилляров с внутренним диаметром 0,8 мм и внешним 1,2 мм на пуллере отечественного производства по методу Никитина В.А. Оптимальными являются следующие размеры: длина плеча 2,5 мм, конусная часть - 10 мм. Рабочей поверхностью служит чашка Петри с обрезанным краем. Для фиксации клетки на дно чашки наносятся металлической иглой штрихи в разных направлениях.

Перед началом работы приготавливаются рабочие среды. Среда на основе фосфатно-солевого раствора Дюльбекко с добавлением 20% эмбриональной сыворотки и антибиотиков (100 ед./мл ампициллина и 12 мкг/мл гентамицина) используется для деления зародышей. Культивирование половинок проводят в среде TC-199 с добавлением 20% эмбриональной сыворотки плодов коров, антибиотиков (100 ед./мл ампициллина или 12 мкг/мл гентамицина), лактата кальция (0,6 мг/мл), пирувата натрия (0,2 мг/мл) и глутамина (0,15 мг/мл).

Деление эмбрионов осуществляют следующим образом. После оценки пригодные для микрохирургии зародыши переносятся в среду Дюльбекко. Затем клетка в капельке среды помещается на подготовленную чашку Петри над штрихами. Над ней размещают нож таким образом, чтобы плечо ножа не касалось чашки. Угол наклона ножа составляет 5°-25° к рабочей поверхности. Эмбрионы рассекаются опусканием ножа в медиальную плоскость клетки, одновременно разделяя оболочку и внутреннюю клеточную массу. При делении бластоцист необходимо разделять как эмбриобласт, так и трофобласт строго по середине. При проведении микрохирургической операции соблюдаются следующие правила: 1 - микроигла на эмбрион опускается постепенно, с паузами (нажим, пауза, нажим, пауза и т.д.); 2- после начала деления нельзя резко поднимать нож, т.к. клетка находится в напряженном состоянии и резкое поднятие ножа вызывает отрицательное давление, что приводит к гибели клетки. Эмбрионы делят двумя методами. В первом случае они рассекаются полностью, полученные половинки в дополнительные зоны пеллюцида не пересаживаются. Во втором случае деление прозрачной оболочки проводится частично, а внутренняя клеточная масса делится полностью. Полученные полуэмбрионы остаются в собственной оболочке. Критерием успешного деления считают минимальное повреждение бластомеров и получение симметричных половинок.

Затем полуэмбрионы переносятся в среду для культивирования и помещаются в термостат при температуре +38°С во влажную атмосферу, содержащую 5% CO₂ на 0,5-24 часа. Если в результате культивирования эмбрионы округлились, приняв обычную форму, считается, что деление прошло успешно. Их направляют в пайетты и пересаживают реципиентам.

Пересадка прокультивированных половинок эмбрионов проводится нехирургическим методом по одной половинке в разные рога матки реципиента или обе половинки в один рог матки.

Деление зародышей с последующей пересадкой половинок является наиболее эффективным биотехнологическим методом получения телят-двоен у крупного рогатого скота. Этот метод, прежде всего, позволяет обеспечить билатеральное (т.е. в обоих рогах) размещение эмбрионов в матке реципиента, способствующее благоприятному течению стельности и отелов.

Отличительными особенностями является то, что в качестве реципиентов необходимо использовать полновозрастных коров живой массой 550-600 кг. При проявлении признаков половой охоты параллельно проводится искусственное осеменение коров-доноров и реципиентов. На 7-8 день после осеменения в случае наличия в яичнике хорошо выраженного желтого тела реципиентам пересаживают один эмбрион в контрлатеральный рог матки (т.е. в противоположный рог, смежному с яичником, имеющим желтое тело).

В целом, данный биотехнологический прием позволяет получить до 63,1% стельных коров, из которых 66,6% - стельных двойнями.

Результативность повышается, если осеменение коров-доноров проводить семенем быков не родственных быкам, семенем которых осеменяют реципиентов. В этом случае, трансплантация реципиентам гетерозиготных (неодинаковых по генетическим задаткам) эмбрионов относительно собственных обеспечивает стельность в 72,2% случаев, при этом двойневые стельности составляют 70,8%.

Следует учитывать тот факт, что отёлы двойней в 2-3 раза чаще, чем одиноком, требуют оперативного вмешательства, главным образом, из-за одновременного вступления плодов в родовые пути коровы. Отёлы у коров должны проходить в родильном отделении под наблюдением ветспециалистов.

Хранение и культивирование зародышей

В среде для краткосрочного хранения зародыши можно выдерживать при комнатной температуре не более 5-6 часов до момента использования. Однако наиболее высоких показателей приживаемости достигают при трансплантации их реципиентам в первые 1-1,5 часа с момента извлечения.

Глубокое замораживание и хранение зародышей в жидком азоте позволяет сохранить ценный генетический материал при отсутствии животных-реципиентов, в течение длительного периода поддерживать жизнеспособность зародышей, а также проводить трансплантацию их в строго определенные сроки с максимальной эффективностью. Технология длительного хранения зародышей предусматривает: выбор криопротектора и приготовление растворов различной концентрации; оценку зародышей, насыщение их криопротектором и постепенное охлаждение с помощью программных замораживателей; перенос зародышей в жидкий азот и их хранение; оттаивание и освобождение зародышей от криопротектора; морфологическую оценку зародышей по пригодности к трансплантации, заправку их в пайетты и катетеры и пересадку реципиентам.

Для замораживания используют только свежеполученные зародыши с оценкой отлично и хорошо. От момента получения до замораживания должно проходить как можно меньше времени. Замораживание проводят в растворах глицерина на ФСБ с добавлением пенициллина и 20% фетальной сыворотки. Работу проводят в стерильных боксах. Растворы наливают в стерильные часовые стекла или чашки Петри. Перед замораживанием зародыши последовательно помещают на 5 мин. в заранее приготовленные растворы криопротектора с концентрацией 0,25 М (1 мл 0,5 М раствора + 1 мл ФСБ); 0,5 М (2 мл 1,0 М раствора + 2 мл ФСБ); 0,75 М (1 мл 1 М + 1 мл 0,5 М раствора глицерина) и 1,0 М (0,74 мл глицерина + 9,26 мл ФСБ). После выдержки в последнем растворе глицерина (10 мин.) зародыши забирают в соломинки (по 1-2 зародыша в каждую). При наличии эмбрионов отличного качества можно помещать зародыши сразу в 1,0 или 1,4 М раствор глицерина и выдерживают в нем до 30 мин.

Будевич И.И., Н.Ф. Жук и А.И. Будевич (2001) рекомендуют рабочие растворы криопротектора готовить на основе ФСБ, содержащей 4% фетальной сыворотки, 100 ед./мл ампициллина и 12 мкг/мл гентамицина. Одновременное насыщение зародыша криопротектором осуществлять в 1,4 М рас-

творе глицерина (1 мл глицерина + 9 мл среды), или 1,5 М растворе этиленгликоля (0,84 мл этиленгликоля + 9,16 мл среды) в течение 10 и 5-10 мин соответственно.

Заправку соломинок проводят в такой последовательности: раствор глицерина 1,4 М ($^{2/5}$ объема соломинки), пузырек воздуха, зародыш в 1,4 М раствора глицерина ($^{1/5}$ объема соломинки), пузырек воздуха, 1,4 М раствор глицерина ($^{2/5}$ объема). Столбик раствора криопротектора должен коснуться пробки из поливинилового спирта. Свободный конец соломинки закрывают пластмассовой пробкой и подвергают замораживанию с помощью программных замораживателей: ЗЭМ-4 (Украина), Минукул АС-25 (Франция), ЭМБИ-К (Россия). Хранят в кассетах с держателем в сосудах Дьюара.

Таблица 7.

Режим замораживания эмбрионов (по Будевич И., Жук Н. и Будевич А.)

Этапы работ при замораживании	ЗЭМ-4		ЭМБИ-К	
	1,4 М глицерин	1,5 М этиленгликоль	1,4 М глицерин	1,5 М этиленгликоль
1. Время эквilibрации в криопротекторе, мин.	10	5-10	10	5-10
2. Начальная температура охлаждения	+20°C	+20°C	+20°C	+20°C
3. Скорость охлаждения эмбрионов до сидинга	1°C/мин	1°C/мин	1°C/мин	1°C/мин
4. Сидинг	-7°C	-7°C	-5°C	-5°C
5. Время выдержки после сидинга, мин.	2	2	0,2	0,2
6. Скорость охлаждения эмбрионов после сидинга	0,3°C/мин	0,3°C/мин	0,3°C/мин	0,3°C/мин
7. Конечная температура	-36°C	-36°C	-36°C	-36°C
8. Стабилизация температуры, мин	30	30	-	-
	Погружение в азот (-196°C)		Погружение в азот (-196°C)	

Оттаивают зародыши: а) в водяной бане при 37°C в течение 10-12 с до полного исчезновения льда, или же б) на воздухе при +25°C в течение 10-12 с, а затем в водяной бане при +25°C также 10-12 с. Отогретые пайетты освобождают от маркерной пробки, верхний конец с пыжом отрезают и ее содержимое помещают на часовое отекло. Под микроскопом проводят подсчет количества оттаянных эмбрионов и предварительную морфологическую оценку. После этого эмбрионы отмывают от криопротектора. Перенос эмбрионов из одного раствора в другой проводят стерильными микропипетками под микроскопом при 12-16-кратном увеличении. Зародыши помещают последовательно в растворы глицерина с концентрацией 1,0 М, 0,75 М, 0,5 М и 0,25 М, после чего трижды промывают в свежих порциях ФСБ и оставляют в такой же среде на 10-20 минут. По окончании промывки оценивают качество зародышей. Пригодные используют для трансплантации, а зародыши сомнительного качества инкубируют в течение 2 часов и оценивают по морфологическим признакам.

Будевич И.И., Н.Ф. Жук и А.И. Будевич рекомендуют использовать сахарозу для выведения глицерина из клеток зародышей, что повышает сохранность и приживляемость эмбрионов. Приготавливают сначала 1,4 М раствор сахарозы (4,792 г сахарозы + 10 мл среды), а затем 0,7 М раствор

(для этого исходный раствор сахарозы смешивают 1:1 со средой). Сначала смешивают раствор глицерина 1,4 М 1:1 с 1,4 М раствором сахарозы. В таком растворе выдерживают оттаявшие зародыши 5 мин., затем на 5 мин. переносят их в 0,7 М раствор сахарозы, после чего выдерживают по 5 мин. дважды в среде Дюльбекко.

Нередко морфологическая оценка свежеполученных зародышей также не дает полной уверенности в их жизнеспособности. Особенно это касается зародышей с значительными повреждениями прозрачной оболочки, разрушением бластомеров, сжатием полости бластоцисты (оцененных как условно-годные). В таких случаях зародыши культивируют в среде для кратковременного хранения в небольших чашках Петри, на часовых стеклах или в закрытых соломинах. На часовые стекла наносят 0,2 мл среды, помещают в нее зародыши и среду покрывают слоем стерильного вазелинового масла (25 капель). Стекла помещают в чашки Петри и содержат их в эксикаторе при 37°C в термостате. До начала и в процессе культивирования через эксикатор пропускают увлажненную газовую смесь (90% азота, по 5% кислорода и углекислого газа). В соломинку зародыши вводят с помощью специального микроманипулятора или шприца емкостью 1 мл с соединительным устройством. Сначала набирают в соломинку столбик среды (0,03 мл), затем столбик воздуха (0,01 мл), после этого среду с зародышем (0,03 мл), опять столбик воздуха и среду (0,02 мл). После соприкосновения среды с пробкой (поливиниловым спиртом) и затвердевания ее шприц отсоединяют, а соломинку с этой стороны закрывают пластмассовой пробкой и оставляют в термостате при 37°C на время инкубации. Возможна инкубация зародышей и в малых чашках Петри в 2,5 мл среды без помещения их в эксикатор. Крышка чашки почти герметично закрывает среду, доступ воздуха ограничен и это обеспечивает удовлетворительные условия для непродолжительной выдержки их (до 24 часов).

После культивирования проводят оценку жизнедеятельности зародышей. Продолжающие развитие зародыши с оценкой отлично и хорошо считают пригодными для пересадки.

Трансплантация зародышей реципиентам.

У крупного рогатого скота в практике обычно используется нехирургический способ трансплантации зародышей реципиентам. Для пересадки применяют инструменты, предназначенные для ректо-цервикального способа осеменения (ШО-3 и ШО-4 или другие инструменты для введения расфасованной в соломинах спермы). В соломинку зародыши помещают таким же способом, как и при культивировании их. Подготовленную соломинку стерильным пинцетом вставляют в инструмент и надевают на него полиэтиленовый одноразовый чехол.

Животное - реципиента фиксируют в станке в манеже центра (пункта) трансплантации зародышей или в помещении непосредственно в стойле. Наружные половые органы обмывают водой и дезинфицируют 0,2%-ным

раствором фурацилина, 2%-ным раствором диоксида или 70%-ным этиловым спиртом. Сильно возбуждимым животным вводят комбилиен внутримышечно в дозе 0,5 мл или ханегиф 10 мл. Затем делают сакральную анестезию 2%-ным раствором новокаина (5 мл). Подготовленный к пересадке инструмент вводят во влагалище до шейки матки, сдвигают назад защитный полиэтиленовый чехол и пользуясь теми же приемами, что и при ректоцервикальном способе осеменения, проводят его через канал шейки матки. После этого инструмент направляют в рог матки, соответствующий яичнику с желтым телом (ипсилатеральный). Осторожными движениями руки через прямую кишку расправляют рог матки и натягивают его на инструмент так, чтобы кончик инструмента был ближе к верхушке рога матки. Удерживая инструмент в таком положении, оператор дает команду помощнику, который медленным надавливанием на стилет вводит зародыш с содержимым в матку.

Все манипуляции с введением инструмента в половые пути должны быть выполнены в течение 1,5-2 минут. Если затрачивают больше времени, то это может стимулировать сокращения матки и привести к изгнанию зародыша. Следует отметить, что с 6-го дня матка проявляет слабо сократительную функцию, но длительные манипуляции с ней могут стимулировать эту функцию.

Приживаемость при нехирургической трансплантации свежеполученных зародышей составляет 50-60%, а при использовании сохраняемых в жидком азоте зародышей - 45-55%. С учетом этого, а также процента извлекаемых и бракуемых зародышей, от одной коровы-донора за одну процедуру извлечения можно получить в среднем два-три теленка. А поскольку донора можно использовать для получения зародышей каждые 2,5-3 месяца, то в течение года от такой коровы можно получить в среднем 10-12 телят.

ЧАСТЬ 2. ВЕТЕРИНАРНОЕ АКУШЕРСТВО

МОРФОЛОГИЯ ПОЛОВЫХ ОРГАНОВ БЕРЕМЕННЫХ ЖИВОТНЫХ. ПЛОД И ОКОЛОПЛОДНЫЕ ОБОЛОЧКИ. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВОЗРАСТА ПЛОДА

Цель занятий: изучение строения и топографии половых органов самок на различных стадиях беременности; изучение строения и взаимоотношения околоплодных оболочек; приобретение студентами навыков определения возраста плода.

Объекты исследований, материалы и оборудование: половые органы (в их естественной связи) небеременных и беременных животных, которые должны быть получены на мясокомбинате сразу же после убоя здоровых животных; музейные препараты, муляжи и рисунки околоплодных оболочек и плаценты; схемы развития околоплодных оболочек и кровообращения плода; бытовой холодильник (для краткосрочного хранения препаратов); спиртовые тампоны, раствор йода, коллодий; клеенчатые фартуки, нарукавники, перчатки хирургические и анатомические; полотенце, бумажные салфетки; анатомические и хирургические пинцеты, зонды пуговчатые, ножницы прямые и Купера; градуированные цилиндры или мензурки на 100, 500 и 1000 мл; весы, измерительные линейка и лента; большие кюветы, тазы, ведра.

Методические указания. Занятия проводят в лаборатории кафедры. Используя плакаты и схемы преподаватель знакомит студентов с развитием зародыша и оболочек, а также с изменениями величины и топографии половых органов в течение беременности. После этого группу студентов разделяют на 2-3 небольших группы и обеспечивают их необходимыми препаратами и инструментами. Преподаватель с двумя-тремя помощниками демонстрирует препараты половых органов небеременных, а затем беременных животных, измеряет диаметр беременного и небеременного рогов матки и проводит препарирование их. Другие студенты (по 3-4 человека), наблюдая за действиями преподавателя, в такой же последовательности самостоятельно выполняют работу. При морфометрическом исследовании половых органов целесообразна такая последовательность: осмотр яичников и матки, сопоставление величины ее рогов, осмотр наружных половых органов. Если имеются препараты различных видов животных, то сначала исследуют половые органы крупного рогатого скота, затем мелкого рогатого скота, свиней, лошадей и других видов.

После осмотра и измерения половых органов начинают препарирование их. Используя острые прямые ножницы и скальпель сначала отделяют наружные половые органы от прямой кишки. Затем разрезают по верхнему краю стенку преддверия влагалища и влагалища до верхнего свода, осматривают слизистую оболочку и наличие на ней слизи, ее внешние свойства. Особое внимание обращают на состояние устья шейки матки и характер слизи (слизистой пробки беременности). После этого разрезают осторожно ножницами стенку шейки матки до тела так, чтобы не нарушить целостность оболочек плода. Осматривают канал шейки матки и разрезают по большой кривизне небеременный рог матки; при этом постепенно отделяют котиледоны от карункулов и осторожно извлекают плодный мешок из полости рога. Также поступают и с беременным рогом и полностью высвобождают плодный мешок. Целесообразно эту работу выполнять непосредственно на столе, застланном клеенкой или полиэтиленовой пленкой. После высвобождения плодного мешка осматривают слизистую оболочку матки, делают ножницами или обушком скальпеля соскоб с ее поверхности и рассматривают маточное молоко (эмбриотроф), подсчитывают карункулы, измеряют их величину в различных участках беременного и небеременного рогов матки.

Завершив исследование матки приступают к осмотру и препарированию оболочек. Сначала измеряют диаметр плодного мешка в наиболее широкой части его. Затем осторожно захватывают анатомическим пинцетом небольшую складку хориона (в области амниона), надрывают его и отделяют от подлежащих под ним амниона и затем аллантоиса на всем протяжении плодного мешка. Действуют только рукой (в перчатках или без них) с коротко остриженными ногтями. Хорион легко отделяется от других оболочек. В области верхушек плодного мешка оставляют небольшую часть хориона неотделенной, чтобы не повредить выступающие за пределы хориона верхушки аллантоиса. Отделив хорион рассматривают расположение аллантоиса и постепенно, не нарушая целостности его, отделяют от амниона вплоть до вхождения в пуповину. Немного жидкости оставляют в узкой части аллантоиса и перевязывают его толстой нитью. Остальную часть отрезают и жидкость собирают в сосуд, затем измеряют объем ее. При наличии долей (хлебов) в жидкости рассматривают их и делают острым скальпелем срез. Далее приступают к осмотру амниона с плодом, измеряют диаметр в наиболее широкой части его; после этого вскрывают амнион, определяют консистенцию и другие внешние свойства жидкости, измеряют количество ее.

Завершив эту работу осматривают пуповину, производят измерение величины и массы плода, а затем препарирование его. Сложенный пинцет осторожно вставляют между оболочкой, сосудами и урахусом внутрь пуповины и постепенно разъединяют их; находят в начале пупочных артерий анастомоз, а после вскрытия брюшной полости плода - соединение вен и венозный проток (не всегда обнаруживается у телен-

ка). Две пупочные артерии и мочевой пузырь слегка приподнимают и осматривают место отхода артерий от аорты. Несколько сдавливая остаток аллантоиса с жидкостью наблюдают за наполнением мочевого пузыря через мочевой проток. У лошадей в пуповине находят желточный пузырек. Вскрыв грудную полость плода отделяют сердце от сосудов, вскрывают левое предсердие и находят овальное отверстие между ним и правым предсердием.

При исследовании половых органов кобылы осматривают слизистую оболочку матки, ее многочисленные небольшие углубления (крипты), а на сосудистой оболочке - небольшие ворсинки, которые создают вид бархатистости. У них нельзя разъединить хорион и аллантоис или аллантоис и амнион. Поэтому следует рассмотреть сначала строение алланто-хориона, затем алланто-амниона.

Половые органы животных на различных стадиях беременности.

Во время беременности в половых органах происходят существенные морфологические изменения; величина и масса их прогрессирующе увеличиваются. Так, у небеременных коров весь половой тракт (включая влагалище, матку, яйцепроводы и яичники) имеет массу до 1,5 кг, масса матки - 0,9 кг. В период стельности масса воспроизводительных органов с содержимым увеличивается 6-кратно; форма матки становится асимметричной в результате большего увеличения беременного рога, по сравнению с небеременным (рис. 53). При развитии плодов в обоих рогах увеличение их может быть одинаковым. На втором месяце стельности масса матки с содержимым составляет 1,6 кг, на пятом мес. - 10,1 кг, на седьмом - 23,8 кг, в конце беременности - 67,8 кг (Swett W.W. et al., 1948). Около 40% массы приходится на плод, 15,4% - на околоплодные жидкости, 5,4% - на плодные оболочки и 13% - на матку.

У овец и коз форма и величина рогов матки в период беременности изменяется аналогично матке коров. Однако у них чаще бывает несколько плодов и это определяет различия формы и величины матки и соотношение массы компонентов содержимого ее. На пятом месяце суягности в плодном мешке овцы содержится 369 мл амниотической и 834 мл аллантоисной жидкости; всего - 1203 мл. При двойнях общее количество жидкости примерно вдвое больше (Arthur, 1956).

Длина рогов матки беременных свиной достигает 2-3,5 м, а диаметр их - 17-18 см. В местах нахождения плодов она расширена в виде ампул. В конце беременности масса матки без содержимого составляет 2,7 кг, а у небеременных животных - менее 0,4 кг.

У кобыл плод находится в теле и роге матки; у них матка принимает форму двурогого мешка.

Оболочки плода. К концу эмбрионального периода зародыш окружают три оболочки: амнион, аллантоис и хорион.

Амнион (amnion) непосредственно окружает плод со всех сторон и в области пупочного кольца смыкается с кожей плода. При многоплодной беременности для каждого плода имеется отдельная оболочка. У животных она прозрачна и через нее можно видеть плод. С внутренней стороны, преимущественно возле пуповины, на оболочке имеются беловато-сероватые наложения - эпителиальные бляшки. У зародышей крупного рогатого скота они существуют до шести месяцев.

Аллантоис (allantois) начинается от верхушки мочевого пузыря, идет в составе пуповины в виде мочевого протока (урахуса) и затем расширяется. У кобыл и мясоядных аллантаис в виде слепого мешка располагается между амнионом и хорионом. Наружный листок аллантаиса срастается с хорионом, образуя *алланта-хорион*. Внутренний листок тесно срастается с амнионом, образуя *алланта-амнион*; в стенке его на поздней стадии жеребости имеется два крупных сосуда: артерия и вена, которые берут начало от пупочных сосудов. У лошадей и собак плод вместе с алланта-амнионом может свободно перемещаться в полости аллантаиса.

У жвачных и свиней аллантаис после выхода из пуповины разделяется на два постепенно суживающихся мешка, которые заполняют полость сосудистой оболочки, а у свиней значительно выступают за ее пределы. У основания аллантаис имеет Т-образную форму и лежит на одной стороне амниона, прилегая одним листком к нему, а другим - к хориону. У этих видов животных сращения оболочек не наблюдается и их можно сравнительно легко разъединить.

В полости амниона и аллантаиса находится жидкость. Общее количество ее увеличивается по мере нарастания срока беременности. Однако соотношение *амниотической* (околоплодной) и *аллантаисной* (мочевой) жидкости в различные периоды беременности неодинаково.

У *крупного рогатого скота* быстрое увеличение жидкости наблюдается в периоды между 40 и 60 днями, 3 и 4 месяцами и между 6,5 и 7,5 месяцами. В первый и третий периоды увеличивается, главным образом, мочевая жидкость, а во второй период - околоплодная. В связи с этим зародышевый пузырь в начале беременности представляет собой удлинённый алланта-хорион с центральным сферическим амнионом и сравнительно небольшим эмбрионом. Матка при пальпации через прямую кишку также имеет удлинённую форму. В течение второй трети беременности доминирует амниотическая жидкость и зародышевый пузырь имеет более округлую форму.

У *овец* в первые три месяца количество мочевой жидкости небольшое (до 130 мл), количество же амниотической жидкости быстро увеличивается и достигает 0,6 л. На четвертом месяце происходит резкое увеличение мочевой жидкости, а увеличение амниотической жидкости очень слабое. В течение пятого месяца количество мочевой жидкости почти удваивается, а амниотической - даже несколько уменьшается.

У *лошадей* аллантаисная жидкость доминирует в первую и последнюю треть беременности и к концу ее достигает 7-15 л. Амниотическая жидкость быстро накапливается в середине беременности; в этот период количество ее примерно такое же, как и аллантаисной, и составляет 3-5 л. Общее количество жидкости - 10-20 л.

У *свиней* аллантаисная жидкость накапливается быстро в первый месяц, значительно медленнее во второй месяц и к концу его достигает 200

мл. Затем объем жидкости уменьшается до 100 мл или меньше, а порой она почти отсутствует. Амниотической жидкости на протяжении первых двух месяцев немного (до 20 мл), но в последующем количество ее увеличивается до 75-200 мл.

В начале беременности амниотическая жидкость прозрачная, водянистая, затем становится мутной, желтоватой, и в конце беременности вследствие примеси муцина приобретает слизистый характер.

Мочевая жидкость в начале беременности также прозрачная, светло-желтая, но в дальнейшем становится буроватой и мутной. Со второй трети беременности в ней находят лепешкообразные тела желтовато-серого или желтовато-бурого цвета (доли, хлеба). Снаружи они гладкие, блестящие, с закругленными краями, а на разрезе - слоистые или гомогенные.

Хорион (chorion) - наружная оболочка плода. В начале беременности эта оболочка имеет вид тонкой пленки. В дальнейшем, по мере развития на ней ворсинок внешний вид и цвет оболочки изменяются в зависимости от вида животных.

С начала имплантации хорион принимает соответствующую строению тела и рогов матки животного форму.

У кобыл хорион имеет тело и два ответвления - рога. Вся поверхность его равномерно покрыта небольшими (около 1,5 мм), слегка ветвящимися ворсинками.

У крупного и мелкого рогатого скота форма хориона двурога. Ворсинки расположены в виде отдельных скоплений (котиледонов) четырьмя рядами на всей его поверхности. На стороне беременного рога котиледоны развиты сильнее. Ворсинки сильно ветвящиеся, снабжены обильно кровеносными сосудами; у этих животных в углубления на карункулах. У крупного рогатого скота котиледоны по периферии сужены, образуют кольцо, которое плотно охватывает ножку карункула. При многоплодной беременности хорионы двух плодов могут срастаться и сосуды одного плода образуют анастомозы с сосудами другого, что обуславливает рождение телочек - фримартинов.

У свиней хорион имеет форму удлиненого, суживающегося к концам мешка. В середине беременности на поверхности каждого плодового мешка можно видеть 5 зон: центральную плацентарную зону, две параплацентарные и две концевых ишемических зоны, которые состоят, главным образом, из двух некротических верхушек. Для небольшой параплацентарной зоны характерно наличие продольных кровеносных сосудов, которые в ишемической зоне запустевшие. В области плацентарной зоны имеются короткие, едва заметные ворсинки, которые расположены маленькими группами. Сосудистые оболочки порослят тесно соединены плацентарными или параплацентарными зонами, но их можно разъединить.

Пуповина состоит из двух пупочных артерий, одной или двух вен, мочевого протока (урахуса) и остатка желточного пузырька. Центральная часть пуповины заключена в амнион. На этом участке все пространство ме-

жду сосудами и мочевым протоком заполнено вартоновым студнем. Ближе к периферической части между артериями имеется анастомоз. Периферическая часть пуповины простирается от околоплодной до сосудистой оболочки. Она состоит из делящихся на периферические ветви сосудов, остатка желточного пузырька и расширенной части урахуса. Периферическая часть пуповины имеется только у тех животных, у которых амнион полностью окружен аллантоисом.

У телят длина пуповины 30-40 см. Оболочка пуповины густо покрыта мелкими эпителиальными ворсинками, придающими ее поверхности бархатистый вид. Вены после вхождения в брюшную полость соединяются в общий ствол. Длина пуповины у ягнят и козлят - 7-12 см; у поросят - 20-36 см; в пуповине их одна вена и две артерии. У жеребят длина пуповины от 36 до 83 см; в ней имеется две артерии и одна вена. До конца жеребости сохраняются остатки желточного пузырька. У собак длина пуповины варьирует в зависимости от породы и составляет в среднем 1:2,4 по отношению к длине плода.

В период плода быстро изменяется величина зародыша, происходит дифференциальный рост его различных частей и органов, сформировавшихся в эмбриональный период. В ранний период у плода образуются веки и кости, начинается окостенение скелета, изменяется внешний вид и размеры конечностей, появляется волосяной покров.

В практике нередко приходится по наружному виду плода определять его возраст. В первой половине беременности наиболее важными критериями является длина плода, в меньшей мере его масса и количество околоплодных вод, а во второй половине - появление волос на отдельных местах и затем степень развития волосяного покрова. Величина плода (особенно масса) сильно разнится в зависимости от породы животных, их возраста, условий кормления и содержания. Длина плода измеряется от темени до хвоста.

У крупного рогатого скота. В 28 дней длина эмбриона 0,8 см. Закладываются все органы, появляются зачатки конечностей. Сосудистая оболочка без ворсин. Амнион сферической формы, 2 см в диаметре. Располагается в свободной (не связанной с другим рогом) части беременного рога. Аллантоисный мешок 18 см длиной, заполняет почти целиком беременный рог, но количество жидкости незначительное.

В 35 дней длина зародыша 1,8 см; величина амниона с жидкостью и зародышем 3 см. Жидкости в нем немного - около 1 мл. Аллантоис хорошо развит и содержит 55-60 мл жидкости.

В 58-60 дней длина плода около 6 см, масса 17-20 г. Видны зачатки молочной железы. Полости тела закрыты. Живот сильно увеличен. Амнион овальной формы и растянут, около 5 см в поперечнике, содержит 65-80 мл жидкости. В полости аллантоиса жидкости 125-150 мл. Всего околоплодных вод более 200 мл.

В 80 дней длина плода 12 см. Количество амниотической жидкости 340 мл, аллантоисной - 420 мл. В 3 месяца длина плода 14-15 см, масса 150-210 г. У самцов оформляется мошонка. Околоплодных жидкостей всего 800-870 мл.

В 4 месяца длина плода 27-28 см, масса 1,4-1,5 кг. Редкие волосы на верхней губе и бровях. У самцов семенники опущены в мошонку. У самок хорошо выражены соски вымени. Амниотической жидкости 2150 мл, аллантоисной - 950 мл.

В 5 месяцев длина плода - 35-40 см, масса 3-3,5 кг. Появляются "усы" и "брови", отдельные волосы на краях и кончиках ушных раковин. Амниотической жидкости 2,7 л, аллантоисной - 1,2-3 л, всего 4-5 л.

В 6 месяцев длина плода 48-52 см, масса 4,5-6 кг. Густые волосы на губах и надбровных дугах. Появляются ресницы и редкие волосы вокруг зачатков роговых отростков, на периферических участках конечностей до скакательных и запястных суставов. Амниотической жидкости - 2,4-4,5 л, аллантоисной - 2,3-5 л, всего 6-8 л.

В 7 месяцев длина плода 48-70 см, масса 9,8-13 кг. Хорошо развит волосяной покров на губах, надбровных отростках, на периферических участках конечностей, на кончике хвоста. Появляются редкие волосы на коже вдоль позвоночника. Амниотической жидкости 1,5-2,4 л, аллантоисной - 5,5-7 л, всего 9-10 л.

В 8 месяцев длина плода 70-60 см, масса 15,8-21 кг. На всей поверхности тела густой волосяной покров. Амниотической жидкости 2-2,5 л, аллантоисной - до 9 л, всего 10-11.

В 271-284 дня длина зрелого плода 80-105 см, масса 18-45 кг (редко до 65). Вся поверхность тела покрыта густой шерстью. На нижней и верхней челюстях прорезались премоляры; на нижней челюсти все резцы хорошо выражены. Амниотической жидкости от 2,8 до 7,5 л, аллантоисной - от 8 до 15 л, а всего жидкости 14-20 л.

У овец. В 1 месяц длина эмбриона 10 см. Все органы заложены, полости тела закрыты; хорошо заметны жаберные щели. Длина околоплодного мешка достигает 40-60 см.

В 2 месяца длина плода 5-7 см, масса около 50- г. В костях конечностей начинается отложение солей.

В 3 месяца длина плода 16 см, масса 0,8-1,2 кг. В 3,5 месяца длина плода 20-22 см; в области головы и шеи появляются шерстные волокна.

В 4 месяца длина плода 25-32 см, масса 1,5-2,65 кг. вся поверхность плода покрыта волосками, но они еще короткие.

В 5 месяцев длина зрелого плода 30-50 см, масса до 4,9 кг, двоен (общая) -7,9 кг, троен -9,1 кг (Р. Rattray). Из двоен массой 1,8-2,5 кг погибает после родов 37,9%, а из ягнят массой 3-3,5 кг гибнет не более 8,8 % их. При рождении одного плода случаи гибели во время родов увеличиваются по

мере повышения массы ягнят (А.П. Студенцов, В.С. Шипилов, Л.Г. Субботина, О.Н.Преображенский,1986).

У лошадей. В 30-36 дней зародышевый пузырек диаметром около 9 см, ближе к цилиндрической форме, сильно растянут аллантоисной жидкостью. Хорион без ворсинок. Длина зародыша 13 мм. Головка его не имеет очертаний, свойственных лошади. Печень хорошо выражена и в виде неровных выступов лежит под позвоночником. Имеются зачатки конечностей.

В 2 месяца длина эмбриона 7-7,5 см, масса 70 г. Головка оформлена, на конечностях заметна конфигурация копытец. Полости тела закрыты. Пупочный пузырек содержит 8-15 мл слегка мутноватой жидкости. величина всего зародышевого пузырька 23x13 см. Амниотической жидкости немного (30-40 мл), а всего околоплодных жидкостей 500-900 мл.

В 3 месяца длина плода 12-15 см. Хорошо выражены копытца. Заложена молочная железа, соски хорошо развиты. Начинается отложение солей в костной ткани. Околоплодных вод около 2 л.

В 4 месяца длина 20-22 см, масса 1-165 кг. Наружные половые органы развиты, но у самцов семенники в мошонку не опущены. на верхней и нижней губе видны первые зачатки волос.

В 5 месяцев длина плода 30-35 см, масса 3-4 кг. Губы густо покрыты волосами. отдельные волоски появляются вокруг бровей, на кончике хвоста.

В 6 месяцев длина плода 45-73 см, масса 4-5,5 кг. Появляются ресницы, отдельные волоски на дорсальном крае шеи (грива) и верхушках ушных раковин.

В 7 месяцев намечается значительная разница в росте плода у различных пород. Длина плода варьирует от 40 до 70 см. Волосы гривы становятся хорошо различимы, появляются мелкие волоски по всему краю ушных раковин.

В 8 месяцев длина плода 65-70 см, масса 9-15 кг. На хвосте волосы располагаются двумя полосами. Сильное обрастание наблюдается в области гривы и спины. Заметны отдельные волоски на боках вдоль позвоночника.

В 9 месяцев длина около 80 см, масса 12-30 кг. Все туловище покрыто мелкими волосами. Появляется волосяной покров на коже венчика.

В 10 месяцев длина около 90 см, масса 18-30 кг. Черепная полость проявляет сильную выпуклость. У самцов хорошо развит препуций. Все тело покрыто длинной шерстью. На подошвах копыт заметен нарост рога.

В 11 месяцев - зрелый плод. Длина 1-165 м, масса 30-50 кг; густой шерстяной покров. У самцов семенники выступают из брюшной полости, иногда опущены в мошонку. Околоплодных вод -7-15 л.

У свиней. Длина зародыша в 3 недели 5 мм, в 4 недели - 18 мм, в 5 недель - 3 см. К концу первого месяца все органы заложены и плод приобретает характерные для вида очертания; брюшная полость закрыта.

В 2 месяца длина плода около 8 см, масса 90-190 г. Хорошо проявляются видовые очертания; глаза закрыты. Завершена половая дифференциация, начинается окостенение трубчатых костей. На нижней челюсти видны закладки клыков.

В 3 месяца длина плода 15 см, глазные щели открыты. Появляются волоски на губах, бровях, хвосте и ушах. На нижней челюсти имеются клыки, на верхней челюсти они только начинают прорезываться, показываются резцы и первые коренные зубы.

В конце беременности зрелый плод покрыт щетиной, длина 20-25 см, масса 0,8-1,2 кг, имеются острые резцы и клыки. Окостеневают кости черепа.

У собак, несмотря на большие различия в росте карликовых и крупных пород, на протяжении почти всей беременности, особенно в первые 4-5 недель, не наблюдается значительных различий в развитии плодов. Однако количество их у карликовых собак значительно меньше, чем у особей крупных пород.

В 3 недели длина зародыша 1 см. Все органы заложены, проявляются видовые очертания. Брюшная полость закрыта, хорошо различим желтоватый пузырек.

В 4 недели длина плода - 4-4,5 см.

В 6 недель длина плода около 8 см; на коже появляются отдельные волоски.

В 2 месяца длина плода у собак средних по величине пород достигает 16-20 см, масса зависит от породы - у крупных она составляет 1-2%, у мелких 5-7% от массы матери. Все тело покрыто волосами. Кости черепа не срослись, и поэтому голова может изменять конфигурацию. Веки слипшиеся, зубов нет.

ДИАГНОСТИКА БЕРЕМЕННОСТИ И БЕСПЛОДИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

В период беременности в организме животных происходят существенные морфологические и функциональные изменения в половой, эндокринной и других системах, а также в общем обмене веществ. Знание изменений в половых органах, легко обнаруживаемых клиническим исследованием, дает возможность выбрать наиболее подходящий метод диагностики беременности на той или иной стадии. При этом, могут быть использованы, кроме клинических, и лабораторные методы.

Цель занятий: освоить современные методы диагностики беременности и бесплодия у коров, кобыл, овец и коз, у свиней.

Объекты исследований, материалы и оборудование: животные - коровы, кобылы, козы, овцы, свиньи; муляжи, рисунки, слайды половых органов беременных и небеременных самок; половые органы небеременных и беременных убитых животных; аппараты для ультразвукового исследования; установки для радиоиммунного исследования, наборы реактивов для определения содержания прогестерона, сывороточного гонадотропина, эстрогенов; дозаторы пипеточные, центрифуга с горизонтальным ротором, пробирки центрифужные, бытовой холодильник; микроскопы, предметные стекла, красители, гепарин; спиртовые тампоны, раствор йода, коллодий, вазелин, дистиллированная вода; клеенчатые фартуки, наплечники, нарукавники, перчатки полиэтиленовые пятипалые, гинекологические перчатки резиновые; полотенце, вата серая и вата белая, марлевые и бумажные салфетки; анатомические и хирургические пинцеты, ножницы изогнутые, ножницы прямые и Купера; кюветы, тазы, кружка Эсмарха, ведра.

Методические указания.

Эта тема имеет исключительно важное значение в обучении студентов факультетов ветеринарной медицины и зооинженерного. Проводится несколько занятий в лаборатории, акушерской (ветеринарной) клинике, на мясокомбинате и затем обязательно на ферме.

Сначала в клинике преподаватель знакомит студентов с наиболее существенными изменениями, которые происходят в организме беременных самок, и которые можно использовать в качестве признаков при диагностике этого состояния. После этого рассказывает о существующих способах диагностики беременности и бесплодия, выделяя из них те, которые не требуют специального оборудования (клинические), затем способы основанные на использовании специальных приборов или установок и, наконец, лабораторные, которые требуют определения в биологических жидкостях гормонов или других веществ; объясняет сущность и методику применения этих методов. При рассмотрении клинических методов используются рисунки, муляжи, другие наглядные пособия, половые органы убитых животных и непосредственно животные. В этой части занятия необходимо познакомить студентов с подготовкой акушера для исследования, с правилами обращения с животными, фиксацией их, соблюдением техники безопасности при исследовании.

Для практического освоения различных способов диагностики беременности и бесплодия у различных видов животных проводится несколько занятий. Целесообразно сначала в клинике (в специально оборудованном помещении мясокомбината) на нескольких животных каждого вида продемонстрировать все клинические методы и дать возможность каждому студенту под контролем преподавателя исследовать животное. При проведении занятий на мясокомбинате до клинического (ректального) исследования коров желательнее, чтобы студенты еще раз осмотрели половые органы убитых животных небеременных и с различными сроками беременности.

На последующих занятиях на фермах студенты закрепляют приобретенные навыки диагностики беременности и бесплодия животных клиническими методами и, в то же время, изучают организацию этой работы в хозяйствах. Целесообразно одному преподавателю работать с небольшой группой - не более 8-10

студентами. В начале таких занятий преподаватель на месте уточняет объем работы, выясняет у студентов знания признаков, необходимых для точной диагностики бесплодия, беременности и сроков ее. После этого студенты готовятся к исследованию животных. При стойловом (привязном) содержании животных преподаватель вместе с зоотехником (ветеринарным работником) фермы или специалистом по искусственному осеменению намечают животных, которых необходимо исследовать и к каждому животному прикрепляют студента. Два соседние студенты могут помогать друг другу при фиксации и исследовании животного. После завершения студентом исследования животного преподаватель уточняет правильность диагноза, дает соответствующие советы для дальнейшей работы и отправляет студента для исследования очередного животного (в конце группы), а сам переходит к следующему студенту. За 1-2 часа непрерывной работы можно исследовать 50-150 коров, причем каждый студент исследует 10-20 животных. При беспривязном содержании коров (нетелей) студенты вместе с преподавателем работают поочередно, исследуя животных в специально оборудованных станках между двумя смежными загонами (в расколе). В конце занятия подводятся итоги, рассматриваются ошибки и возможности избежать их.

На последнем занятии можно применить лабораторные методы и подвести итог.

Диагностика стельности и бесплодия у коров

Изменения в половых органах у коров.

Яичники. В яичниках у коров на протяжении всей беременности присутствует желтое тело. Отличить его от желтого тела цикла практически невозможно. Поэтому этот признак не может быть использован при постановке диагноза. Если есть возможность исследовать яичник на 10-12-й, 17-, 22-, и 40-й день после осеменения и каждый раз будет обнаруживаться желтое тело в одном яичнике, величина которого не изменялась, а половой охоты в этот период не было, это является важным признаком наступившей стельности.

Содержание прогестерона в периферической крови в течение первых 14 дней такое же, как и в период полового цикла; однако на 18-й день у стельных животных падение уровня гормона слабое. В последующем содержание его медленно увеличивается, а за 20-30 дней до родов начинает уменьшаться. Содержание эстрогенов в начале и середине беременности менее чем 100 пкг./мл; начиная с 250 дней уровень их повышается, достигая пика за 2-5 дней до родов (76 нг./мл эстрона сульфата и 1,2 нг./мл эстрона, W.W. Thatcher et al., 1980). За 8 ч до родов начинается быстрое падение содержания эстрогенов.

Яичники в первые 100 дней стельности располагаются на уровне переднего края лонных костей или несколько ниже и достигаемы для исследования. В последующем в связи с увеличением массы матки и смещением ее в брюшную полость яичники передвигаются вперед (в пределах 8-10 см на стороне беременного рога) и несколько ниже лонного сочленения. У некоторых животных их можно пальпировать в течение первых 5 месяцев беременности.

Матка. У небеременных коров весь половой тракт (включая влагалище, матку, яйцепроводы и яичники) имеет массу до 1,5 кг. У телок и коров крупных пород величина шейки и рогов матки (в среднем) следующая: ширина начальной части обоих рогов (непосредственно впереди шейки матки) равна соответственно 2,5 и 4 см, каждого рога возле бифуркации 2 и 3,5 см, длина связанной части рогов 9 и 14 см и свободной части - 15 и 20 см; длина шейки матки 5 и 10 см и ширина ее 3 и 5 см.

В период стельности масса воспроизводительных органов с содержанием увеличивается 6-кратно. Причем свыше 85% ее приходится на плод, жидкости и плодные оболочки. Для диагностики большое значение имеет не масса, а величина и степень расширения рогов матки жидкостью и плодом (рис. 54).

В 35 дней амнион с зародышем шарообразной формы, диаметром около 3 см, расположен в свободной части рога матки. Эта область рога наполнена жидкостью (величиной с куриное яйцо), что дает возможность поставить положительный диагноз. Однако при пальпации нельзя сдавливать рог в месте расположения амниона, чтобы не вызвать нарушение кровообращения у зародыша и разрыв его сердца. Связанная часть беременного и свободная часть (от бифуркации) небеременного рогов почти не растянуты.

В 60 дней амнион принимает овальную форму и имеет поперечное сечение до 5 см. Это вызывает расширение свободной части рога матки до 6,5 см по сравнению с 2,5-3,5 см у телок и молодых не стельных коров (рис. 55). Такое расширение рога хорошо выявляется. Однако более целесообразно пальпировать верхушку беременного рога: в этом месте ощущение наличия жидкости воспринимается наиболее хорошо.

В 90 дней четко выявляется расширение обоих рогов матки, особенно беременного. Связанная часть беременного рога шириной около 9 см, небеременного - 4-5 см. У многих коров матка расположена у входа в тазовую полость и рука обычно скользит по большой кривизне расширенного рога. Но нередко у многорожавших животных матка опускается в брюшную полость и форму ее рогов определить труднее. Нередко пальпируется плод в виде твердого тела.

В период с 120 по 160-й день стельности плод пальпируется более чем в 50% случаев. Результаты пальпации зависят от расположения его к уровню дна тазовой полости. Иногда первыми движениями руки плод отталкивается глубоко в матку и пальпировать его становится труднее. Между 5,5 и 7,5 мес возможность обнаружения плода уменьшается до 40-50% случаев. При благоприятных обстоятельствах пальпируются за передним краем лонного сращения головка или согнутые конечности. Прикосновение рукой нередко вызывает у плода рефлекс движения. Если плод не пальпируется, то учитывают другие признаки - опущенная неподвижная матка, карункулы на ее стенке и увеличение маточных артерий. С 7,5 мес. во многих случаях плод обнаруживается легко, хотя у ряда многорожавших коров с глубоко опущенным желудочно-кишечным трактом плод при первом исследовании не удается пальпировать.

Изменения величины небеременного рога на протяжении стельности зависят от степени заполнения его аллантоисом. У многих коров эта оболочка располагается только в небольшой части рога, в других случаях занимает $\frac{2}{3}$ его или полностью, а в исключительных случаях совершенно отсутствует в нем.

Важным признаком стельности является нахождение карункулов. Однако величина их сильно колеблется, что зависит от числа и месторасположения в матке. В середине беременного рога величина карункулов наибольшая, в основании и особенно в верхушке рога - наименьшая; в соответствующих местах небеременного рога они значительно меньше.

Впервые карункулы пальпируются между 3,5 и 4 мес. стельности. Обнаруживаются они примерно на 8-10 см впереди и несколько ниже лонного сращения. Для пальпации их энергично поглаживают всей ладонью по верхней стенке матки или же собирают рукой складку. Пальпируются 3-4 карункула диаметром с грецкий орех. По мере нарастания стельности величина карункулов прогрессирующе увеличивается до размера куриного яйца и более, но вследствие опускания матки с 5-го по 7-й мес стельности возможность пальпации их уменьшается.

В период беременности увеличивается диаметр маточных сосудов и изменяется характер пульса и тока крови в них. При умеренном сдавливании артерий вместо обычного пульсового толчка ощущается глубокая вибрация их стенок. Нередко вибрация обнаруживается начиная с 100-го дня. К концу стельности артерии становятся сильно гипертрофированными (толщиной с карандаш) и извилистыми. Раньше такие изменения проявляются на стороне беременного рога матки.

Для определения состояния маточных артерий пальпацию следует начинать с аорты. Средняя маточная артерия (a. uterina media) отходит от пупочной артерии (a. umbilicalis), иногда от тазовой (a. iliaca externa). При пальпации руку ладонью вверх продвигают до задней брыжеечной артерии (a. mesenterica caudalis, s. posterior), а затем возвращают по телам позвонков кзади, пропускают тазовую артерию и пальпируют горизонтально расположенный участок средней маточной артерии (впереди края подвздошной кости). Эта артерия в отличие от близлежащих сосудов отличается большей подвижностью. Пальпируют ее, отступив на 2-3 см от места отделения от пупочной артерии.

При наличии двоен в большинстве случаев плоды располагаются в обоих рогах матки и в каждом яичнике имеется желтое тело. Нередко при наличии двух желтых тел в одном яичнике плоды размещаются в двух рогах матки, хотя возможно расположение в одном роге. Встречаются случаи, когда при наличии одного желтого тела в яичнике в соответствующем роге матки имеется два плода (монозиготные близнецы).

При одноплодной беременности плод размещается чаще в правом роге (в 60-68% случаев) и реже в левом (32-40%). У коров мясных пород более равномерное размещение плода в обоих рогах матки.

Методы диагностики стельности

Наиболее ранние сроки использования различных признаков для диагностики беременности клиническим и лабораторными методами показаны в табл. 8.

Наружное исследование включает три диагностических приема: осмотр, пальпацию и аускультацию. *Осмотром* можно установить у стельной коровы более сильное выпячивание правой брюшной стенки, иногда вздрагивание ее вследствие движения плода. В конце стельности обнаруживаются

Таблица 8.

Признаки и методы диагностики стельности

Метод (признак)	Ранний срок диагностики
Ультразвуковой (непосредственное отображение бластоцисты)	13-й день
Отсутствие охоты и наличие в яичнике желтого тела предыдущего цикла	21-й день
Высокое содержание прогестерона в молоке или крови	21-24-й день
Выявление специфического (трофобластного) протеина беременности	24-й день
Пальпация алланта-хориона с жидкостью (скольжение)	33-й день
Увеличение одного рога матки, истончение маточной стенки, флюктуация жидкости в увеличенном роге	35-й день
Пальпация зародыша в напряженном амнионе	45-60-й день
Пальпация плацентом (карнукулов/котиледонов)	80-й день
Увеличение и вибрация средней маточной артерии	85-й день
Обнаружение эстрогена сульфата в крови (молоке)	105-й день
Пальпация плода	120-й день

прогрессирующие отеки вымени и наружных половых органов, иногда - нижней стенки живота (впереди вымени). У первотелок в 4 мес. стельности заметно увеличение сосков; в 6 мес. вымя становится плотным на ощупь и хорошо заметно его увеличение. *Пальпацией* обнаружить плод удастся с 5-6-месячного срока. Обычно пальпацию проводят справа по линии, идущей от коленного сустава вперед, к подреберью, параллельно позвоночнику. Исследующий становится лицом к заду коровы (нередко удобнее лицом к голове) и левой ладонью с расправленными или согнутыми пальцами осторожным энергичным надавливанием пальпирует указанный участок брюшной стенки. Нахождение плода является основанием для постановки положительного диагноза на стельность. Прослушать сердцебиение плода у коров удается редко.

Влагалищный метод заключается в мануальном или визуальном исследовании влагалища. *Визуальное* исследование проводится с помощью влагалищного зеркала. Поверхность слизистой оболочки не проявляет каких либо признаков, которые бы были характерными только для стельности. Определенная сухость и бледность ее могут быть в такой же степени выражены в период стельности, как и в период ди-эструса. Но в течение беременности секрет шейки матки становится подобным желатину, формирует пробку, которая закупоривает канал. Во многих случаях она выступает из устья шейки. Это наблюдается обычно после 60 дней. При *мануальном* исследовании обнаружение липкого тягучего секрета, в отличие от слизистого влажного у не стельных животных, может быть важным показателем беременности. При этом в канал шейки матки трудно ввести палец.

Ректальное исследование является самым эффективным методом определения у коров бесплодия и беременности, особенно в первой ее половине. Оно дает возможность безусловно ставить положительный или отрицательный диагноз на беременность и достаточно точно определять ее сроки. *Положительный диагноз* ставят на основании обнаружения характерных изменений матки и маточных сосудов во время беременности, пальпации самого плода и его оболочек, а также длительного сохранения в одном и том же месте в яичнике желтого тела. *Отрицательный диагноз* основан на констатации отсутствия изменения матки, особенно если имеется возможность многократных исследований, наличия изменений в яичниках в соответствии со стадией полового цикла (табл. 8).

Следует отметить, что увеличение матки и маточных артерий, присутствие в яичниках длительное время желтого тела может быть и при ряде патологических состояний и это сказывается на результатах исследований. Точность исследования определяется стадией беременности, состоянием и поведением животного в момент исследования, степенью наполнения его пищеварительного тракта, опытом и квалификацией специалиста.

Техника исследования. Исследование проводят правой или левой рукой. Ногти на руке обрезают и заравнивают подходящим для этой цели инструментом. Если на коже имеются повреждения, то их смазывают раствором йода и заклеивают коллодием. Исследующий надевает резиновые сапоги, водонепроницаемый халат с завязками сзади (или обычный халат, клеенчатый фартук и наплечник); в зимнее время при работе в холодных помещениях используется теплая безрукавка. Затем на руку надевают одноразовую полиэтиленовую перчатку. При массовых исследованиях коров в хозяйствах, благополучных по заразным заболеваниям, одной перчаткой можно пользоваться для исследования нескольких животных. Если используется резиновая акушерско-гинекологическая перчатка, то после исследования каждого животного необходимо ополаскивать ее теплой водой. В начале исследования перчатку слегка намыливают, чтобы рука легче входила в анальное отверстие.

Животных желательно перед исследованием не кормить в течение 6-10 ч. Обычно же на фермах исследование приурочивают к такому периоду, когда после очередного кормления прошло достаточно много времени. Переполнение пищеварительного тракта затрудняет исследование. При исследовании большого числа животных необходим помощник. Он оказывает помощь при фиксации и записывает результаты, так как помнить всю информацию после исследования 2-3 животных практически невозможно. Если работу проводят на ферме с привязным содержанием, то дополнительной фиксации коров не требуется. Но в процессе исследования, и особенно в момент введения руки в прямую кишку, помощник должен находиться возле коровы, положив ей руку на спину или захватив складку кожи в области холки или коленной складки. При исследовании строптивых животных при-

меняют дополнительные методы фиксации. Во всех случаях исследующий должен помнить, что корова может ударить взад тазовыми конечностями.

Исследующий обхватывает корень хвоста рукой и отводит его в сторону. Другую руку (сначала указательный и средний, а затем все пальцы, сложенные в виде клина) вводит в анальное отверстие. Введение руки не должно быть внезапным. После попадания кисти руки в расширенный отрезок прямой кишки отодвигают руку несколько назад и, разводя пальцы, раскрывают более широко анальное отверстие. При этом воздух заходит в прямую кишку, что обычно вызывает акт дефекации. Дефекацию можно ускорить поглаживая мякишами пальцев верхнюю стенку прямой кишки вблизи анального отверстия. Если дефекация не происходит, а каловых масс много в прямой кишке, то их необходимо удалить рукой. После этого следует выбрать момент, когда впереди расположенный узкий участок прямой кишки расслабится и его можно будет приблизить четырьмя пальцами (большой палец всегда должен оставаться в заднем расширенном участке кишки) и через него проводить пальпацию половых органов. Исследовать через задний участок кишки невозможно, так как он почти полностью связан соединительно-тканной прослойкой с тазовыми костями, преддверием влагалища и влагалищем. Затруднения при исследовании могут быть связаны с узостью анального отверстия и сдавливанием руки, отчего она быстро устает, а также с расширением и напряжением стенки кишки вследствие скопления газов, наличия каловых масс или по другим причинам.

Рука вводится вначале до предплечья, так как необходимо пальпировать в тазовой области, а потом можно вводить и до плеча. Придвинув ее ближе к переднему краю лонного сращения и смещая вправо, влево, вперед и назад, находят шейку матки. Располагается она вдоль тазового сочленения в виде плотного валика. Впереди шейки находят мягкое тело матки и связанные участки рогов. Эти участки пальпируют обычно средним, указательным и безымянным пальцами. В зависимости от возраста животных, состояния пищеварительного тракта и наполнения мочевого пузыря, стадии полового цикла и срока беременности шейка матки может находиться в середине тазовой полости, на переднем конце лонного сращения или она опущена в брюшную полость. Для определения состояния шейки матки необходимо отодвинуть ее в сторону и полностью обхватить рукой. Нередко это можно сделать только после подтягивания ее с брюшной в тазовую полость.

Можно исследование начинать и с матки. У небеременных или оплодотворенных недавно животных матка расположена в тазовой полости, на лонных костях или в ложбине лонного сращения. Но если мочевой пузырь наполнен мочой, то матка отодвинута вверх или в сторону. В этом случае следует опасаться допустить ошибку, приняв мочевой пузырь за беременную матку. Для пальпации рогов матку приближают путем надавливания на дорсальную поверхность (указательный или средний палец можно ввести в углубление между рогами) и подтягивания ее назад. Пальпируют связанную

и свободные части рогов, сравнивая их величину. Для этого, удерживая матку в тазовой полости, четырьмя пальцами отводят в сторону и обхватывают левый рог снизу, а большим пальцем надавливают сверху и пальпируют его до верхушки. Также пальпируют и правый рог матки, однако расположение четырех пальцев (правой руки) должно быть обратным: указательный палец обращен вниз, мизинец находится сверху спереди, а большой палец обхватывает рог снизу, сзади. Кисть руки при этом сильно поворачивают вокруг продольной оси влево.

У многорожавших коров матка обычно смещена в брюшную полость. Переместить ее в тазовую полость можно путем подтягивания за шейку матки. В других случаях кистью руки обводят матку сверху спереди, прижимают к задней части брюшной стенки и постепенно сдвигают (как бы подгребают) в тазовую полость. Нередко для этого требуется сделать несколько глубоких введений руки в прямую кишку, каждый раз все больше и больше смещая матку кзади. В крайних случаях для подтягивания матки используют хирургический инструмент (щипцы). Вводят их во влагалище, фиксируют шейку матки и оттягивают назад. В этих случаях необходимо иметь точные сведения о времени осеменения животного.

После исследования матки находят яичники. У животных небеременных или на ранних стадиях беременности яичники располагаются в тазовой полости или на границе тазовой и брюшной полостей. После 3 мес. стельности они смещаются в брюшную полость вперед на 5-8 см и опускаются несколько ниже края лонного сочленения. Для отыскания их у небеременных животных распрямленную руку кладут на стенку расслабленной кишки и двигают назад несколько левее или правее сагиттальной линии. Яичники ощущаются подвижными узловатыми телами. Для пальпации сначала обхватывают яичник всеми пальцами сверху и затем поворотом руки влево фиксируют так, чтобы он связанным краем оказался между безымянным и средним пальцами. В таком положении удерживают его и пальпируют сверху и с боков указательным и большим пальцами, а остальными пальцами - снизу. Правой рукой легче пальпировать левый яичник. Для первоначальной фиксации правого яичника руку необходимо повернуть сильно в лево, но после захвата всеми пальцами сверху в дальнейшем поступают также, как и с левым яичником. Все эти манипуляции удаются только после полного расслабления стенки прямой кишки.

При пальпации яичников обращают внимание на их величину, форму, консистенцию, бугристость поверхности. При наличии в яичнике желтого тела величина его будет больше другого (величиной со сливу) и, как правило, обнаруживается выступ. Если корова стельная, то зародыш будет располагаться в роге на стороне этого яичника. Иногда в одном из яичников обнаруживается фолликул, а в редких случаях - киста. Если яичник маленький, гладкий, то в этом роге нет зародыша. Если оба яичника маленькие, то жи-

вотное небеременное, или же оно осеменено недавно, или находится в состоянии охоты.

У *нестельной* коровы матку можно захватить между ладонью и пальцами руки (забрать в кисть руки). В первые дни и в конце полового цикла при поглаживании матка сокращается и ощущается в виде полушаровидного гладкого образования, разделенного на две половины межроговой бороздой. В расслабленном состоянии место расхождения рогов и межроговая борозда хорошо выявляются. При пальпации рогов устанавливают одинаковую их консистенцию и величину. Но у многорожавших коров правый рог может быть несколько больше левого, а в первые 50-60 дней после отела у всех коров и особенно у первотелок бывший беременный рог заметно больше другого.

В *35 дней стельности* шейка матки в тазовой полости, рога располагаются на крае лонного сращения или свешиваются в брюшную полость. Сократительная функция матки сильно ослаблена. Рог матки с зародышем несколько больше другого, консистенция его более мягкая; при скольжении по нему руки ощущается перемещение жидкости в аллантаоисе.

В *2 месяца стельности* шейка матки на лонных костях, рога матки опущены в брюшную полость. Рог-плодовместилище вдвое больше свободного рога матки; в нем ощущается жидкость (проявляется флюктуация). Нередко наличие жидкости хорошо определяется в небеременном рогу. Сократительная функция матки не выражена. Межроговая борозда сглажена.

В *3 месяца стельности* рог-плодовместилище в 2-3 раза больше свободного рога, межроговая борозда слабо пальпируется. Вся матка представляется флюктуирующим пузырем, величиной с голову взрослого человека. Яичники несколько смещены в брюшную полость.

Примечание:

При исследовании в период до 3 мес. после осеменения возможно одно из следующих заключений: животное не стельное;

животное, вероятно, стельное, но признаки пока нечетко выражены для постановки точного диагноза;

животное стельное;

невозможность постановки диагноза вследствие затруднений при исследовании.

В *4 месяца стельности* шейка матки у входа в таз, матка в брюшной полости, ощущается в виде наполненного жидкостью флюктуирующего тонкостенного мешка; величина и форма определяются с трудом. Иногда флюктуация не ощущается. На стенке матки обнаруживаются карункулы. При исследовании молодых животных этих признаков бывает достаточно, чтобы с уверенностью поставить точный диагноз. У многорожавших коров стремятся обнаружить плод. Если он размещается высоко, то это удается сделать. Если не находят плод, тогда пытаются пальпировать 2-3 карункула впереди края таза (на 8-10 см). Определяют и состояние маточных сосудов; в этот срок ощущается вибрация средней маточной артерии на стороне беременного рога.

Иногда при исследовании животного не обнаруживаются плод, карункулы и изменения в состоянии маточных сосудов. В таких случаях заключение делают на основании следующих признаков: отсутствие в течение 4 мес и более охоты и осеменения; отсутствие небольшой матки и яичников в тазовой полости или вблизи таза; наличие шейки матки на краю таза или в брюшной полости и ограниченной подвижности ее при попытке переместить в тазовую полость.

В 5 месяцев стельности признаки те же, что и в 4 мес, однако четче выявляются карункулы, яснее ощущается вибрация средней маточной артерии, а шейка матки почти полностью смещена в брюшную полость. Плод пальпируется не всегда.

В 6 месяцев стельности матка опущена глубоко в брюшную полость, шейка матки также смещена в брюшную полость. Свободно выявляются карункулы величиной с небольшое куриное яйцо. Сильно выражена вибрация средней маточной артерии на стороне беременного рога, и слабо - на противоположной стороне. Плод обнаруживается редко.

В 7 месяцев стельности признаки те же, что и в 6 мес. Хорошо выражена вибрация обеих средних маточных артерий. При пальпации плода легче распознаются отдельные части его тела.

В 8 месяцев стельности шейка матки перемещается в тазовую полость или расположена у входа в таз. Легко пальпируются предлежащие органы плода.

В 9 месяцев стельности шейка матки и предлежащие органы плода находятся в тазовой полости или вблизи ее. Выявляются предвестники родов.

Дифференциальный диагноз. Ошибки при диагностике беременности могут быть связаны с наличием у животного пиометры, которая нередко является следствием заболевания трихомонозом или же развивается после гибели плода в результате ошибочного осеменения коровы на 3-4-ом месяцах стельности. При пиометре расположение и величина матки оказываются почти такими же, как и у беременных животных в 3 месяца. Однако матка тестообразной консистенции, менее вибрирующая, стенки ее более напряжены и толще, при скольжении руки не ощущается перемещение жидкости как в алланта-хорионе. Часто при пиометре оба рога матки расширены в одинаковой степени, однако имеются случаи, когда больше расширен рог на стороне яичника с желтым телом. На основании однократного исследования ставить диагноз нельзя. Требуется несколько повторных исследований с промежутком 7-10 дней. Но если животное было осеменено 4-5 месяцев назад, а величина матки как в 90 дней стельности и на ее стенке не пальпируются карункулы, то это дает основание сделать точное заключение. В других случаях при повторных исследованиях констатируют отсутствие изменений в величине матки и карункулов, отсутствие плода, наличие периодических выделений.

При мумификации гибель плода происходит в возрасте 5-7 месяцев и величина его после рассасывания жидкости оказывается значительно меньше, чем на такой стадии развития.

Диагностирование многоплодной стельности ректальным методом необходимо проводить спустя 50-70 дней после осеменения (эмбриопересадок). При наличии у коров флюктуации околоплодной жидкости в обоих рогах матки и относительно равных их размерах велика вероятность стельности двумя плодами.

Лабораторные методы диагностики стельности и бесплодия. Наиболее точным и широко применяемым в мировой практике является тест, основанный на определении содержания прогестерона в крови или молоке. Этот тест обеспечивает ранний диагноз стельности или бесплодия. Он заключается в количественном определении гормона у осемененной самки в строго определенное время.

У животного после охоты содержание прогестерона повышается в первые дни цикла и остается высоким до 17-18-го дня. В конце цикла уровень его резко снижается, что совпадает с началом регрессии желтого тела. У стельной коровы желтое тело не регрессирует и высокий уровень гормона поддерживается в течение всей беременности. Для исследования можно использовать сыворотку или плазму крови, или же молоко. Причем вследствие хорошей растворимости прогестерона в молочном жире, концентрация его в молоке выше, чем в крови.

Для проведения исследования у коровы или телки берут кровь через 20-23 дня, а молоко - через 21-24 дня после осеменения. Молоко (около 20 мл) выдаивают в стеклянную или пластиковую пробирку. Предварительно в нее добавляют 0,1 мл насыщенного раствора калия бихромата. Молоко желательно брать во время послеобеденного доения, так как в это время суток оно имеет более высокое содержание жира. Взятые образцы молока следует предохранять от воздействия ультрафиолетовых лучей и высокой температуры.

После взятия крови как можно раньше отделяют путем центрифугирования форменные элементы и плазму хранят в замороженном состоянии до исследования. Для получения сыворотки кровь помещают на несколько часов в холодильник, после чего центрифугируют и полученную сыворотку также хранят в морозильной камере. Длительное хранение цельной крови до получения сыворотки или плазмы при комнатной температуре нежелательно, так как содержание прогестерона при этом снижается.

Содержание прогестерона определяют непосредственно на ферме методом ELISA, основанным на использовании наборов для энзим-иммуносорбентного исследования или в специальных лабораториях радиоиммунным методом. У стельного животного уровень прогестерона в крови не менее 2 нг/мл, а в молоке - 11 нг/мл, у небеременных животных более низкое содержание гормона. Диагноз очень точен для небеременных животных (около 100%). Точность положительных диагнозов менее высока (80-88%).

Наиболее вероятные причины *фальс-отрицательного диагноза*:

- низкий уровень секреции прогестерона желтым телом;
- низкое содержание жира в отобранном образце молока;
- нарушение условий хранения исследуемой пробы молока;
- ошибки в нумерации проб на ферме или в лаборатории.

Причины фальс-положительного диагноза:

- короткий половой цикл; при взятии пробы молока на 24-й день у небеременной коровы в это время будет сформировано желтое тело очередного полового цикла, который остался незамеченным;
- гибель эмбриона после взятия пробы молока;
- наличие в яичнике лютеиновой кисты;
- осеменение не в период охоты; если корова была осеменена в начале или середине ди-эструса, оплодотворение не происходит и при взятии образца молока для исследования на 24-й день в яичнике может присутствовать желтое тело следующего пропущенного цикла.

Главное преимущество этого метода состоит в том, что он, как и ультразвукография, позволяет раньше других методов выявить бесплодие, выяснить причины и при необходимости провести лечение и осеменить животное в очередной цикл. А при исследовании молока на 19-й день после осеменения в случае низкого содержания прогестерона можно выявить очередную охоту и повторно осеменить животное.

Диагностика суягности и бесплодия у овец и коз

Беременность и бесплодие у овец и коз можно диагностировать путем систематического применения самцов-пробников, а с 3,5 мес беременности -

наружным исследованием. Точные результаты в ранние сроки можно получить путем ультразвукового исследования или применения других методов.

Выявление охоты с большой вероятностью указывает на отсутствие суягности, а отсутствие ее в течение 16-19 дней после осеменения - на наличие беременности. Однако 10% или более овец, не проявивших в этот срок охоту, вследствие эмбриональной смертности оказываются небеременными, а 20-30% животных проявляют охоту в ранние сроки беременности.

Наружное исследование проводят начиная с 100-го дня суягности. Животное выдерживают на полусуточной голодной диете. В момент исследования матку желательно приподнять за тазовые конечности. В этом случае желудочно-кишечный тракт сместится к диафрагме, и давление в задней части брюшной полости станет слабее. Исследующий становится справа, обхватывает с обеих сторон животное и периодически приподнимает брюшную стенку под поясничными позвонками (непосредственно впереди вымени). В этот момент можно ощущать рукой перемещение плода.

Исследование с помощью ультразвуковых приборов основано на выявлении сердцебиения плода или шумов в сосудах пуповины, а при графическом отображении - на обнаружении жидкости в полости рогов матки, плацентом или самих плодов.

Для прослушивания сердцебиения или шумов с помощью детектора пульса (Doppler) сканируют область живота впереди вымени; до начала пробы тщательно удаляют волос и смазывают подготовленный участок вазелином. Во время пробы учитывают, что частота сердцебиения у плода превышает частоту сердцебиения матери. Но в конце беременности у матери частота пульса может быть выше. В период между 40 и 80 днями точность диагноза не выше 60%, а после 80 дней - свыше 90%.

При использовании приборов с графическим отображением и сканировании через прямую кишку с 35-го дня (не ранее 20-25 дней) устойчиво выявляются жидкость, плацентомы и эмбрионы, а при сканировании через брюшную стенку (бок живота, область паха) - с 35-50-го дня. Идеальное время для ультразвукографии - с 45-го по 50-й день.

Возможно использование для диагностики беременности у овец и коз радиографии (с третьего месяца; после 96 дней точность 100%), гистологического исследования слизистой оболочки влагалища (с 40-го дня; с 80-го точность 100%), определения содержания прогестерона в молоке или плазме крови (на 18-22-й день 3,7 нг/мл у беременных и 1 нг/мл у небеременных; точность 82-84%), пальпации задней маточной артерии через стенку влагалища (точность низкая) и др.

Диагностика жеребости и бесплодия у кобыл

Изменения в половых органах у кобыл

Жеребость до 40 дней. В конце половой охоты в яичниках находится до 10-12 крупных фолликулов, но большинство из них непосредственно перед овуляцией уменьшается в величине. Созревшие фолликулы имеют в диаметре в среднем 41 мм. Овуляция происходит в течение 40-45 с. За это время фолликул быстро уменьшается в величине и жидкости в нем почти не остается. В первый день после овуляции формирующееся желтое тело небольшое и имеет такую консистенцию, как и наполненный жидкостью фолликул. Различить желтое тело пальпацией от других тканей яичника можно в течение 1-2-х дней. Ультразвуковым исследованием желтое тело распозна-

ется в любое время независимо от расположения в яичнике. Этим способом выявляется два типа желтых тел: устойчивый эхогенный, наиболее часто встречающийся, и с не эхогенной центральной частью. Второй тип желтых тел имеет место в 9-10% случаев при одиночных и до 36% - при двойных овуляциях.

До 40-го дня в яичниках выявляются только первичные желтые тела (одно или два). К 18-20-му дню обнаруживается несколько фолликулов диаметром 10-40 мм. Затем они подвергаются регрессии и новая волна роста фолликулов наблюдается около 40 дней. Наличие желтого тела после 20-го дня при отсутствии эмбриона возможно в случае развития ложной беременности.

Матка в течение ди-эструса и эструса мягкая, эндометрий тонкий. После овуляции тонус матки увеличивается и она становится более цилиндрической (напоминает батон колбасы). Такие изменения почти незаметны у небеременных животных и совершенно исчезают у них после начала регрессии желтого тела на 10-14-й день; у беременных кобыл желтое тело остается и тонус матки увеличивается до 19-21-го дня, что вызывает характерные изменения формы матки и рогов. Затем зародыш вызывает появление мягкой припухлости истончающейся части рога, примыкающей к телу матки.

В большинстве случаев (64%) зародыш размещается в правом роге, хотя овуляция чаще происходит в левом яичнике. Но у лошадей внутриматочная миграция зародыша - явление обычное. У пони частота размещения зародыша в правом роге незначительно больше, чем в левом. При двойнях зародыши располагаются в обоих рогах матки. Расширение рога зародышем распространяется внизу в переднем и заднем направлениях и оно слабо возрастает до 30 дней. Затем рост зародыша усиливается и припухание прогрессивно увеличивается до верхушки беременности рога матки. На 35-40-й день начинают развиваться эндометриальные чаши, которые продуцируют ГСЖК.

Зародыш на 10-й день находится в теле матки не в фиксированном состоянии, имеет сферическую форму и величину 0,6 мм в диаметре. Обладает способностью к перемещению; эта способность увеличивается до 15-го дня. После 17-го дня внутриматочная миграция зародыша прекращается. Быстрый рост зародышевого пузырька наблюдается до 17-го дня; после этого он приобретает неправильную форму. Резко повышается тонус матки, утолщается стенка. Ультразвуковым методом зародышевый пузырек можно обнаружить с 9-го дня. Эмбрион в пузырьке впервые выявляется на 20-25-й день. Сокращения сердца обнаруживаются на 22-й день. Ультразвуковой метод позволяет определить и частоту эмбриональной смертности. С 10 по 50 день погибает от 5 до 30% эмбрионов (в среднем 13,4% при осеменении кобыл свежеполученной спермой и 13,3% - при хирургической трансплантации эмбрионов; E.L.Sguires et al., 1988). Гибели предшествует умень-

шение частоты сердечных сокращений и полное их прекращение, уменьшение плацентарной жидкости, разрушение оболочек).

Влагалище после оплодотворения прогрессирующе становится бледным и сухим и покрыто тонким слоем густой липкой слизи. Шейка матки небольшая и плотно закрыта. Наружное отверстие постепенно заполняется слизистой пробкой и размещается эксцентрично.

Жеребость с 40 по 140 день. Повышается фолликулярная активность яичников, происходит овуляция созревших или лютеинизация неразорвавшихся фолликулов, образование дополнительных желтых тел, которые обеспечивают необходимую концентрацию прогестерона в организме до начала секреции гормона плацентой. Вследствие созревания фолликулов один или оба яичника сильно увеличиваются и становятся больше, чем в период охоты. Спадает фолликулярная активность на четвертом месяце жеребости.

Эндометриальные чаши с 38-42-го дня продуцируют ГСЖК. Уровень гонадотропина повышается максимально до 50-200 ИЕ в мл сыворотке крови на 50-70-й день, затем постепенно снижается до 0 к 110-140 дням.

Зародышевый мешок в 2 месяца жеребости полностью занимает беременный рог матки. В последующем алланта-хорион внедряется в тело и затем в небеременный рог матки. Беременный рог начинает изменять положение в брюшной полости от поперечного до продольного.

В период около 100 дней наполненная жидкостью матка слабо напряжена и давит на вход в тазовую полость. Плод в это время небольшой, плотно окружен амнионом и плавает в относительно большом объеме аллантаической жидкости. Плацента начинает продуцировать огромные количества эстрогенов, которые в конъюгированном виде выделяются с мочой.

Жеребость после 140 дней. В это период отмечается постепенная регрессия желтых тел и фолликулов; яичники становятся все меньше и меньше в величине, твердыми и оттягиваются беременной маткой в брюшную полость вниз вперед. Матка постепенно расширяется плодом и жидкостью и увеличивается в объеме и массе. За весь период беременности масса ее (без содержимого) увеличивается в 4-5 раз. Небеременный рог увеличивается в меньшей мере. Вследствие увеличения в объеме и массе матки с содержимым (в 5-20 раз) и смещения ее вниз сильно возрастает напряжение на маточно-яичниковые связки. Матка оттесняется толстым отделом кишечника влево и прилегает к левой брюшной стенке; со второй половины беременности левая брюшная стенка заметно выпячивается, а в конце плодношения нижняя часть ее отвисает. Плод после восьмого месяца принимает в матке устойчивое продольное положение. Содержание эстрогенов в моче достигает максимума на 200-250-й день, затем медленно уменьшается к концу ее.

Методы диагностики жеребости

Клинические методы основаны на сборе анамнеза, наружном и внутреннем исследовании животного.

Путем собирания анамнестических данных и наблюдения можно выявить только вероятные признаки жеребости. Отсутствие половой охоты в течение 16-22-х дней после осеменения является наиболее существенным из таких признаков. Достоверность этого признака более высока, если после осеменения ежедневно начиная с 8-10 дня проверяют кобылу пробником: в течение 20-30 мин. содержат ее вблизи жеребца или вместе со стреноженным жеребцом. Однако точность диагностики по отсутствию охоты не слишком велика, так как некоторые кобылы могут не оплодотворяться, но затем проявить состояние анэструса или же "тихую овуляцию"; у других после оплодотворения происходит ранняя гибель зародыша с последующим развитием состояния ложной беременности, когда половые циклы также отсутствуют; некоторые беременные животные, напротив, проявляют половую охоту в это время.

При наружном осмотре животного со второй половины беременности можно установить ряд вероятных признаков (изменение контуров живота, увеличение и отек молочной железы, отек брюшной стенки и одной или обеих тазовых конечностей) и истинный признак - движение плода. Пальпацией брюшной стенки после 6 месяцев обнаруживается плод, а при благоприятных анатомо-топографических условиях прослушивается и его сердцебиение, которое отличается большей частотой (120-130 ударов в минуту), по сравнению с сердцебиением матери.

Наружное исследование должно проводиться натощак. Кобылу ставят на ровную площадку и путем поворота ее головы налево ослабляют напряжение брюшной стенки. Помощник поднимает левую переднюю ногу. Исследующий становится лицом к крупу животного, левой рукой берется за холку, а правой ладонью (удобнее с согнутыми пальцами) осторожным коротким надавливанием пальпирует различные участки брюшной стенки по линии от коленного сустава к пупку. Ощущение ответного толчка твердого тела после начала ослабления давления руки связано с возвращением отодвинутого вглубь брюшной полости плода. Если не нащупали твердое тело, то нужно попытаться уловить рукой движения плода (удар, трение, скольжение, вращение). Прослушивание проводится с помощью фонендоскопа в тех же участках, что и пальпация. Нередко не удается пальпировать плод (или прослушать его сердцебиение) даже у глубоко жеребых кобыл. Но это не может расцениваться как отрицательный результат.

Влагалищный метод диагностики включает *визуальное* и *мануальное исследование*. Для проведения диагностики этим методом кобылу заводят в станок или фиксируют с помощью случной шлеи. При необходимости дополнительно поднимают переднюю конечность. Наружные половые органы и промежность тщательно моют. *При визуальном исследовании* стерильное прогретое влагалищное зеркало слегка смазывают вазелином. Исследующий

и помощник касаясь пальцами половых губ с обеих сторон приоткрывают половую щель, после чего подготовленное зеркало вводится во влагалище. Проводится быстрый осмотр слизистой оболочки; при этом определяют цвет ее, наличие и характер слизи, состояние шейки матки и наружного отверстия. У *небеременных животных* зеркало вводится относительно свободно. Слизистая оболочка влажная, блестящая, покрыта небольшим количеством слизи. Шейка матки расположена в центре, неглубоко, иногда вдаётся в просвет раскрытого зеркала. В канале шейки матки отсутствует слизистая пробка. У *беременных кобыл* отмечается значительное сопротивление при введении влагалищного зеркала вследствие сухости стенок влагалища и наличия липкой слизи. Отмечается бледность слизистой оболочки. В устье шейки матки имеется слизистая пробка. При *мануальном исследовании* руку в перчатке вводят во влагалище. Определяют физическое состояние его стенок и консистенцию слизи, а также наличие или отсутствие слизи в устье шейки матки.

Дополнительно к влагалищному исследованию рекомендуется провести микроскопическое исследование цервикальной слизи (метод Курасова, 1931). Слизь берут деревянной палочкой с ватным шариком или корнцангом, делают мазок и окрашивают краской Романовского (3 капли на 1 мл дистиллированной воды). В мазках у жеребых кобыл выявляются клетки реснитчатого эпителия и единичные клетки плоского эпителия, редко нейтрофилы; слизь в виде гомогенных голубых шаров. У *небеременных животных* в мазках находят клетки плоского эпителия, нейтрофилы и единичные клетки реснитчатого эпителия.

Влагалищный метод диагностики не дает абсолютной уверенности в наличии или отсутствии жеребости и не позволяет устанавливать сроки ее. Микроскопическое исследование слизи на 20-40-й день дает 77,6% точных результатов, а после 70 дней - 94,8% (W.C. Miller and F.T. Day, 1938).

Ректальное исследование кобыл следует проводить осторожно, желательнее натошак, в просторном теплом помещении с ровным полом, а в теплое время года на открытой площадке. Животное фиксируют с помощью случной шлеи или вожжей. Фиксируют обе тазовые конечности и приподнимают голову; хвост можно забинтовывать. В момент введения руки в прямую кишку у строгих кобыл приподнимают левую переднюю конечность. Исследовать целесообразно двумя руками. На руки одевают длинные полиэтиленовые перчатки или специальные гинекологические резиновые перчатки; можно исследовать и незащищенными руками, предварительно хорошо смазав их вазелином. Сначала освобождают прямую кишку от каловых масс. Затем продвигают правую руку (достаточно четыре пальца) в узкую часть кишки до уровня 4-5-го поясничного позвонка, сгибают пальцы под прямым углом и прижимают их к левой брюшной стенке в области голодной ямки. Двигая руку спереди назад в области маклока находят яичник, а несколько ниже напряженный тяж - передний край маточно-

яичниковой связки. Так как яичник не имеет постоянного положения, то нередко приходится исследовать всю верхнюю часть тазовой полости и примыкающую к ней область брюшной полости. Отыскав яичник, захватывают его между большим пальцем, ладонью и кончиками остальных пальцев исследуют его, а потом в согнутом положении кисть руки опускают вниз назад. Рука должна скользить по маточно-яичниковой связке, при этом четыре пальца поддерживают ее снизу и обращены вниз назад, а большой палец располагается сверху и также обращен назад. Со связки рука попадает на верхушку рога матки. Пальпируя его смещают руку вправо и достигают места расхождения рогов. Не изменяя положения кисти руки пальпируют переднюю часть тела матки (дно матки). Затем распрямив пальцы отодвигают кисть руки назад по телу матки до шейки и пальпируют ее. Опять руку возвращают вперед к месту расхождения рогов, придают кисти руки согнутое положение, смещают ее вправо и пальпируют правый рог матки до верхушки, при этом постепенно поворачивая руку вокруг продольной оси влево, достигают маточно-яичниковой связки и правого яичника. Однако делать это правой рукой затруднительно. Удобнее правый рог и соответствующий яичник пальпировать левой рукой.

В период беременности в связи с увеличением кровообращения матки увеличивается диаметр маточных сосудов и изменяется характер тока крови в них. Начиная с 4-5-го месяца жеребости при сдавливании средней маточной артерии, а в более поздние сроки - двух других маточных сосудов вместо обычного пульсового толчка ощущается протяжная вибрация их стенок. Сосуды можно обнаружить непосредственно в широкой маточной связке или же в месте отделения их от аорты. У кобыл средние маточные артерии отходят от наружных подвздошных артерий (*aa. iliaca externa*), а эти сосуды от брюшной аорты под пятым поясничным позвонком. Для ощущения вибрации маточных артерий необходимо сдавливать их не в месте отделения, а несколько ниже. Переднюю маточную артерию находят в связке относительно средней артерии. Задние маточные артерии отходят от геморроидальных (*aa. haemorrhoidalis media*), а эти артерии от внутренних подвздошных (*a. iliaca interna*), которые являются двумя конечными ветвями делящейся брюшной артерии на уровне 6-го поясничного позвонка.

У небеременных кобыл рога матки одинаковой величины, плоские, дрябловатые, в виде ленты или тесьмы. При пальпации в первые 10-12 дней после овуляции иногда рога матки сокращаются и на непродолжительное время (до 7-10 секунд) приобретают цилиндрическую (колбасовидную) форму. Шейка матки на уровне лонных костей и несколько приподнята над дном тазовой полости. Если прижать ее пальцами к тазовому сочленению то ощущается в виде продольного валика длиной 4-8 см. Впереди без резких границ переходит в тело матки, а сзади в виде втулки вдается во влагалище.

У жеребых кобыл впервые зародыш можно пальпировать на 17-21-й день, когда выявляется мягкий, маленький, припухший участок рога матки величиной 2,4-2,8 см (с маленькое куриное или голубиное яйцо, мячик для гольфа) или же проявляется ощущение небольшой брешки (провала) в напряженном, округлом роге. Более легко такой участок ощущается между 21 и 30 днями, но только в передне/нижней его части; в 25 дней флюктуирующая припухлость имеет величину 3-3,4 см (с яйцо молодки).

В 30 дней припухание распространяется не только на нижнюю, но и верхнюю стенки; диаметр ее 3-4 см (с куриное яйцо). В последующем такой характер припухлости сохраняется и величина ее равномерно возрастает до 60-го дня; в 35 дней - с теннисный мяч, в 40 дней - с апельсин или яйцо индейки (6-7 см в диаметре), в 45-50 дней - с грейпфрут и *в 60 дней* - с крупный грейпфрут. Свободный рог в 2 месяца жеребости цилиндрической формы и почти не изменен в величине. В это время может быть распознана двойня. Позднее оболочки с жидкостью одного плода внедряются в оба рога матки и флюктуация становится диффузной, поэтому определить, один или два плода развивается в матке, оказывается невозможным.

В 3 месяца беременности матка прощупывается в виде раздваивающегося впереди пузыря величиной с детский футбольный мяч, а в 110 дней - с продолговатый мяч регби. Располагается этот пузырь на лонном сращении. Рога матки, в виде двух ответвлений пузыря, смещаются вперед в брюшную полость. Цилиндрическую форму имеет только верхушка свободного рога. В 70-100 дней можно ошибочно принять наполненный мочевой пузырь за беременную матку, а в 90-120 дней - наполненную большую ободочную кишку. Распознают матку по месту расхождения рогов и связи с яичником посредством маточно-яичниковой связки.

Следует отметить, что величина плодового мешка до 110 дней строго зависит от срока беременности и величины животного. Если величина кажется меньше, чем должна быть, то необходимо провести повторное исследование в более позднее время, чтобы исключить гибель зародыша. Около 100 дней в теле матки часто пальпируется свободно плавающий в аллантоисной жидкости плод. Яичники оттягиваются опускающейся маткой и располагаются близко один от другого на уровне 3-4-го поясничных позвонков. Оба или один из них могут быть увеличены вследствие развития фолликулов и образования желтых тел.

В 4 месяца беременности яичники сближены и глубоко опущены брюшную полость, обычно не пальпируются или же обнаруживаются на уровне 2-3-го поясничных позвонков и дна тазовой полости. Тело матки в виде продолговатого, слабо напряженного флюктуирующего мешка величиной с большой арбуз пальпируется в брюшной полости. Начиная с конца четвертого месяца вследствие уменьшения напряжения плодного мешка и заметного роста плода легко пальпируется та часть плода, которая размещается в теле матки.

Между 5-м и 8-м мес беременности матка прогрессирующе опускается в брюшную полость и становится трудно достигаемой для исследования. Широкие маточные связки напряжены. С 5-го месяца начинает проявляться вибрация средней маточной артерии со стороны рога-плодовместилища. С 5-го по 7-й мес отмечаются затруднения в пальпации плода, особенно у крупных многорожавших кобыл. Шейка матки к 8-му мес полностью опущена в брюшную полость; хорошо проявляется вибрация стенок обеих средних маточных артерий и начинается вибрация задней маточной артерии со стороны рога-плодовместилища.

С 9-го по 10-й мес матка значительно увеличивается в размерах и начинает смещаться в тазовую полость. Плод достигаем для пальпации. Все маточные артерии вибрируют.

В 11 мес в тазовой полости пальпируются лежащие части плода. Но иногда у кобыл перед родами могут быть затруднения в пальпации плода. Однако отсутствие вблизи тазовой полости небеременной матки и напряжение связок убеждают в наличии беременности.

Оптимальное время для исследования кобыл - 35-40 дней. В этот период легко дифференцируется припухшая часть рога матки от остальной напряженной его части; диагностируется двойня; может быть установлена ложная беременность и приняты меры для стимулирования цикличности и осеменения; можно выявить кобыл, которые не оплодотворились и у которых был пропущен второй половой цикл. Исследование до 30 дней, а затем повторное в более позднее время, позволяет выявить случаи эмбриональной смерти. Установлено, что осторожная пальпация матки не является причиной гибели зародыша.

Диагностика беременности и бесплодия у свиней

В свиноводстве особое значение имеет ранняя диагностика беременности. Важно знать уже к концу третьей недели, что матка или свинка не беременны, чтобы своевременно осеменить их повторно или же отправить на убой.

Рефлексологический метод. Проявление или отсутствие половой охоты у свиней на 17-22-й день после осеменения указывает на бесплодие или возможную беременность. Для выявления охоты ежедневно начиная с 15-го дня в группы свиноматок пускают на 0,5-1,5 ч хряка-пробника. Точность диагноза бесплодия (выявление охоты) приближается к абсолютной, а беременности не превышает 80-85%. Отсутствие охоты может быть связано со слабым проявлением признаков ее, с анэструсом или кистами яичников.

Ультразвуковой метод. При использовании ультразвуковых эхолокаторов с переносным зондом-передатчиком (приборы модели А, внешний датчик, 2 МГц, рис.) в период с 30 до 90 дней после осеменения в 99% случаев достигается точность диагноза беременности и в 98% - бесплодия;

подобные результаты можно получить при исследовании в период от 30 до 60 дней. Точность исследования в первые 30 дней ниже.

Модели приборов (тип В), которые дают непосредственное отображение исследуемой области, наиболее эффективны. Датчик прибора прикладывают к брюшной стенке стоящей свиноматки на 5 см сзади пупка и латеральнее правых сосков и продвигают по направлению к задней части живота. Предварительно область перемещения датчика смазывают связывающей средой. Точность диагноза после 22-х дней приближается к абсолютной. Ошибки могут быть вызваны гибелью зародышей. При использовании датчика 5 Mhz, введенного в прямую кишку, можно точно диагностировать беременность в период между 12 и 20 днями.

Ректальный метод. Этот метод применим у многорожавших крупных (масса 150 кг или более) животных.

Перед исследованием свиноматку помещают в клетку для осеменения, фиксируют петлей за верхнюю челюсть и затем делают очистительную клизму (1-2 л теплой кипяченой воды). Исследуют животное двумя руками: левую сторону правой, а правую сторону - левой рукой. Если после введения руки отмечаются сильные сокращения прямой кишки, то исследование на некоторое время прекращают. Через расслабленную прямую кишку хорошо пальпируются влагалище, матка и яичники.

Яичники находят возле соответствующей брюшной стенки на 10-15 см ниже маклоков. У свинок в возрасте 9 мес. величина левого и правого яичников составляет: длина 2,7 и 2,8 см, ширина 1,7 и 1,9 см и высота 1,2 и 1,3 см; у здоровых свиноматок длина яичников колеблется от 3 до 4 см, ширина - от 2 до 2,5 см. При атрофии яичников отмечается уменьшение их величины. При пальпации яичников можно обнаружить фолликулы, желтые тела или кисты. Фолликулы пальпируются как тонкие, флюктуирующие пузырьки разного диаметра; крупные фолликулы сильно напряжены и при пальпации их у животного проявляется болезненность. Желтые тела пальпируются в виде плотных бугорков над поверхностью яичника. Диаметр желтых тел и фолликулов не превышает 1 см. Кисты яичников пальпируются в виде тонкостенных пузырьков большего диаметра, чем фолликулы. Однако отличить мелкие кисты от фолликулов невозможно, но при повторных исследованиях через 2-3 недели обнаруживают их увеличение или же овуляцию и наличие желтых тел.

Для диагностики беременности важное значение имеет точное определение состояния яичников и матки, а также средней маточной и наружной подвздошной артерий. Эти артерии пересекаются на уровне последних поясничных позвонков. Наружная подвздошная артерия направляется вперед в брюшную полость и может быть определена как ветвь маточной артерии, идущая вдоль подвздошной кости в сторону задней конечности. Однако она имеет постоянный диаметр во время беременности (около 1 см у взрослых свиноматок), все время вибрирует и не перемещается, так как тесно соеди-

нена с окружающими тканями. Средняя маточная артерия располагается в маточной связке, поэтому легко смещается; она проходит сверху вниз и назад, а затем поворачивается вперед и вниз. Диаметр ее меняется в зависимости от сроков беременности.

0-21 день беременности. Состояние шейки и матки подобно как и у небеременных животных в середине цикла. Однако бифуркация рогов менее отчетливо выражена, матка несколько увеличена, а стенки ее становятся мягче. Средняя маточная артерия к концу третьей недели имеет диаметр около 5 мм в месте пересечения с наружной подвздошной артерией. С 6-8-го дня беременности в яичниках пальпируются желтые тела.

21-30 дней. Бифуркация рогов слабо выражена, стенка шейки и матки дряблая, тонкая. Средняя маточная артерия 5-8 мм в диаметре и более легко обнаруживается.

31-60 дней. Шейка матки пальпируется как удлиненная трубка с мягкими стенками. Матка едва обнаруживается и имеет тонкие стенки. Средняя маточная артерия достигает диаметра наружной подвздошной артерии. Вибрация ее впервые может быть обнаружена в 35-37 дней. Для сравнения можно пальпировать наружную подвздошную артерию.

С 60 дней до родов. Средняя маточная артерия имеет больший диаметр, чем наружная подвздошная, и хорошо вибрирует; место пересечения с наружной подвздошной сдвигается кзади, чем ранее. Плоды пальпируются только в конце беременности вблизи бифуркации рогов матки.

Точность положительного диагноза в период 30-60 дней беременности 94-99%, отсутствия беременности - 86-97%.

Метод биопсии влагалища. Гистологическое исследование базируется на том, что в период проэструса и эструса под влиянием эстрогенов отмечается пролиферация покровного эпителия и число слоев клеток достигает 20. К 11-12-му дню цикла, когда доминирует прогестерон, происходит уменьшение их до 3-4, а в конце диэструса - до двух слоев. По мере развития беременности прогестерон продолжает доминировать и к 26-му дню типичной гистологической картиной является два параллельных ряда клеток с темно окрашенными ядрами. Такая картина сохраняется до последних трех недель беременности (рис.). Точность положительных диагнозов - 97%, отрицательных - 94% (McCaughy, 1979). Наилучшее время для получения биопсийного материала - 18-25-й день после осеменения. Материал из задней части влагалища или шейки матки не позволяет получить удовлетворительные результаты.

Под микроскопом студенты изучают заранее приготовленные гистологические препараты.

ЛИТЕРАТУРА

1. Валюшкин К.Д., Г.Ф. Медведев. Акушерство, гинекология и биотехника размножения животных: Учеб. - Мн.: Ураджай, 1997. - 718 с.: ил.
2. Практикум по акушерству, гинекологии и искусственному осеменению сельскохозяйственных животных / В.С. Шипилов, Г.В. Зверева, И.И. Родин, В.Я. Никитин. - М.: Агропромиздат, 1988. - 335 с.: ил.
3. Заянчковский И.Ф., И.В. Смирнов. Практикум по искусственному осеменению сельскохозяйственных животных. М., "Колос", 1975. - 272 с.: ил.
4. Ветеринарное акушерство, гинекология и биотехника размножения. А.П. Студенцов, В.С. Шипилов, Ё.А., Никитин В.Я. и др. - М.: Колос, 1999. - 495 с.: ил.
5. Акатов В.А., Г.А. Кононов, А.И. Пospelов, И.В. Смирнов. Ветеринарное акушерство и гинекология. Под ред. проф. Г.А. Кононова. Л.: Колос, 1977. - 656 с.: ил.
6. Балашов Н.Г. Ветеринарный контроль при искусственном осеменении животных. - М.: Колос, 1980. - 272 с.: ил.
7. Воскобойников В.М., Валюшкин К.Д., Терешенков А.С. Борьба с яловостью коров. - Минск: Ураджай, 1976. - 192 с.
8. Шипилов В.С. Основы повышения плодовитости животных. Смоленск, ред.-издат. агенство "DELO". 1994. 160 р.
9. Солсбери Г.У., Ван Демарк Н.Л. Теория и практика искусственного осеменения коров в США. Перевод с англ. Под ред. и с предисловием В.К. Милованова. М., изд-во "Колос", 1966. 527 с.
10. Полянцев И. И., Синявин А. Н. Акушерско-гинекологическая диспансеризация на молочных фермах.- 2-е изд., перераб. и доп.- М.: Росагропромиздат, 1989 г. - 176 с.: ил.
11. Заянчковский И. В. Задержание последа и послеродовые заболевания у коров. Издательство "Колос", Москва, 1964. 384 с.
12. Инструкция по искусственному осеменению и воспроизводству стада в скотоводстве. - Минск, 1999. - 88 с.: ил.
13. Инструкция по взятию, оценке и замораживанию спермы быков-производителей на племпредприятиях. - Жодино, 1998. - 37 с.
14. Инструкция по трансплантации эмбрионов крупного рогатого скота. - Москва, 1987. 92 с.: ил.
15. The artificial insemination and embryo transfer of dairy and beef cattle (including information pertaining to goats, sheep, swine, and other animals). A handbook and laboratory manual. H.A. Herman, Jere R. Mitchel, Gordon A. Doak. 1994. - 382 p. ISBN 0-8134-2969-2.
16. Bearden H.Joe, John W. Fuquay. Applied Animal Reproduction. - 3rd ed. 1992, p. 352. ISBN 0-13-040346-6.
17. Veterinary Reproduction & Obstetrics. Geoffrey H. Arthur, David E. Noakes, Harold Pearson, Timothy J. Parkinson. Seventh Edition. 1996 W.B. Saunders Company Ltd. 726 p. ISBN 0-7020-1785-X.
18. Veterinary endocrinology and reproduction. L.E. McDonald; N.H. Pineda. - 4th ed. 1989, 571 p. ISBN 0-8121-1134-6.

