

# Искусственное Осеменение Коз

Алехандро Гиббонс  
Марсела Куэто  
Марина Вольф



▪ **Издание**

Национальный институт  
сельскохозяйственных технологий



Департамент животноводства  
Отдел размножения животных и генетики

## ИСКУССТВЕННОЕ ОСЕМЕНЕНИЕ КОЗ

Алехандро Гиббонс, PhD  
Марсела Куэто, PhD  
Марина Вольф, биохимик

Опытная станция Барилоче  
Национальный институт сельскохозяйственных технологий  
Аргентина

Переводы:

с испанского на английский - Д-р Рогелио Клейтон в декабре 2009 г.

с английского на русский – Г-н Ахрор Аскарров в мае 2010 г.

профинансированы Грантом ИФАД 1107 – ИКАРДА «Повышение уровня жизни мелких фермеров и сельских женщин через переработку с добавленной стоимостью и экспорт кашемира, шерсти и мохера»

## СОДЕРЖАНИЕ

Введение .....	4
Анатомия и воспроизводство поголовья коз .....	4
Выявление эструса.....	6
Контролируемое размножение .....	7
Обращение со спермой и ее исследование .....	7
Искусственное осеменение .....	8
Синхронизация эструса(течки) .....	9
Обращение со свежей спермой.....	11
Обращение с замороженной спермой .....	12
Цервикальное искусственное осеменение .....	12
Лапароскопическое искусственное осеменение .....	14
Хранение спермы в замороженном состоянии .....	15

## **Введение**

Искусственное осеменение (ИО) представляет собой метод введения собранной и фракционированной спермы в половые пути самок. В основном данный метод используется для распространения желаемых продуктивных качеств самцов, имеющих высокую генетическую ценность, в любое время года.

Следует учесть, что искусственное осеменение является лишь инструментом в рамках программы генетического улучшения поголовья скота.

Технология использования замороженной спермы способствует дальнейшему распространению генов. Кроме того, в этом случае возможно хранение генов в течение неограниченного периода времени.

Использование замороженной спермы может способствовать существенному генетическому улучшению поголовья скота во всем мире за счет значительного увеличения притока генетического материала от племенных особей к обычным особям. Кроме того, уже налажен процесс транспортировки спермы по всему миру, что позволяет избегать перемещения самцов и снизить санитарный риск.

## **Анатомия и воспроизводство поголовья коз**

Базовое понимание строения половых органов и физиологии самок коз позволит лучше понять дальнейшее содержание документа.

Репродуктивная (половая) система состоит из: яичников, яйцеводов, матки и влагалища. Ооциты или яйцеклетки берут начало в яичниках. Яйцеводы представляют собой маленькие каналы, направляющие ооциты навстречу сперматозоидам с целью осуществления оплодотворения. Затем за счет последовательного деления клетки формируется эмбрион, и он спускается вдоль яйцевода в матку, где развивается беременность.

Анатомическая дифференциация матки, шейки матки, соединенной с влагалищем, требует дальнейшего рассмотрения методов искусственного осеменения. Влагалище является репродуктивным органом самки, и оно заканчивается наружными половыми органами (вульвой). Самки коз, еще не производившие потомство в своей жизни, имеют фиброму, называемую девственной плевой, которая может быть обнаружена путем введения пальца во влагалище. Как правило, при родах происходит ее разрыв, что может служить в качестве признака первых родов самки.

Козы относятся к сезонным производителям. Начало и продолжительность репродуктивного периода зависит от их географического расположения; он дольше в тропических регионах и уменьшается с увеличением широты. Другими факторами, влияющие на

репродуктивную активность, являются окружающая среда, порода и питание.

Поведение во время эструса (течки) у коз носит циклический и сезонный (осень-зима) характер. Временной интервал между периодами эструса называется «половым или эстральным циклом», и обычно он длится от 19 до 21 дня.

Эстральный цикл состоит из четырех периодов. Проэструс - это день до начала эструса. Во время этого короткого периода козы ведут себя беспокойно и уклончиво в отношении повторяющихся садок со стороны самцов. Из внешних признаков налицо опухшая и красноватая вульва, из которой выходит слизь, более заметная у взрослых самок, чем у молодых.

Последующий период, эстральный период, характеризуется значительными изменениями в сексуальном поведении; в течение этого периода самки соглашаются оплодотворяться несколько раз. В то же время внешние признаки во влагалище становятся более очевидными. Этот период длится от 18 до 63 часов, но чаще от 24 до 36 часов. Следует учесть, что эструс у молодых животных менее заметен и непродолжителен.

После окончания эструса начинается период, известный как метаэструс, в течение которого обычно происходит овуляция. Последним периодом цикла является диэструс, который продолжается до тех пор, пока у козы не начнется новый половой цикл, если только она уже не беременна.

Ранее описанный эстральный цикл регулируется 4 гормонами, фолликулостимулирующим гормоном (ФСГ) и лютеинизирующим гормоном (ЛГ), образующимися в железе в гипофизе мозга (питуитарная железа), наряду с эстрогеном и прогестероном, производимыми яичниками.

ФСГ стимулирует развитие фолликулов яичников и производство ооцитов, а ЛГ участвует в заключительной стадии роста фолликула и последующей овуляции.

Эстроген выделяется зрелыми фолликулами и его инкремент вызывает эстральное поведение и согласие на спаривание.

После овуляции, формируется лютеиновое тело, которое, в свою очередь, производит прогестерон для поддержания беременности в случае, если самка беременна. Если это не так, то лютеиновое тело постепенно теряет свою биологическую активность, и новый эструс наступает через 19-21 дней после овуляции. Этот процесс продолжается в течение репродуктивного периода и прерывается только беременностью, болезнью или недостаточным питанием.

Наконец, существует также окситоцин, гормон, вырабатываемый гипофизом, для обеспечения транспортировки спермы в половых путях самок и стимулирования первоначальной выработки молока.

Что касается самцов, то они способны к оплодотворению в течение всего года, хотя наблюдаются сезонные колебания в половой активности (либидо) и качестве спермы. Осенью, во время репродуктивного сезона, половой потенциал повышается, хотя и подвергается тем же модулирующим факторам, что упомянуты выше в отношении самок.

У самцов, ФСГ участвует в выработке спермы, в то время как ЛГ действует на семенники, тем самым стимулируя выработку андрогенов (тестостерон), а вместе они способствуют созреванию сперматозоидов.

Тестостерон влияет на половую деятельность или либидо, вторичные половые признаки и половое поведение самцов.

Наличие знаний в области репродуктивной активности у коз позволит оператору правильно проводить ручное спаривание или искусственное осеменение.

Некоторые моменты, которые необходимо учитывать в отношении ручного спаривания или искусственного осеменения:

- В течение периода размножения эструс случается каждые 19- 21 дней.
- У большинства самок коз эструс продолжается (соглашаются на спаривание) от 18 до 36 часов.
- Овуляция обычно происходит между 6 часами до и 12 часами после завершения эструса (самки отвергают оплодотворение).

## **Выявление эструса**

Процесс определения эструса может включать в себя проведение работ в загоне или полевые работы. В первом случае работы проводятся одновременно с несколькими животными (от 20 до 25 самок с 2 пробниками или самцов на поводке в загоне), с учетом того, что эструс у молодых самок может проходить незамеченным, так как он не столь очевиден. Хорошей практикой является смена самцов, предназначенных для обнаружения течки, если они не проявляют должной половой заинтересованности. Выявление эструса, проводимое утром, должно начинаться тогда, когда стадо уже не подвержено холодным температурам.

Полевые работы или групповое спаривание предполагает использование пробников с маркированной шкурой или грудью, окрашенной ферритом. Соотношение самцов к самкам должно составлять 1 к 20.

## Контролируемое размножение

Для определения производителя потомства могут быть использованы два метода:

- Ручное спаривание: как только у самки обнаружен эструс, только одна садка будет достаточна для обеспечения беременности.
- Программа искусственного осеменения: осеменение проводится через 12 часов после обнаружения эструса. Оно может быть повторено каждые 12 часов до тех пор, пока самка соглашается на оплодотворение пробником или самцом на поводке.

## Обращение со спермой и ее исследование

Оценка репродуктивной функции самцов включает в себя их способность оплодотворять самок и эякулировать плодовитые сперматозоиды.

При запуске программы сбора спермы для ее использования в качестве свежей или замороженной спермы или для проведения анализа спермы должны учитываться вопросы питания и санитарии самцов, а также требуется проведение их клинического обследования.

Наиболее рекомендуемым методом для сбора спермы является использование «искусственной вагины»; обеспечение тепловой (температура) и механической (давление) стимуляции для того, чтобы спровоцировать эякуляцию. Она состоит из внешней жесткой части, например термической полипропиленовой трубы (17 см x 5,5 см), с внутренней отделкой латексом. Последнее сложено и закреплено на концах внешней трубки при помощи резиновой ленты с целью создания герметичного отсека для воды. стакан для сбора спермы помещается на одном конце вагины.

Искусственная вагина на две трети заполняется горячей водой (50°C или выше), в зависимости от потери тепла при его неиспользовании, с тем, чтобы внутренняя температура вагины во время эякуляции составляла около 38-40°C. Завершающее кондиционирование вагины включает в себя введение воздуха в водяную рубашку с целью получения внутреннего вагинального диаметра около 1 см.

Сбор спермы производится в чистой, не содержащей пыли среде. Препуциум (крайняя плоть) промывается физиологическим раствором, а волосы с крайней плоти сбриваются с целью снижения вероятности загрязнения спермы.

Самцы коз обычно с легкостью адаптируются к эякуляции в искусственной вагине. Метод требует перемещения пениса вручную, когда животное спаривается с иммобилизованной самкой. стакан для сбора спермы должен быть защищен от резких изменений температуры в

течение всей операции и до помещения на водяную баню при температуре 36°C.

Когда самцы не соглашаются оплодотворять самок, последним может быть сделана внутримышечная инъекция 0,5 мл эстрадиола ципионата (escr estradiol, König, Аргентина). У обработанных самок эструс проявляется на 48 часов позже. Необходимо повторять дозу каждый второй день с целью поддержания вызывания эструса.

После начала сезона сбора спермы, в случае, если животные не проявляют половую активность, удобным представляется откладывание первой эякуляции для замораживания. Это помогает избавлению от старых запасов спермы. Но если самцы участвовали в спаривании, то рекомендуется пауза в половой активности продолжительностью в одну неделю до начала сбора спермы.

Самцы коз могут проявлять половую активность в течение всего года, хотя их способность обслуживать самок (количество самок, слученных в день), а также качество спермы ниже весной и летом, чем осенью.

Частота сбора спермы зависит от каждого конкретного животного. При осуществлении программы замораживания спермы рекомендуется проведение 1 или 2 сборов спермы в день в течение 4-5 последовательных дней; затем должны следовать 2 или 3 дня отдыха.

После получения спермы она должна быть помещена на водяную баню при температуре 36°C; записываются объем, плотность и цвет. Помещение небольшой капли на заранее нагретое предметное стекло может быть осуществлено для оценки массового движения или подвижности сперматозоидов и, следовательно, оценки процента живых сперматозоидов и их силы. Объем, процент живых сперматозоидов и концентрация семенной жидкости варьируются между отдельными особями и даже между эякуляциями одного и того же животного. Средними значениями для эякуляции коз являются: 1 см<sup>3</sup>, 85% и 3500 млн. сперматозоидов на 1 миллилитр, соответственно.

## **Искусственное осеменение**

Программы искусственного осеменения и генетического улучшения обычно осуществляются путем использования особей с выдающимися генетическими данными или ядра. До включения животных в программу осеменения должны быть приняты во внимание следующие относящиеся к питанию, санитарные и репродуктивные факторы:

- Самки должны иметь оценку состояния организма (СО) по меньшей мере равную 2 во время осеменения. Состояние организма является субъективным значением, измеряющим объем жира, находящегося в поясничных мышцах ниже поясничного позвонка (максимум - 5, минимум - 0).

- Самки должны быть не больными и не заражены паразитами.
- Детеныши должны быть отлучены от матери за 6-8 недель до осеменения.
- «Старые» животные и те, кто имеет проблемы с выменем (слепые соски, разрывы вымени, мастит), а также те, кто не смог забеременеть в течение двух лет подряд, должны быть исключены.

## Синхронизация эструса

Методы синхронизации эструса доказывают свою большую полезность при ручном спаривании, групповом спаривании или искусственном осеменении. Они значительно упрощают процесс обращения с животными, так как становится ненужным наблюдать за ними ежедневно в течение 21 дня с целью выявления нормального эструса. Эти методы делятся на 1) естественные и 2) фармакологические методы.

1) Естественные методы. В Патагонии, где производители содержат самцов отдельно от самок в период размножения, введение самцов в стадо в начале периода спаривания приводит к высокой концентрации эструса у самок (около 50-60%) между 8 и 12 днями после их внедрения. Такой сексуальный возбудитель известен как «эффект самца» и может быть использован в качестве «естественного и экономичного метода синхронизации эструса» как для ручного спаривания, так и для искусственного осеменения. Эструс, случившийся ранее, как правило, оказывался низкой фертильности, и у небеременных самок повторялась течка, уже фертильная, через 5-7 дней. После такого периода усиленного эструса наблюдается течка от 0 до 3% в день с хорошим уровнем фертильности.

«Эффект самца» может быть использован в сочетании с другими методами синхронизации эструса в начале сезона размножения. Это гарантирует то, что у всех самок будет цикл, когда начнется гормонотерапия.

Введение самцов в стадо должно проводиться примерно за 20 дней до проведения мероприятий по синхронизации эструса.

2) Фармакологические методы. Они дают преимущество сосредоточения высокой доли эструса в течение короткого периода времени, что облегчает планирование и осуществление деятельности по искусственному осеменению.

Интравагинальные губки с прогестагенами имитируют выделение желтого тела (*corpus luteum*), за счет медленного высвобождения прогестерона. Они помещаются во влагалище козы на срок от 15 до 17 дней, период времени, совпадающий со средней продолжительностью жизни желтого тела.

Этот метод создает интенсивную концентрацию эструса и позволяет осуществлять *спланированное по времени искусственное осеменение*,

т.е. проведение искусственного осеменения по истечении определенного периода времени после окончания гормонотерапии. Он также позволяет концентрировать эструс вне рамок репродуктивного сезона, и, следовательно, позволяет производить потомство вне сезона.

Поскольку существует некоторая доля самок, которые не реагируют на проведенную терапию или у которых не наблюдается синхронизированная овуляция, а также измененная транспортировка спермы из-за использования прогестагенов, то рекомендуется использование интравагинальных губок в сочетании с дозой хорионического гонадотропина жеребой кобылы (eCG). Он вводится внутримышечно при выводе прогестагена при использовании во время сезона размножения; и за 48 часов до вывода прогестагена при использовании во время периода анэструса.

Синхронизация эструса и овуляций приводит к результату. Дозы eCG варьируются от 200 до 400 единиц в зависимости от массы тела, породы и времени года. Рекомендуется начинать с минимальной дозы. Высокие дозы eCG влекут за собой риск получения многоплодной беременности, что приводит к серьезной потере животных вследствие перинатальной смертности.

Интравагинальные губки могут также сочетаться с методом «эффекта самца» вместо применения eCG. В этом случае самцы вводятся в стадо за 48 часов до удаления губок.

#### *Размещение и удаление губок*

1. До введения губок рекомендуется обрызгать их снаружи антибиотическим аэрозолем, не содержащим кортикоид.
2. Сожмите губку и введите ее в скошенную кромку накладывателя, убедившись в том, что веревка остается висеть снаружи.
3. Стержень помещается в накладыватель через свободный конец до того места, пока он не коснется губки.
4. Накладыватель увлажняется снаружи вазелином.
5. С целью облегчения процесса размещения губки рекомендуется, чтобы самка находилась в естественном положении. Накладыватель и стержень вводятся осторожно в нижнюю часть влагалища.
6. Накладыватель удаляется на 3-4 см, сохраняя стержень на месте, до освобождения губки.
7. Необходимо отрезать веревку губки таким образом, чтобы она находилась на расстоянии 2-3 см от влагалища самки (чтобы избежать потери губки).

Для удаления губки крепко но осторожно потяните веревку назад, с легким наклоном вниз. Если веревка не видна в каком-либо животном, рекомендуется проверить, чтобы губка не находилась в глубине влагалища, с помощью влагалищного зеркала (кольпоскопа).

Размещение губки не рекомендуется, когда речь идет о молодых козах, которые еще не рожали, так как разрыв девственной плевы при введении губки приведет к налипанию боковых частей губки к внутренним стенкам влагалища при удалении губки. Альтернативой является разрыв девственной плевы с помощью накладывателя губки и размещение губки через неделю.

Стоимость синхронизации эструса с помощью использования губок и eCG составляет около 1 доллара на одну козу.

В случае ангорских коз, 60 мг медроксипрогестерона ацетата (MAP) использовалось в течение 17 дней в сочетании с методом «эффекта самца» (4% пробников в течение 48 часов), до удаления губки. В общей сложности у 80-90% самок наблюдался эструс между 24 и 72 часами после удаления губки.

Существует альтернативный вариант этого метода, который позволяет сократить временной интервал между введением и удалением губки до 11 дней. Для него требуется применение 100 мг клопростенола (простагландинов) и соответствующей дозы eCG, за 48 часов до удаления пессариев (маточных колец). Применение простагландинов на 9 день после введения губки сокращает биологическую активность желтых тел, которые по-прежнему функциональны.

### **Обращение со свежей спермой**

Искусственное осеменение свежей спермой означает немедленное использование полученного эякулята путем помещения его в половые пути самок. После проведения анализа спермы и удостоверения в ее пригодности, а именно соответствия минимальным требованиям для использования, она может быть разбавлена либо разделена на фракции для получения 100 миллионов сперматозоидов на одну дозу, в объеме не превышающем  $0,25 \text{ см}^3$  на одну дозу. Так, например, эякулят, содержащий 3000 млн./ $\text{см}^3$  сперматозоидов, может быть использован для оплодотворения 30 самок.

Сперма может быть использована в чистом виде без разбавления из расчета  $0,03 \text{ см}^3$  на одну козу ( $1 \text{ см}^3/30$ ) или в разбавленном виде путем добавления 10% коровьего снятого молока. Разбавление увеличивает сохранность спермы (в качестве информации: примерно 1 час между получением эякулята и последним осеменением). Кроме того, в этом случае легче осуществлять дозировку. Например в случае значений, указанных выше, и добавления  $2 \text{ см}^3$  разбавителя, получают 30 доз для осеменения по  $0,1 \text{ см}^3$  на одно животное.

Разбавитель предварительно подогревают до  $92-94^\circ\text{C}$  в течение 10 минут, чтобы инактивировать сперматолитический фактор – лактенин – присутствующий в белковой фракции молока. Затем его охлаждают до  $28-30^\circ\text{C}$  и добавляют к эякуляту, разливая по стенкам трубки и смешивая колебательными движениями.

Очень важно определять подвижность сперматозоидов через каждые 5 или 6 осеменений. Это гарантирует то, что общая плодовитость сохраняется на прежнем уровне и не претерпела каких-либо изменений в результате незамеченных технических случайностей (перемешивания с водой, тепловой нагрузки и т.д.).

Свежая разбавленная сперма козла, охлажденная до 5°C, не должна храниться более 8-12 часов, так как она теряет свою оплодотворяющую способность. Разбавитель готовят при помощи 10% снятого молока, 1% глюкозы и добавления небольшого количества антибиотиков. Контрольные дозы охлажденной спермы для осеменения содержат 150 миллионов сперматозоидов на козу.

### **Обращение с замороженной спермой**

Размораживание замороженной спермы осуществляется при температуре 36°C. После размораживания ее следует быстро использовать. Если сперма была заморожена в виде гранул, то размораживание может быть осуществлено в сухих гемолитических пробирках, подогретых до указанной температуры, на водяной бане.

Дозы, замороженные в соломинках, размораживают непосредственно на водяной бане. Через 30 секунд соломинки вынимаются из ванночки и высушиваются одноразовым бумажным полотенцем. Оба конца отрезаются для выпуска спермы в гемолитическую пробирку. Важно, чтобы контейнеры не поднимались выше открытого конца термоса с жидким азотом в процессе процедуры размораживания.

Следует учитывать, что действия, связанные с искусственным осеменением, должны проводиться в среде с кондиционированным воздухом при температуре 25°C.

Термос с жидким азотом имеет двойные стенки (внешнюю-внутреннюю), разделенные вакуумом, для сохранения холодной температуры. Внутри термоса температура стабильная, пока поддерживается минимум 12-14 см азота. Для определения количества содержимого используется деревянная линейка, окрашенная в черный цвет. Линейку погружают на 30 секунд, вынимают и трясут до появления белого замерзшего слоя, и высота этого замерзшего слоя соответствует уровню жидкого азота. Следует учитывать, что при уменьшении объема возрастает потеря азота при испарении.

Особенное внимание следует обращать при использовании жидкого азота, так как прямой или косвенный контакт с такими низкими температурами может вызвать серьезные травмы.

### **Цервикальное искусственное осеменение**

У коз, в отличие от овец, цервикальное искусственное осеменение может быть осуществлено с использованием как свежей, так и

замороженной спермы. Из-за трудностей, возникающих при внедрении оболочки для осеменения через шейку матки, помимо сокращения жизнеспособности сперматозоидов в результате замораживания и размораживания, необходимо увеличение числа сперматозоидов на дозу при использовании замороженной спермы по сравнению со свежей спермой (200 и 100 миллионов сперматозоидов соответственно).

Место, где проводится осеменение, должно быть чистым и свободным от воздушных потоков, температура должна составлять 20-25°C. Самки заключаются как можно быстрее в загон или коридоры для скота, в стоячем положении, чтобы избежать ненужного стресса. Коридоры могут быть построены на полу сарая или приподняты над полом на более удобную высоту для осеменителя. Метод, позволяющий обеспечить наиболее удобное расположение коз для цервикального осеменения, называется методом «над перилами». Самки представляются для цервикального осеменения ассистентом, стоящим в коридоре и поднимающим задние конечности животного над перилами.

Вульву очищают одноразовым бумажным полотенцем, и небольшое количество вазелина наносится на влагалищное зеркало для облегчения введения. В то время как одна рука держит хвост животного, другая медленно вводит влагалищное зеркало в спинном направлении (животного). После введения внутрь на несколько сантиметров его необходимо направить горизонтально в нижнюю часть влагалища. Шейка матки может быть обнаружена посредством мягкого манипулирования влагалищным зеркалом в сторону или вниз. Если присутствует обильная слизь, то ее можно абсорбировать и удалить с помощью пластиковой пипетки или шприца. Когда это сделано, помощник передает сперму.

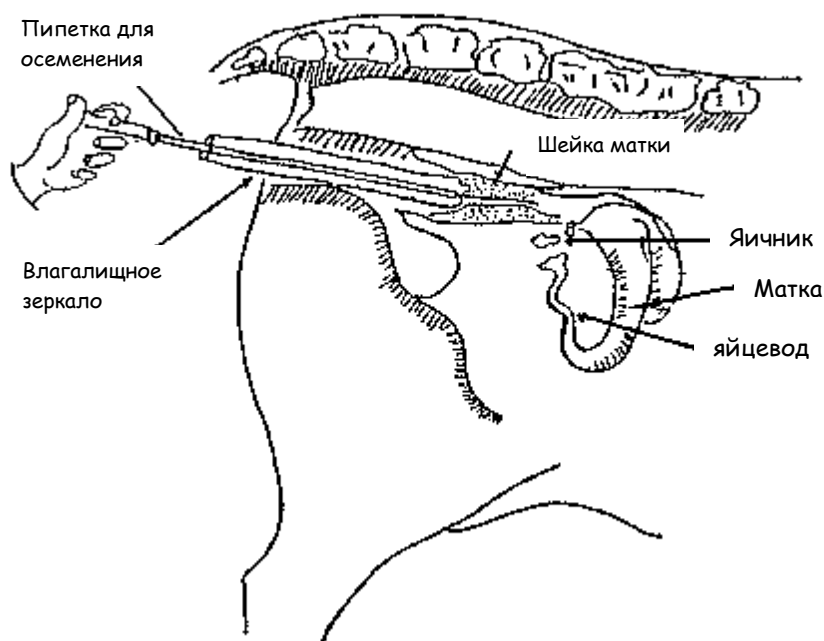


Рисунок А. Цервикальное искусственное осеменение.

После введения спермы желателно, чтобы козы оставались в положении осеменения в течение 2 или 3 минут, а затем были помещены в загон рядом с самцами на несколько часов.

В случае молодых самок процесс введения влагалищного зеркала является очень травмирующим. Поэтому предпочтительнее осуществлять искусственное осеменение только путем введения пипетки для осеменения в вульву и выброса спермы в нижнюю часть влагалища.

### Лапароскопическое искусственное осеменение

Эндоскопия выполняется путем введения оптической системы в организм животного через брюшной прокол; гибкий световод дает свет, позволяя рассматривать внутренние органы не прибегая к хирургии.

Когда проводится искусственное осеменение, данный метод известен как лапароскопия, так как он позволяет наблюдать внутренние половые органы через брюшную стенку. Небольшие отверстия делаются троакаром рядом с молочной железой, и доза спермы вводится через них. Осеменение состоит из введения половины дозы спермы в каждый рог матки с помощью пипетки с тонкой иглой на одном конце (рис. В).

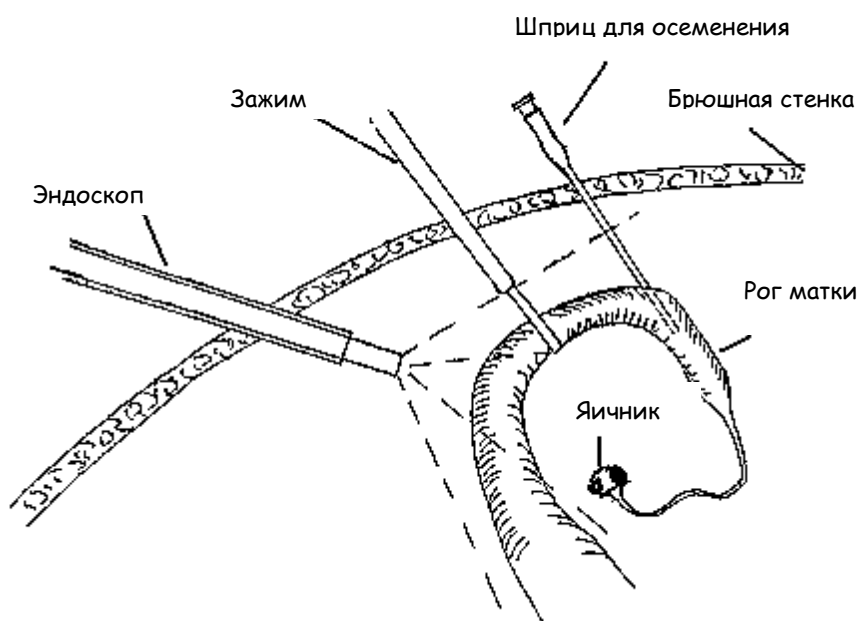


Рисунок В. Лапароскопическое искусственное осеменение.

Данный метод осеменения посредством лапароскопии широко используется в отношении овец из-за низкого уровня беременности, получаемой при использовании замороженной спермы посредством цервикального осеменения (20-35%). Это связано с трудностями переноса шейки матки овцы с помощью пипетки для осеменения.

У коз он используется для двойной цели: для увеличения частоты наступления беременности, чем получаемой с помощью цервикального искусственного осеменения, а также для снижения количества сперматозоидов в каждой дозе для осеменения.

СПЕРМА	ПОСРЕДСТВОМ	ДОЗА	ИСКУССТВЕННОЕ ОСЕМЕНЕНИЕ	БЕРЕМЕННОСТЬ
СВЕЖАЯ	Цервикальный метод	100 мл	После выявления эструса	60-70%
ЗАМОРОЖЕННАЯ	Цервикальный метод	200 мл	После выявления эструса	50% (±10%)
	Лапароскопический метод	50 мл	Спланированное искусственное осеменение* После выявления эструса Спланированное искусственное осеменение**	55% (±10%)

\* через 45 часов после удаления губок с прогестагенами

\*\* через 55 часов после удаления губок с прогестагенами

### Хранение спермы в замороженном состоянии

Процедура замораживания спермы коз выглядит следующим образом:

#### а) Подготовка разбавителя спермы

Снятое порошкообразное коровье молоко разводят в дистиллированной воде (10%), например берут 50 мл дистиллированной воды на 5 г снятого молока. Разбавитель выдерживают при 92-94°C на водяной бане в течение 10 минут. После этого его охлаждают до 36°C и добавляют 1% глюкозы (например 0,5 г глюкозы на 50 мл разбавителя), пенициллин и стрептомицин (1000 единиц и 1 мг на 1 мл разбавителя соответственно). Получившийся объем делят на две равные части: РАЗБАВИТЕЛЬ А без добавления глицерина и РАЗБАВИТЕЛЬ В с добавлением 12% глицерина. Так, например, на 25 мл разбавителя В добавляют 3 мл глицерина. Глицерин подогревают и добавляют в разбавитель в горячем виде для получения хорошей однородности массы. Разбавитель А хранят при лабораторной температуре, а разбавитель В помещают в холодильник при 5°C (Очень важно: температура в холодильнике не должна опускаться ниже 5°C).

Если работы проводятся в жарких условиях, то удобно помещать раствор А в холодильник, чтобы избежать его превращения в кислоту, а затем подогревать его непосредственно перед использованием. рН-фактор разбавителя должен быть в пределах между 6,8 и 7,2.

#### б) Сбор и оценка спермы

Сперму, собранную в искусственную вагину, держат на водяной бане при температуре 36°C для проведения ее оценки. Каплю спермы на предметном стекле помещают на теплую поверхность на микроскопе и

рассматривают при 100-кратном увеличении. Понятие качества спермы оценивается по силе волнообразных движений (подвижности сперматозоидов) на основе того, как формируются и исчезают волны. Подвижность оценивается по субъективной шкале (минимальная: 0; максимальная: 5) на основании силы движения. Сперму замораживают только тогда, когда подвижность сперматозоидов равна или превышает 4.

Сперму необходимо постоянно защищать от резких изменений температуры, от контакта с водой или прямой солнечной радиацией, от попадания примесей. Таким образом, все материалы должны быть чистыми, сухими и поддерживаться на уровне температуры спермы.

### с) Определение концентрации сперматозоидов

Этот процесс осуществляется в камере Neubauer. При загрузке камеры для подсчета сперматозоидов, должны быть предприняты следующие шаги:

- Прилепите крышку предметного стекла к камере путем увлажнения краев вазелином или слюной, плотно прижимая ее к камере. При достижении хорошего слипания, из-за дифракции света по краям крышки появятся «Кольца Ньютона».
- Наберите (аспирируйте) сперму в красную корпускулярную модельную пипетку, у которой должен быть умеренный и совершенно сухой наконечник, пока не будет достигнута отметка 0,25.
- Очистите наконечник пипетки, стараясь не изменить уровень спермы.
- Аспирируйте разбавитель (это может быть обычная вода) до отметки 101.
- Закройте оба конца пипетки пальцами и осторожно потрясите горизонтально около 30 раз.
- Удалите первоначальные капли.
- Поместите наконечник пипетки на край крышки предметного стекла и дайте камере заполниться в соответствии с капиллярностью. Жидкость не должна превысить боковые углубления, не должны остаться пузырьки воздуха или пустое пространство.
- Подождите несколько минут до начала счета.

Камера также может быть заполнена микропипеткой, используя 5 микролитров спермы, разбавленных в  $2 \text{ см}^3$  воды.

Поместите камеру для ее изучения в микроскоп (имеющий от 100-кратного до 200-кратного увеличения). Если распределение сперматозоидов не является однородным, то повторите процесс загрузки. Количество сперматозоидов на большой площади (без внутренних разделений) считается на квадрант, и счет повторяется в случайно выбранном квадранте, пока в общем не будет подсчитано 5 квадратов. Концентрация сперматозоидов на  $1 \text{ см}^3$  рассчитывается путем умножения общей суммы в 5 квадратах на 12 800 000.

#### d) Центрифугирование спермы при помощи моющего раствора

Семенная плазма у коз имеет определенные особенности состава. Одним из них является наличие белковой фракции (BUIII), производимой бульбоуретральными железами, которая взаимодействует с молочным разбавителем и вызывает подавление подвижности сперматозоидов. Для того, чтобы избежать негативные последствия этой фракции, необходимо «промыть» сперму, отделить и удалить семенную плазму путем центрифугирования до этапа смешения спермы с разбавителем.

2,8% раствор натрия цитрата (2,8 г натрия цитрата в 100 мл дистиллированной воды) может быть использован в качестве моющего раствора. pH раствора должен быть от 6,8 до 7,2. Должен проводиться периодический контроль pH-фактора моющего раствора и разбавителя.

Для разбавления семенной жидкости добавьте 10 мл моющего раствора и центрифугируйте в течение 10 минут при скорости в 2000 об/мин. Удалите всплывающую жидкость пипеткой, а затем повторите операцию так, чтобы большая часть спермы, выпавшая в осадок в нижней части трубки центрифуги, была растворена в моющем растворе. Раствор натрия цитрата должен быть добавлен при той же температуре, что и температура спермы. Поэтому первое промывание осуществляется при 36°C, а второе, из-за снижения температуры во время центрифугирования, при 20-25°C (лабораторная температура).

#### e) Первое разбавление (добавление раствора А)

Объем разбавителя для добавления в сперму рассчитывается на основе показателей, содержащихся в приложении. Из-за удаления семенной плазмы после центрифугирования, 10% вычитается из общего числа сперматозоидов, рассчитанных в эякуляте (потеря сперматозоидов при удалении всплывающей жидкости). Разбавитель А добавляется при температуре 20-25°C.

#### f) Снижение температуры и время стабилизации при 5°C

Как только разбавитель А добавлен, разбавленная сперма охлаждается с температуры разбавления до температуры 5°C. Охлаждение производится со скоростью 2°C за 3 минуты. Разбавленная сперма должна оставаться при этой температуре в холодильнике в течение 45-60 минут перед добавлением разбавителя В.

#### g) Второе разбавление (добавление раствора В)

Разбавитель В добавляется 3 равными фракциями, с 10-минутными интервалами, и смешивается каждый раз до однородности. Рекомендуется помещать пипетку в холодильник до проведения разбавления. Через десять минут после добавления последней порции раствора В сперма готова к заморозке.

## h) Подготовка спермы к заморозке

Сперма может быть заморожена в соломинках в парах жидкого азота (при температуре  $-196^{\circ}\text{C}$ ) или в сухих ледяных гранулах (твердый диоксид углерода при температуре  $-79^{\circ}\text{C}$ ). Сперма, замороженная одним из этих двух методов, хранится в термосе с жидким азотом.

Процесс замораживания в гранулах легче, чем в соломинках, но последние легче использовать индивидуально и ими легче манипулировать во время искусственного осеменения.

Важно проводить замораживание в условиях низких температур, а также обеспечивать однородные дозы спермы для получения схожего семенного качества. Особое внимание требуется при определении различных партий.

### *1. Замораживание спермы в гранулах*

Для замораживания спермы в гранулах требуется блок сухого льда с плоской поверхностью. При помощи гвоздей, подогретых на пламени, на его поверхности формируются ячейки.

Сперму вынимают из холодильника на водяной бане при температуре  $5^{\circ}\text{C}$ . Другой контейнер с оставшимся разбавителем, в качестве хладагента, используется для хранения стеклянных пипеток при низкой температуре.

Как только сперма аспирируется в пипетку, по  $0,25$  мл ( $\pm 4$  капли) помещается в каждую ячейку, быстро и последовательно, стараясь не задерживаться более чем на минуту между первой и последней гранулой. Дозы спермы находятся там в течение 1-2 минут, пока их поверхность не станет непрозрачной. Затем они переносятся в термос с жидким азотом.

### *2. Замораживание спермы в соломинках*

Соломинки, поливинильный спирт и шприц с  $1,5$  см иглой хранятся в холодильнике до проведения замораживания. Соломинки заполняются посредством аспирации через тройной тампон (вата – поливинильный спирт – вата); при этом конец, свободный от тампона, помещается в сперму. Соломинки держат за тампонируемый конец (во избежание того, что тепло рук повлияет на качество спермы). Поливинильный спирт в тройном тампоне застудневает и герметизируется при прикосновении его к аспирированной спермой. Соломинки сушат при помощи поглощающей бумаги, и воздушное пространство длиной  $1,5$  см образуется на свободном от тампона конце при помощи шприца с соответствующей иглой. Этот конец затем герметично закрывается путем мягкого, вертикального постукивания по месту, содержащему поливинильный спирт. Затем соломинки немедленно погружаются в контейнер с водяной баней при температуре  $5^{\circ}\text{C}$ .

Необходим термически изолированный ящик с крышкой, размером примерно 39 см в длину, 34 см в ширину и 25 см в высоту. Также необходимы деревянные блоки, сетка, алюминиевая рама, размером 11 см, 7 см и 2 см соответственно. Алюминиевая рама на деревянных блоках и сетка достигнут, по отношению к нижней части ящика, 20 см в высоту (1 уровень). При удалении сетки высота алюминиевой рамы на деревянных блоках достигнет 9 см (2 уровень).

Жидкий азот наливают в ящик до достижения 6 см высоты от дна. Накройте его на несколько минут до окончания «закипания» и пока не охладится внутренняя часть. После просушки соломинок их располагают горизонтально на алюминиевой раме, при этом они не должны касаться друг друга.

Соломинки на раме помещают внутри ящика на 1-м уровне на 2 минуты. Затем ящик открывают и соломинки помещают на 3 минуты на 2-й уровень (после удаления деревянных блоков).

Наконец, соломинки выливают в жидкий азот и помещают в канистры в термос с жидким азотом.

#### i) Размораживание и оценка партии спермы

Сперма размораживается как описано выше (см.: Обращение с замороженной спермой). После оценки 10% замороженных доз решается вопрос принятия или непринятия партии. Должны быть выполнены несколько исследований одной и той же соломинки или гранулы.

Через 5 минут после инкубации при температуре 36°C подвижность сперматозоидов оценивается при 100-кратном увеличении с использованием разогретого предметного стекла над термической пластиной. Капля спермы помещается между нагретым предметным стеклом и крышкой для определения процента живых сперматозоидов и прогрессивной индивидуальной подвижности (скорость перемещения вперед живых сперматозоидов: минимум 0, максимум 5).

Для принятия семенной партии, соломинки или гранулы должны иметь:

- a) Масал-подвижность после размораживания.
- b) Долю живых сперматозоидов, превышающую 30%.
- c) Прогрессивную индивидуальную подвижность равную или превышающую 2,5.

#### j) Размораживание спермы для искусственного осеменения

Размораживание осуществляется на водяной бане при температуре 36°C. Содержимое каждой соломинки или гранулы выливается в гемолитическую пробирку и набирается в шприц для осеменения.

Приложение: Протокол по козам в отношении замораживания спермы

Номер самца	Объем эякулята	Концентрация сперм-в	Всего сперм-в	Всего сперм-в x 0,9	Количество доз	Общий объем	Объем разбавителя	Объем раствора А	Объем раствора В	Объем В/3
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11

1. Номер животного
2. Объем эякулята
3. Концентрация сперматозоидов
4. Общее количество сперматозоидов: Объем эякулята x Концентрация сперматозоидов
5. Общее количество сперматозоидов x 0,9
6. Количество доз для осеменения:  
Общее количество сперматозоидов x 0,9 / Количество сперматозоидов на дозу
7. Общий объем (эякулят + разбавитель): Количество доз для осеменения x Объем дозы
8. Объем разбавителя: Общий объем – Объем эякулята
9. Объем раствора А: Объем разбавителя / 2
10. Объем раствора В: Объем разбавителя / 2
11. Объем раствора В / 3