Оценка применения устройства для аппликации эмбрионов крупного рогатого скота при эмбриотрансфере

An effectiveness evaluation of the new device for embryo transfer in bonive cattle

Бригида А.В.

г. Москва

DOI CrossRef: 10.30917/ATT-VK-1814-9588-2018-3-9
УДК: 636.018

Ключевые слова: корова, реципиент, трансплантация, аппликация, эмбрион, приживляемость, стельность.

Key words: cow, recipient, transplantation, application, embryos, adhesion, pregnancy.

Резюме. Проведены исследования по оценке эффективности приживляемости эмбрионов крупного рогатого скота в зависимости от применяемых устройств для трансплантации эмбрионов. Животных разделили на две группы. Тёлкам из группы I пересадку нативных (n=126) и замороженно-оттаянных (n=198) эмбрионов проводили в среднюю треть рога матки с использованием жесткого шприца-катетера модификации Кассу, изготовленного под стандартные соломинки-пайеты объемом 0,25 или 0,5 мл. Животным из группы II (n=217) процедуру пересадки эмбрионов проводили с использованием устройства для аппликации эмбрионов крупного рогатого скота (Патент РФ на полезную модель: №154919). Пересадку проводили в среднюю треть рога матки (51 нативных и 42 замороженно-оттаянных эмбрионов) и в верхнюю треть рога матки (55 нативных и 69 замороженно-оттаянных эмбрионов). Показано, что при применении устройства для аппликации эмбрионов, разработанного в ФГБНУ "Центр экспериментальной эмбриологии и репродуктивных биотехнологий", приживляемость нативных и замороженно-оттаянных эмбрионов на 30-й день после пересадки составила 69,1% и 60,9% соответственно.

Summary. The goal of current work was to evaluate influence of different devices used for embryo transfer on pregnancy rates in cows. Animals were randomly assigned to two experimental groups. In group I fresh (n=126) or frozen/thawed (n=198) embryos were transferred into the middle of uterine horn of heifers using Cassouartificial insemination gun, which allows use of standard 0,25 or 0,5 mL cryostraws. Group II contained 217 animals. Embryo transfer in this group was conducted using a device for bovine embryo transfer (Patent of the Russian Federation RU No. 154919) developed by the authors. Embryos were transferred either into the middle of uterine horn (n=51 fresh and 42 frozen/thawed embryos) or into uterine horn near tubo-uterine junction (n=55 fresh and 69 frozen/thawed embryos). It was shown that on the 30th day after embryo transfer using the device for bovine embryo transfer

developed in Centre of experimental embryology and reproductive biotechnology pregnancy rates were 69,1% and 60,9 % for fresh and frozen/thawed embryos, correspondingly.

Введение

Трансплантация эмбрионов является биотехнологическим методом ускоренного воспроизводства крупного рогатого скота. Данная технология включает в себя ряд этапов [1], заключительным из которых, является перенос эмбриона в репродуктивные органы реципиента [2]. Этот этап является ключевым, так как от правильности подбора реципиента и техники пересадки эмбриона зависит эффективность и экономическая целесообразность применения всей технологии. Основным фактором, ограничивающим применение технологии эмбриотрансфера, является высокая вариабельность приживляемости эмбрионов в репродуктивном тракте реципиента [3].

Основными причинами, влияющими на результативность приживляемости эмбрионов, являются конструктивные особенности устройства, используемого для переноса эмбриона, место и глубина локализации имплантируемого в рог матки зародыша [4]. Место и глубина аппликации зародыша в роге матки реципиента при нехирургической пересадке вызывают особый интерес у трансплантологов.

Успех пересадки эмбрионов в значительной степени зависит от участка рога матки, в котором позиционируется эмбрион. Так, при закладке эмбриона в нижнюю или среднюю треть рога матки приживляемость зародыша колеблется в пределах 25–37,5 %, а при их трансплантации в верхнюю треть рога матки, результат может достигать 50% и более [4]. Вероятность наступления стельности связана с интенсивностью эмбрионального сигнала, получаемого маткой реципиента от эмбриональных клеток, с увеличением числа которых уровень стельности возрастает [2]. Данные показатели могут быть обусловлены местом расположения семидневного эмбриона в матке реципиента, и, как следствие, прямого его воздействия на стимуляцию гормона – опосредованной сигнальной системы, по механизму обратной связи [5].

Анатомо-физиологические особенности кровоснабжения участков матки и нейрогуморальной регуляции интродукционных процессов у коров имеют значимое влияние на развитие и последующую имплантацию пересаженного эмбриона [4]. На основании этого можно предположить, что оптимальным местом имплантации эмбриона является верхняя треть рога матки.

Как известно, пересадка эмбрионов у коров осуществляется хирургическим и нехирургическим путем. Опыт практического применения методов трансплантации как нативных, так и замороженно-оттаянных эмбрионов свидетельствует о наибольшей эффективности нехирургического способа. Наиболее часто при нехирургической пересадке эмбрионов применяют катетер Кассу или его модификации [6–8].

Результаты многочисленных исследований показывают, что при нехирургической пересадке большое значение имеет конструкция инструментов. Так, при прохождении катетера через шейку матки во время проведения процеду-

Информация об авторах / Information about the authors

Бригида А.В., заведующий отделом экспериментальной трансплантологии ФГБНУ "Центр экспериментальной эмбриологии и репродуктивных биотехнологий", Москва, Россия, brigida_86@mail.ru

Сорокин В.И., кандидат биологических наук, доцент ФГБОУ ВО "Оренбургский государственный аграрный университет" Оренбург, Россия, vis5256@yandex.ru

Ковальчук С.Н., кандидат биологических наук, директор ФГБНУ "Центр экспериментальной эмбриологии и репродуктивных биотехнологий", Москва, Россия, s.n.kovalchuk@mail.ru

Brigida A.V., Kovalchuk S.N., Sorokin V.I.

ры пересадки эмбрионов, повышается риск травмирования эндометрия, что может привести к выделению крови, а это пагубно влияет на эмбрион при их прямом контакте [9]. В связи с этим, большое внимание уделяется разработке устройств, способных элиминировать повреждение эндометрия матки и увеличить глубину проникновения устройства до оптимального физиологически-обусловленного места позиционирования эмбриона, аналогично естественному развитию зародыша соответствующего возраста и стадии развития [10].

В литературных источниках можно встретить и другой метод нехирургической пересадки эмбрионов – метод аппликации эмбрионов [11, 12]. Данный метод способен удовлетворить требования специалистов по проведению адресной пересадки эмбриона в точку, соответствующую естественному развитию одновозрастного зародыша, однако устройств, позволяющих проводить процедуру аппликации эмбрионов, попросту нет.

В связи с отсутствием устройства для аппликации эмбрионов и наличия явных недостатков катетера модификации Кассу, выражающихся в определенном пределе доступной глубины проникновения в рог матки по причине анатомической изогнутости рогов матки, в ФГБНУ "Центр экспериментальной эмбриологии и репродуктивных биотехнологий" было разработано устройство, позволяющее проводить процедуру трансплантации эмбрионов в верхнюю треть рога матки реципиента и элиминировать возможный травматизм эндометрия матки на всех ее участках [9].

Цель работы состояла в изучении влияния разных методов и инструментов для трансплантации эмбрионов на результат приживляемости зародышей у реципиентов.

Материалы и методы

Практические и научные исследования проводили в ООО "Научно-производственный центр "Инновационная ветеринария" и в ФГБНУ "Центр экспериментальной эмбриологии и репродуктивной биотехнологии" на базе отдела экспериментальной трансплантологии. Работы проведены на поголовье крупного рогатого скота в условиях промышленной молочной фермы ЗАО "Можайский", Можайский район Московской области, и ООО "Племзавод Димитровский", село Димитрово, Илекский район Оренбургской области, ОАО "Красноярскагроплем", поселок Солонцы, Емеляновский район, Красноярский край, с участием специалистов организаций.

В качестве реципиентов (n=541) отбирали клинически здоровых животных, не имеющих племенной и генетической ценности, а также беспородный скот, в возрасте 16–20 мес., с живой массой 340–400 кг, с крепкой конституцией и заводской упитанностью, с нормальным состоянием матки и яичников, установленных по результату ректогенитального обследования. При ректогенитальном обследовании реципиентов непосредственно перед пересадкой эмбрионов учитывали качество желтого тела полового цикла.

Все животные прошли обследование на инфекционные заболевания (бруцеллез, туберкулез, вирусные респираторные заболевания, лейкоз, трихомоноз, вибриоз, ящур и др.).

Синхронизацию половых циклов у реципиентов проводили препаратами аналогами ГнРг 5–10 мл в/м и P_gF2 α клопростенол в дозе 500 мкг на голову в/м. Для трансплантаций использовали нативные и замороженно-оттаянные семидневные эмбрионы, полученные методом *in vivo*, отличного качества на стадии развития – бластоциста. Пересадки проводили на седьмой день полового цикла реципи-

ента, при этом пересаживали по одному эмбриону каждому реципиенту в рог матки ипсилатерально желтому телу на яичнике 2-го и 3-го качества.

Пересадку эмбрионов проводили двумя способами: телкам из группы I пересадку нативных (n=126) и замороженно-оттаянных (n=198) эмбрионов проводили в среднюю треть рога матки с использованием жесткого шприца-катетера модификации Кассу, изготовленного под стандартные соломинки-пайеты объемом 0,25 или 0,5 мл. В краниальную часть рога матки пересадку эмбрионов не проводили по причине конструктивных особенностей катетера. Животным из группы II (n=217) процедуру пересадки эмбрионов проводили с использованием авторского устройства для аппликации эмбрионов крупного рогатого скота (патент РФ на полезную модель №154919). Пересадку проводили в среднюю треть рога матки (51 нативных и 42 замороженно-оттаянных эмбрионов) и в верхнюю треть рога матки (55 нативных и 69 замороженно-оттаянных эмбрионов). Диагностику стельности проводили на 30-й и 60-й день методом эхографической визуализации.

Результаты и обсуждения исследований

В таблице 1 представлены две группы эмбрионов. В группе I (n=324) трансплантацию 126 нативных эмбрионов проводили в среднюю треть рога матки, с использованием катетера модификации Кассу. В верхнюю треть рога матки пересадку эмбрионов не проводили, по причине конструктивных особенностей катетера. Из 126 пересадок нативных эмбрионов реципиентам, стельность диагностировали у 58 (46,0%) голов, при этом, на 30-й день после процедуры гомопластики зародышей, стельность, при повторной проверке на 60-й день, сохранилась у 55 (43,7%) реципиентов.

В группе II (n=217), где пересадку эмбрионов проводили с использованием устройства для аппликации эмбрионов, в среднюю треть рога матки была проведена 51 эмбриотрансплантация. Стоит отметить, что на 30-й день стельность была диагностирована у 24 (47,1%) реципиентов. При повторном обследовании на 60-й день стельность отмечалась у 22 (43,1%) животных. Устройством для аппликации эмбрионов также была проведена процедура пересадки нативных эмбрионов в верхнюю треть рога матки 55-ти реципиентам. На 30-й день стельность была диагностирована у 38 (69,1%) реципиентов, а на 60-й день при повторном обследовании стельность была подтверждена только у 35 (63,6%) животных.

В группе I (n=324) провели трансплантацию 198 замороженно-оттаянных эмбрионов стандартным катетером модификации Кассу в среднюю треть рога матки. Из 198 проведенных пересадок эмбрионов реципиентам показатель стельности на 30-й день составил 37,9%. При повторной диагностике на 60-й день стельность была зафиксирована у 71 (35,9%) реципиента.

В группе II (n=217) при использовании устройства для аппликации эмбрионов было проведено 42 процедуры трансплантации замороженно-оттаянных эмбрионов в среднюю треть рога матки. На 30-й день стельность установлена у 17 (40,5%) реципиентов, а при повторной процедуре на 60-й день – только лишь у 14 (33,3%) голов. При использовании устройства для аппликации эмбрионов процедура трансплантации замороженно-оттаянных эмбрионов была проведена 69 реципиентам в верхнюю треть рога матки. При этом, наступление стельности на 30-й день было зарегистрировано у 42 (60,9%) реципиентов и на 60-й день подтверждено у 40 (58,0%) голов.

Таблица 13. Сравнительная оценка эффективности различных методов трансплантации эмбрионов

Характеристика эмбрионов	Тип инструмента	Место локализации эмбриона в роге матки	Показатели		
			Кол-во гол. пересадок	Стельных голов на 30-й день, n/%	Стельных голов на 60-й день, n/%
Нативные	Катетер модификации Кассу	Средняя треть	126	58/46,0	55/43,7
	Устройство для аппликации эмбрионов	Средняя треть	51	24/47,1	22/43,1
	Устройство для аппликации эмбрионов	Верхняя треть	55	38/69,1	35/63,6
Замороженно-оттаянные	Катетер модификации Кассу	Средняя треть	198	75/37,9	71/35,9
	Устройство для аппликации эмбрионов	Средняя треть	42	17/40,5	14/33,3
	Устройство для аппликации эмбрионов	Верхняя треть	69	42/60,9	40/58,0

На основании полученных данных установлено, что результаты по пересадке эмбрионов катетером модификации Кассу и авторского устройства для аппликации эмбрионов с позиционированием имплантированных эмбрионов в средней трети рога матки достоверных отличий не имеют. Показатели стельности на 30-й день при трансплантации нативных и замороженно-оттаянных эмбрионов катетером модификации Кассу и устройством для аппликации эмбрионов, составили соответственно ($p > 0,05$) 46,0% и 47,1% и ($p > 0,05$) 37,9% и 40,5%.

Представленные данные свидетельствуют о том, что при пересадке нативных эмбрионов в верхнюю треть рога матки реципиента показатель стельности, диагностированной на 30-й день достоверно ($p \leq 0,05$) возрастает до 69,1% по сравнению с пересадкой в среднюю треть рога катетером модификации Кассу (47,1%). Аналогичная закономерность наблюдалась и при трансплантации замороженно-оттаянных эмбрионов, где показатели равны 60,9% против 37,9% ($p \leq 0,05$), соответственно. Во время проведенных исследований были зафиксированы незначительные потери стельностей в период с 30-го по 60-й день. Эмбриональная гибель отмечалась во всех группах реципиентов и не зависела от применяемых методов пересадки и места позиционирования эмбриона в роге матки реципиента. На более высокий уровень стельности у реципиентов был зафиксирован в группе II, где пересадку нативных эмбрионов проводили в верхнюю треть рога матки при использовании устройства для аппликации эмбрионов.

Таким образом, разработанное в ФГБНУ "Центр экспериментальной эмбриологии и репродуктивных биотехнологий" устройство для аппликации эмбрионов позволяет осуществить адресную доставку эмбриона с уровнем приживляемости на 30-й день после пересадки нативных и замороженно-оттаянных эмбрионов 69,1% и 60,9%, соответственно. Оптимальным местом имплантации эмбрионов крупного рогатого скота является краниальная часть рога матки. Разработанное устройство является высокоэффективным инструментом для трансплантации нативных и замороженно-оттаянных эмбрионов коров и может успешно применяться в практике эмбриотрансфера.

Литература

1. Petroman, I. Utilization of gestagen hormones and pituitary FSH extracts in inducing the superovulation at embryo donor cows. / I. Petroman, N. Pacala, C. Petroman, et. all. // Journal of food Agriculture & Environment. - 2009. - Vol. 7, №2. - P. 193-195.
2. Воронин, Е.С. Иммунология. /Е.С. Воронина, А.М. Петров, М.М. Серых, Д.А. Девришов. - М.: Колос-Пресс, 2002. - С-340-359.
3. Sanchez, Z. Is the Production of Embryos in Small-Scale Farming an Economically Feasible Enterprise? / Z. Sanchez, M.A. Lammoglia, M.A. Alarcon, et. all. // Reproduction in domestic Animals. - 2015. - Vol. 50, №4. - P. 574-579.
4. Косовский, Г.Ю. Сравнительная оценка результатов трансплантации эмбрионов крупного рогатого скота в зависимости от места их локализации в роге матки реципиента / Г.Ю. Косовский, Д.В. Попов, А.В. Бригида. // Ветеринария Кубани, 2016. - №3. - С. - 9-11.
5. Пташинская, М. Краткое руководство по репродукции животных /М. Пташинская // IntervetInternationalBV. - 2009. - 176 с.
6. Джамалова, Г.А. Биотехнология воспроизводства с основами эмбриоинженерии / Г.А. Джамалова, С.Ш. Мирзабеков, Ж. Утесинов. Алматы: - "Ылым, 1996. - 238 с.
7. Кононов, В.П. Биотехника репродукции в молочном скотоводстве. / В.П. Кононов, В.Я. Черных. - М.: - 2009. - 283 с.
8. Мадисон, В.В. Трансплантация эмбрионов в практике разведения молочного скота / В.В. Мадисон, В.Л. Мадисон. - М.: Агропромиздат, 1988. - 128 с.
9. Устройство для аппликации эмбрионов крупного рогатого скота [Текст]: пат. 154919 Рос. Федерация, МПК А61D19/00 / Косовский Г.Ю., Попов Д.В., Бригида А.В.; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Центр экспериментальной эмбриологии и репродуктивных биотехнологий" (ФГБНУ ЦЭЭРБ).- № 2015113305/13; заявл. 10.04.15; опубл. 20.03.16, Бюл. № 08. - 2 с.: ил.
10. Бабенков, В.Ю. Использование трансплантации эмбрионов в воспроизводстве крупного рогатого скота Брестской области. / В.Ю.Бабенков.// Зоотехническая наука Беларуси. - Минск, 2000. - Т.34. - С. 62-67.
11. Бабенков, В.Ю. Инструмент нового типа для нехирургической трансплантации эмбрионов./В.Ю. Бабенков. //Генетико-селекционные и технологические проблемы разведения сельскохозяйственных животных: Тез. докл. науч.-практ. конф. - Киев, 1994. - С. 73-74.
12. Бабенков В.Ю. Эффективность трансцервикальной пересадки эмбрионов с помощью нового инструмента./В.Ю. Бабенков, А.П. Семечко. // Биотехнология и воспроизводство в животноводстве: тез. докл. науч.-практ. конф. - Горки, 1991.-С.6-8.