Результативность вымывания эмбрионов при индукции суперовуляции у коров-доноров

Efficacy of leaching of embryos during induction of superovulation in donor cows

Сорокин В.И.
г. Оренбург

DOI 10.30917/ATT-VK-1814-9588-2018-4-10
УДК: 619:618.177-089.888.11

Ключевые слова: крупный рогатый скот, эмбрион, суперовуляция, воспроизводство.

Key words: cattle, embryo, superovulation, reproduction

Резюме. Проведены исследования по определению результативности вымывания эмбрионов в зависимости от метода извлечения и суперовуляторной реакции яичников коров-доноров эмбрионов. Процедуру вымывания эмбрионов провели у 216 коров-доноров, которые были разделены на три группы в зависимости от метода извлечения: группа I (n = 66) – гравитационный (система самотека) с использованием полимерных трубок; группа II (n = 97) – шприцевания (порционный) с помощью шприца Люэра объемом 60 мл; группа III (n = 53) – замкнутого цикла циркуляции с использованием установки для нехирургического извлечения эмбрионов у животных (патент РФ на полезную модель №156767). В результате проведенных исследований установлено, что оптимальным методом извлечения эмбрионов является способ замкнутого цикла циркуляции с использованием установки для нехирургического извлечения эмбрионов у животных (патент РФ на полезную модель №156767), который по сравнению с известными (гравитационный и шприцевания) повышает эффективность извлечения эмбрионов на 19,1% и 14,1%, достигая 89,0%; сокращает время вымывания с 20–30 минут до 3–5 минут; сокращает объем используемой жидкости с 600–1000 мл до 150–200 мл; позволяет минимизировать утрату зародышей в процессе их извлечения.

Summary. Studies were conducted to determine the effectiveness of embryo recovery depending on the extraction method and superovulation response of donor cows. In the study 216 donor cows were included. They were divided into 3 group on the basis of the method applied for the embryo recovery. The gravitational method (self-draining system) with polymer tubes was utilized for the first group (n = 66), the syringe portioned method with 60ml syringe with Luer lock was used for the second group (n = 97), and the closed circulation cycle

method with the apparatus for non-surgical embryos recovery (patent of the Russian Federation for utility model No. 156767) was applied for the last group of cows (n = 53). As a result, the closed circulation cycle method using the apparatus for non-surgical recovering embryos was shown to be the optimal. In comparison with the gravitational and the syringe portioned methods, this method increased the efficiency of embryo recovery by 19.1% and 14.1%, respectively, reaching 89.0%; reduced embryo recovery time from 20–30 minutes to 3–5 minutes; decreased the volume of the used fluid from 600–1000 ml to 150–200 ml; and allowed to minimize the loss of embryos in the process of their recovery.

Введение

В связи с интенсивным развитием репродуктивных биотехнологий в ускоренном воспроизводстве крупного рогатого скота растет необходимость получения максимально большого количества эмбрионов от одной коровы-донора. В результате усовершенствования протоколов индукции полиовуляции стало возможным достижение высокого реакционного ответа яичников на введенные гонадотропные препараты и получение не 4–5 качественных эмбрионов, как было ранее, а 15 и более за один сеанс стимуляции коров-доноров [1, 2].

Однако, несмотря на более чем полувековой опыт применения технологии индукции полиовуляции, нерешенные проблемы продолжают формировать научный и практический интерес в вопросах предикции овариального ответа на стимуляцию полиовуляции и недостатков имеющегося оборудования по извлечению эмбрионов из репродуктивных органов коров-доноров, связанных с потерей извлекаемых зародышей (до 30%). Если прогноз овариального потенциала и эмбриопродуктивности коров-доноров с помощью перспективных генетических маркеров (поиск полиморфизмов генов, ассоциируемых с признаками полиовуляторного ответа) [3], на сегодняшний день не обладающих достаточной предиктивной способностью, представляет собой одну из наиболее трудноразрешимых проблем, то вопросы, связанные с потерей зародышей во время вымывания, возможно решить на сегодняшний день.

В связи с этим, актуальным является выявление оптимальных методов и оборудования для извлечения эмбрионов, позволяющих минимизировать утрату зародышей в процессе их вымывания.

На основании вышеизложенного целью нашей работы являлось проведение исследования по оценке результативности вымывания эмбрионов в зависимости от метода и оборудования извлечения при индукции суперовуляции у коров-доноров эмбрионов.

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 ООО "Племзавод Димитровский", село Димитрово, Илекский район Оренбургской области, и промышленной молочной фермы ЗАО "Можайский", Можайский район Московской области, с участием специалистов хозяйств.

Извлечение эмбрионов проводили нехирургическим способом на 7-й день индуцированного полового цикла. Всех коров-доноров (n = 216), проявивших реакционный ответ яичников на введенные гонадотропные препараты,

Авторы / Authors

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

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

Sorokin V.I. Brigida A.V.

Рисунок 1. Процедура вымывания эмбрионов у коровы-донора, с использованием способа замкнутого цикла циркуляции с применением установки для нехирургического извлечения эмбрионов у животных (патент РФ на полезную модель №156767).

разделили на три группы в зависимости от способа извлечения эмбрионов: группа I (n = 66) – гравитационный (система самотека) с использованием полимерных трубок; группа II (n = 97) – шприцевания (порционный) с помощью шприца Люэра объемом 60 мл; группа III (n = 53) – замкнутого цикла циркуляции с использованием установки для нехирургического извлечения эмбрионов у животных (патент РФ на полезную модель №156767) [4] (рисунок 1).

Во всех трех группах использовали в качестве вспомогательного оборудования гибкие двухканальные и трехканальные катетеры для извлечения эмбрионов с наконечником Фолея производства фирмы "Minitube" (Германия), а также устройства для сбора эмбрионов (Франция). Поиск и оценку эмбрионов определяли под микроскопом с увеличением 60 – 100 раз и более.

Непосредственно перед извлечением эмбрионов у коров-доноров был проведен подсчет желтых тел на поверхности яичников ректопальпаторным методом и/или методом эхографической визуализации. При этом, количество желтых тел (число овуляций) было принято равнозначным количеству созревших и овулировавших фолликулов, из которых выходят яйцеклетки, пригодные для оплодотворения. Провели градацию животных в каждой группе согласно лимитам числа овуляций: животные с 3–5 желтыми телами, с 6–10, с 11–20, и с более 20 желтыми телами на яичниках.

Результаты исследований:

Результаты проведенных исследований отражены в таблице 1.

Из таблицы 1 видно, что во всех трех группах количество коров-доноров в соответствии с лимитами числа овуляций распределились следующим образом: в первой группе – (12, 33, 15 и 6), во второй – (19, 51, 20 и 7) и в третьей – (11,

21, 17 и 4), что в процентном соотношении составило (18,2/50,0/22,7/9,1%), (19,6/52,6/20,6/7,2%) и (20,8/39,6/32,1/7,5%) соответственно. Таким образом, 70% коров-доноров приходилось на лимиты числа овуляций 6–10 и 11–20 желтых тел на яичниках, при этом животные с количеством желтых тел на яичниках 20 и более не превышали 10% от общего числа коров-доноров, проявивших реакционный ответ на введенные гонадотропины.

При пересчете среднего числа желтых тел (в соответствии с лимитами числа овуляций) на одного донора во всех трех группах было установлено, что в группе I среднее число составило – 4,1; 7,3; 15,2; 22,9, в группе II – 4,0; 6,9; 14,5; 24,6, в группе III – 4,3; 7,8; 15,7; 23,4. По результатам извлечения эмбрионов установлено, что среднее число полученных зародышей на одного донора в зависимости от способа извлечения составило в группе I – 2,8; 5,4; 9,6; 17,0, в группе II – 3,1; 5,2; 10,3; 18,0, в группе III – 3,9; 7,3; 13,7; 20,3, что в процентном соотношении количества извлеченных зародышей к количеству желтых тел на одного донора составляет в группе I – 68,3/74,0/63,2/74,2%; в группе II – 77,5/75,4/71,0/73,2% и в группе III – 90,7/93,6/87,3/86,6%. На основании полученных данных видно, что результат вымывания эмбрионов в зависимости от способа извлечения в трех группах имеет разную эффективность, что наглядно отражено в сводной таблице 2.

Сравнительный анализ результатов показал, что средний процент выхода зародышей в группе I, где извлечение проводили с использованием гравитационного способа (с системой самотека) составил – 69,9%, в группе II, где извлечение проводили с применением способа "шприцевания", данный показатель составил – 74,9%, а в группе III, где вымывание эмбрионов проводили с использованием способа замкнутого цикла циркуляции с применением установки для нехирургического извлечения эмбрионов у животных (патент РФ на полезную модель №156767) средний процент выхода зародышей был равен 89,0%, что на 19,1 и 14,1% превышает по выходу зародышей две предыдущие группы.

В процессе исследований отмечено, что при применении в группе III способа замкнутого цикла циркуляции с применением установки для нехирургического извлечения эмбрионов у животных (патент РФ на полезную модель №156767) количество используемой промывочной жидкости с 600–100 мл сокращается до 150–200 мл на одну голову. Применение установки сокращает время проведения процедуры вымывания эмбрионов с 20–30 минут до 3–5 минут, как следствие, минимизирует стресс коров-доноров эмбрионов и элиминирует травматизм репродуктивных органов.

Таким образом, установлено, что оптимальным методом извлечения эмбрионов является способ замкнутого цикла циркуляции с использованием установки для нехирургического извлечения эмбрионов у животных (патент РФ

Таблица 1. Сравнительная оценка результативности вымывания эмбрионов в зависимости от метода извлечения и суперовуляторной реакции яичников коров-доноров эмбрионов (X±Sx)

Группа, способ извлечения эмбрионов	Кол-во доноров в группе, n	Лимит числа овуляций, lim	Кол-во доноров проявивших реакцию, n/%	Количество желтых тел, n/%		Получено зародышей, n/%	
				Всего	На донора	Всего	На донора
I – гравитационный (система самотека)	66	3 - 5	12/18,2	49/7,5	4,1±0,260	34/69,4	2,8±0,458
		6-10	33/50,0	241/36,8	7,3±0,244	178/74,0	5,4±0,278
		11-20	15/22,7	228/34,8	15,2±0,738	144/63,2	9,6±0,883
		>20	6/9,1	137/20,9	22,8±0,912	102/74,2	17,0±1,511
II – шприцевания (порционный)	97	3 - 5	19/19,6	76/8,6	4,0±0,202	59/77,5	3,1±0,341
		6-10	51/52,6	347/39,2	6,8±0,153	265/75,4	5,2±0,253
		11-20	20/20,6	290/32,8	14,5±0,691	206/71,0	10,3±1,233
		>20	7/7,2	172/19,4	24,6±0,782	133/73,2	19,0±1,536
III – замкнутого цикла циркуляции	53	3 - 5	11/20,8	47/8,2	4,3±0,273	43/90,7	3,9±0,253
		6-10	21/39,6	164/28,7	7,8±0,271	153/93,6	7,3±0,273
		11-20	17/32,1	267/46,7	15,7±0,781	232/87,3	13,6±0,849
		>20	4/7,5	94/16,4	23,5±0,652	81/86,6	20,3±0,859

на полезную модель №156767). Это позволяет минимизировать утрату зародышей в процессе их вымывания и достичь выхода зародышей, в среднем 89,0%.

Литература

1. Косовский, Г.Ю. Методы коррекции индукции суперовуляции с целью получения оптимального количества эмбрионов, пригодных к трансплантации. // Г.Ю. Косовский, Д.В. Попов, А.В. Бригида.// Ветеринария Кубани, 2015. - №5. - С. - 15-17.
2. Сборник трудов, посвященный пятилетию создания ФГБНУ "Центр экспериментальной эмбриологии и репродуктивных биотехнологий" 2012-2016. - М.: - 2017. - 415 с.
3. Бурсаков, С.А. Генетические маркеры суперовуляторного ответа у крупного рогатого скота (ОБЗОР) / С.А. Бурсаков, С.Н. Ковальчук,

Таблица 2.Сводная таблица сравнительной эффективности результативности вымывания эмбрионов в зависимости от метода извлечения и суперовуляторной реакции яичников коров-доноров эмбрионов (X±Sx)

Группа	Кол-во доноров, n	Общее число овуляций		Получено зародышей		Средняя потеря зародышей	
		Всего, n	На донора, n	Всего, n/%	На донора, n	Всего, n/%	На донора, n
I	66	655	9,9±0,73	458/69,9	6,9±0,59	197/30,1	3,0±0,32
II	97	885	9,1±0,60	663/74,9	6,8±0,52	222/25,1	2,3±0,25
III	53	572	10,8±0,83	509/89,0	9,6±0,72	63/11,0	1,2±0,21

Д.В. Попов, Г.Ю. Косовский // Проблемы биологии продуктивных животных. - Боровск. - 2017. - №4. С.5-23.
4. Установка для нехирургического извлечения эмбрионов у животных [Текст] : пат. 156767 Рос. Федерация : МПК А61D9/00 / 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). - 2015131973/13; заявл. 31.07.15 ; опубл. 20.11.15, Бюл. № 32 . - 2 с. : ил.