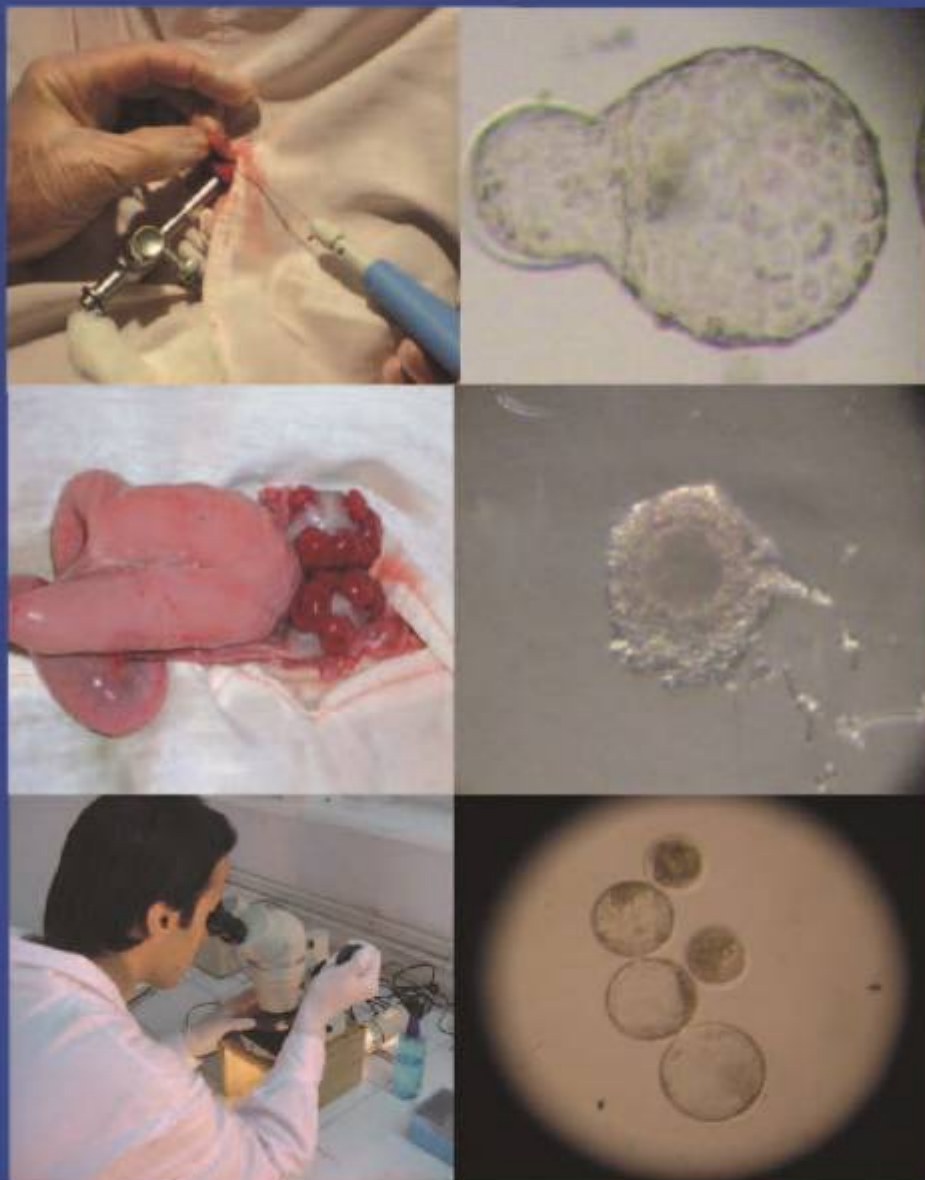


Перенос эмбрионов у овец и коз

Учебное пособие

Алехандро Гиббонс и Марсела Куэто



Опытная станция Барилоче
Национальный институт сельскохозяйственных технологий
Аргентина
2011 год



Содержание

Введение	2
Принципы и общие положения в отношении переноса эмбрионов	3
1. Гормональная физиология репродукции	4
2. Стимуляция яичников для обеспечения множественных овуляций	5
3. Факторы, связанные с реакцией на множественные овуляции	7
4. Индуцированные овуляции у реципиентов и синхронизация эструса между донором и реципиентом.	9
5. Оплодотворение донора	10
6. Извлечение эмбрионов	12
7. Обнаружение эмбрионов	14
8. Оценка качества эмбрионов	14
9. Перенос эмбрионов	16
10. Консервация эмбрионов	18
Технология замораживания	19
Технология оттаивания	20
Технология витрификации	21
Репродуктивная эффективность при переносе эмбрионов	22
Разделение эмбрионов	23
Обеспечение благоприятных санитарно-гигиенических условий при переносе эмбрионов	23
Общие выводы	23
Библиографический список	25
ПРИЛОЖЕНИЯ	30
Приложение 1. Классы качества эмбрионов	30
Приложение 2. Среда для замораживания	30
Приложение 3. Технология витрификации (Гиббонс и др., 2008, 2009)	30

Введение

Перенос эмбриона (ПЭ) представляет собой метод вспомогательной репродукции, основанный на получении нескольких эмбрионов в организме самки-донора (генетически улучшенной матери), которые затем переносятся в организмы различных самок-реципиентов (вынашивающих матерей).

Проведение гормонотерапии с целью стимулирования множественной овуляции и ПЭ обеспечивает интенсивное использование генетически улучшенных самок. В течение последних 25 лет был достигнут значительный прогресс в области ПЭ, способствовавший улучшению генетических качеств овец и коз. Это потребовало максимизировать производство эмбрионов и повысить степень их выживания для получения потомства, обладающего высокой генетической ценностью. Следует подчеркнуть, что генетически улучшенная мать может быть использована в программах ПЭ несколько раз, что увеличивает ее репродуктивный потенциал, за счет использования генетически низших животных в качестве реципиентов генетически улучшенных эмбрионов (Мюллер, 1993).

Первые эксперименты по переносу эмбрионов у овец и коз были осуществлены 75 лет назад (Варвик и др., 1934). После 1960-х годов они были продолжены в Австралии (Мур и Роусон, 1960) и в Новой Зеландии (Тервит и Хавик, 1976) и помогли уточнить условия применения и возможности этой биотехнологии.

Естественный репродуктивный потенциал каждого вида и породы является ограничивающим фактором для распространения генетических улучшений. При традиционных условиях выращивания овец и коз количество потомств от самки в год составляет один или два. Таким образом, во время репродуктивной жизни самки может быть получено от шести до восьми потомств. Перенос эмбрионов увеличивает репродуктивный потенциал самок, имеющих высокую генетическую ценность, за счет использования большого резерва яйцеклеток в яичнике. Гормональная стимуляция яичников вызывает множественные овуляции, приводящие к увеличению среднего количества овуляций для данной породы. Следовательно, за короткий срок можно получить значительное количество потомств.

Перенос эмбрионов сокращает интервал между поколениями, что приводит к более значительному генетическому прогрессу. В то же время, искусственное осеменение и ПЭ вместе представляют собой отличные методы для генетического улучшения овец и рогатого скота, изолированных от улучшенных самцов.

В течение последних 20 лет перенос эмбрионов применялся в Австралии и Новой Зеландии для объединения генетического материала Ангорских коз с небольшим риском для здоровья. Во Франции проводится программа в отношении генетически улучшенных молочных овец (порода Лакаунэ, используемая в производстве сыра рокфор). Международная торговля замороженными эмбрионами овец и коз способствовала распространению во всем мире зародышевой плазмы, с очень низким риском для здоровья. Как следствие, произошло быстрое генетическое улучшение различных пород и создание альтернативных производственных разновидностей мяса, молока, шерсти (например, мохера или кашемира).

Этот метод используется в отношении домашних животных по существу из-за причин генетического и коммерческого характера, охраны здоровья и сохранения видов. При этом преследуются следующие цели:

- Внедрение и быстрое распространение новых пород или генотипов, обладающих высокой продуктивной ценностью. Желаемые характеристики быстро внедряются к овцам и рогатому скоту в течение всего одного поколения. Примером могут служить генетические характеристики «плодовитого гена Бурула» овец породы Меринос, который способствовал улучшению качеств его «носителей» и который может быть легко масштабирован при помощи ПЭ.
- Снижение риска передачи заболеваний, поскольку на начальных стадиях развития эмбриона существует естественная защита от инфекционных агентов.
- Распространение генетического материала, обладающего высокой коммерческой ценностью и легкой внешней адаптацией потомства к различным производственным и управленческим системам.
- Ускорение темпов генетического прогресса в производстве. Это происходит в результате усиленного отбора матерей, предназначенных для производства улучшенных самцов, как следствие наличия более многочисленного потомства у каждой отдельной самки.
- Сокращение интервала между поколениями. Возможность получения потомства от более молодых матерей сокращает интервал между поколениями. Дальнейшее совершенствование возможно, если используется сперма молодых самцов.
- Оказание содействия репродуктивным технологиям, затрагивающим микроманипуляцию эмбрионов (определение пола, искусственное оплодотворение, клонирование, трансгеноз и т.д.).
- Сохранение породы или вида. Сохранение генетического материала (замороженных эмбрионов) в сосудах для зародышевой плазмы обеспечивает сохранение генов, которые иначе были бы потеряны, что привело бы к исчезновению видов.

Принципы и общие положения в отношении переноса эмбрионов

Самки-доноры должны выбираться на основе своей генетической ценности и критерия улучшения производительности каждой породы.

Основные факторы, такие как репродуктивные условия, аспекты здоровья и питания должны приниматься во внимание как в отношении доноров, так и реципиентов. Должны проводиться клинические обследования животных и серологические тесты на инфекционные заболевания (такие, как бруцеллез и ящур).

Самки уже должны иметь по крайней мере одно потомство, и должно пройти по крайней мере два послеродовых месяца до начала гормонотерапии. Меньшее пройденное время может привести к уменьшению числа производимых эмбрионов.

Необходимость использования молодых самок в качестве доноров может привести к снижению репродуктивной эффективности. Если существует необходимость использования самок, которые никогда не приносили потомство, то их минимальный вес должен составлять 75% от веса взрослой особи той же породы. Кроме того, у нее уже должен был случиться эструс (течка).

Использование годовалых животных в качестве матерей-реципиентов не рекомендуется. Взрослые самки являются лучшим вариантом, поскольку они могут пройти через беременность без ущерба для их собственного роста, а также способствовать развитию потомства посредством лактации.

Перенос эмбрионов предполагает выполнение ряда процедур в отношении доноров и реципиентов. Когда они осуществляются в условиях, отличных от обычных, рекомендуется предоставлять животным от одного до двух месяцев для адаптации перед началом процедуры.

Идентификация по ушной бирке, четко обозначающей номер, позволит безошибочно осуществлять интенсивные процедуры, не причиняя животным ненужного стресса, способного негативно повлиять на результаты.

Необходимо учитывать аспекты здоровья, питания самцов и их репродукционные качества, а также качество спермы, вне зависимости от естественного спаривания или искусственного осеменения с использованием свежей, охлажденной или замороженной спермы.

До начала осуществления программы ПЭ необходимо обратить внимание на следующие моменты:

1. Гормональная физиология репродукции.
2. Стимуляция яичников для обеспечения множественных овуляций.
3. Факторы, связанные с реакцией на множественные овуляции.
4. Индуцированные овуляции у реципиентов и синхронизация эструса между донором и реципиентом.
5. Оплодотворение донора.
6. Извлечение эмбрионов.
7. Обнаружение эмбрионов.
8. Оценка качества эмбрионов.
9. Перенос эмбрионов.
10. Консервация эмбрионов.

1. Гормональная физиология репродукции

Во время проведения ПЭ применяется специальная гормонотерапия для стимулирования эструса и множественных овуляций (у самки-донора), стимулирования овуляции (у самки-реципиента) и синхронизации эструса между донором и реципиентом.

Гонадотропин-рилизинг гормон (ГнРГ) представляется собой декапептид, производимый секреторными нейронами в центральной нервной системе. Секреция этого гормона зависит от внешних факторов (фотопериод, стресс, питание) и внутренних факторов (гормоны, такие как эстроген и прогестерон, феромоны). Он действует на гонадотропные клетки гипофиза, стимулируя синтез и высвобождение фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) и лютеинизирующего гормона (ЛГ).

Гонадотропины ФСГ и ЛГ представляют собой гликопротеины, синтезированные на уровне переднего гипофиза, и они участвуют в регуляции функции яичников.

ФСГ стимулирует рост, а также созревание фолликула и яйцеклетки. Он заставляет зрелые фолликулы воспроизводить рецепторы ЛГ и поддерживать высвобождение эстрогена. Базальная секреция ассоциируется с динамикой фолликула во время лютеиновой фазы и повышается два раза во время фолликулярной фазы: первое повышение происходит вместе с преовуляционным пиком ЛГ – что зависит от ГнРГ –

а второе повышение, менее интенсивное, происходит через 18 часов и вызывается снижением уровня эстрогена в крови - что не зависит от ГнРГ.

Концентрация ЛГ увеличивается в импульсах в течение короткого периода времени перед овуляцией. Частота повторения импульсов ЛГ зависит от стимуляции клеток гипофиза при помощи ГнРГ. Каждый импульс ЛГ соответствует одному импульсу ГнРГ. Во время преовуляционной фазы увеличение секреции эстрогена посредством фолликулов оказывает положительный эффект на ось гипоталамус-гипофиз, которая, в свою очередь, вызывает так называемый «преовуляционный пик ЛГ».

ЛГ участвует совместно с ФСГ в конечном созревании фолликулов, в высвобождении яйцеклеток (овуляции) и образовании желтого тела, которое развивается из фолликула после высвобождения яйцеклетки.

Прогестерон представляет собой стероид, выделяемый желтым телом. Если происходит оплодотворение, то его уровень во время периода беременности, получаемый из плаценты и желтого тела, остается неизменным. Его функция заключается в поддержании беременности до этапа рождения. Перед овуляцией, вместе с эстрогенами, он играет роль во внешних проявлениях эструса. Он оказывает отрицательный эффект на гипоталамус, подавляя секрецию ГнРГ и, следовательно, пульсацию ЛГ, таким образом блокируя овуляцию.

Простагландин выделяется эндометрием матки. Его увеличение индуцирует лютеолиз (регресс желтого тела) и, следовательно, способствует снижению уровня прогестерона, приводящего к проявлению нового эстрального периода.

2. Стимуляция яичников для обеспечения множественных овуляций

Множественные овуляции были вызваны у овец и коз посредством ввода от 1000 до 2000 МЕ гонадотропина сыворотки жеребых кобыл (ГСЖК) или хорионического гонадотропина лошадей (ХГЛ) за 48 часов до окончания процедуры применения прогестагена. Результаты применения ГСЖК были хуже, чем полученные при применении ФСГ. Из-за своей высокой молекулярной массы, ГСЖК имеет длительный период полураспада (21 час), приводит к росту дисперсных фолликулов, а также индуцирует образование ановуляторных фолликулов и преждевременную лютеинизацию фолликулов, что приводит к снижению рождаемости, степени извлечения эмбрионов и качества эмбрионов (Армстронг и Эванс, 1983; Армстронг и др., 1983; Мур и др., 1985; Цунода и Суджи, 1989; Уолкер и др. 1989). Множественные овуляции появляются через 54 часа после изъятия интравагинальных тампонов с прогестагеном (Уолкер и др., 1986).

ФСГ свиного или овечьего происхождения является более эффективным (Алберто и др., 1993). По сравнению с ГСЖК, применение ФСГ приводит к более лучшей миграции спермы (Эванс и Армстронг, 1984), более высокой степени оплодотворения при использовании искусственного осеменения (Эванс и др., 1984.) и большему количеству производимых эмбрионов (Армстронг и др., 1983; Торрес и др., 1987).

Наиболее широко признанным методом вызывания множественной овуляции у овец является применение, в убывающих дозах, ФСГ в конце процедуры применения прогестагена. В отличие от ГСЖК, биологический полураспад ФСГ является коротким (от 3 до 4 часов), и он требует 6-8 кратного применения каждые 12 часов.

Множественные овуляции происходят через 60 часов после изъятия интравагинальных тампонов (Фото 1) (Уолкер и др., 1986).

Дозы ФСГ выражаются в мг «Арморовского стандарта» (mg Armour), который является единицей активности в биологических тестах, эквивалентной значению от 10 до 14 мкг чистого гормона ФСГ. Дозы, рекомендуемые для овец и коз, варьируются между 16 и 20 мг «Арморовского стандарта» (Тервит и др., 1984; Гонсалес и др., 1991; Бребион и др., 1992). Овуляторная реакция на эти дозы зависит от генотипа. Увеличение дозы ФСГ (более чем 16-20 мг «Арморовского стандарта») не приводит к увеличению овуляторной реакции. Дозы ФСГ могут быть также выражены в NIH-FSH-P1, при этом для самки-донора рекомендуются суммарные дозы до 200 мг.

Для получения более лучшей овуляторной реакции рекомендуется увеличить применение ЛГ к концу процедуры применения прогестагена (Когни и др., 1986; Бариль и др., 1989). Рекомендуемое соотношение ФСГ к ЛГ составляет 3:1 (для применений с первого по третье), 1:1 (для четвертого применения) и 1:2 (для пятого применения).

Время возникновения эструса после процедуры применения ФСГ варьируется. Он обычно может быть обнаружен по истечении от 24 до 36 часов после изъятия пессария.

«Традиционная терапия» у овец заключается в сочетании уменьшаемых доз ФСГ с однократным применением ГСЖК к концу процедуры применения прогестагена. Она включает в себя введение интравагинальных тампонов, содержащих прогестагены (60 мг медроксипрогестерона ацетата (MAP), производства компании Syntex, Аргентина), в течение 14 дней и введение 200 мг NIH-FSH-P1 (Фоллитропин-V, производства компании Bioniche, Канада) на одну овцу, подвергающуюся терапии, применяемых в шести уменьшающихся дозах каждые 12 часов следующим образом: 50, 50, 30, 30, 20 и 20 мг ФСГ, начиная с утра 12-го дня после введения интравагинального тампона. Разовая доза ГСЖК (200 МЕ, Novormon 5000, производства компании Syntex, Аргентина) вводится одновременно с пятым применением ФСГ и удалением прогестагена.

Терапия в отношении коз схожа с терапией в отношении овец. Для получения лучшей степени оплодотворения рекомендуется проведение короткого курса терапии, заключающегося в введении интравагинального тампона с прогестагеном на 11 дней и применение дозы простагландина F2-альфа (50 мкг клопростенола) каждые 48 часов до момента изъятия тампона (Кортил и др., 1988).

Однако, в отношении овец породы Меринос и во время периода размножения мы показали, что возможно снизить общую дозу на овцу-донора до 80 мг NIH-FSH-P1, применяемую шесть раз каждые 12 часов по 18, 18, 14, 14, 8 и 8 мг соответственно, начиная с утра 12-го дня после введения тампона. Пятое применение совпадает с изъятием интравагинального тампона вместе с введением 200 МЕ дозы ГСЖК (Novormon 5000, производства компании Syntex, Аргентина) (Рисунок 1). В этом случае, несмотря на более низкий уровень овуляции ($P < 0,05$) в связи с меньшей дозой, получается схожее количество эмбрионов аналогичного качества. Это, вероятно, происходит из-за большего уровня выхода эмбрионов и более высокой степени оплодотворения ($P > 0,05$) (Таблица 1). При осуществлении этой процедуры у более 80% овец-доноров наблюдается эструс через 36 часов после изъятия пессария. Снижение высокой стоимости ФСГ почти на треть предполагает экономическую выгоду при использовании в коммерческих программах ПЭ.

Следует подчеркнуть, что всегда будет необходимо определять рекомендуемую дозу в зависимости от эффективности терапии, касающейся множественной овуляции, а также корректировать ее на основе вида, породы, времени года, производственной системы и т.д.

Таблица 1. Выход эмбрионов у овец породы Меринос после проведения суперовуляторной терапии при помощи 80 мг (малая доза) или 200 мг (большая доза) ФСГ (Фоллитропин-V) + 200 МЕ ГСЖК (Novormon 5000) во время периода размножения.

	Малая доза	Большая доза
Животные (n)	43	11
Уровень овуляции (x)	13,0 ± 0,9 a	17,5 ± 1,8 b
Извлеченные яичниковые структуры* (x)	7,4 ± 0,7 a	10,0 ± 1,4 a
Степень извлечения яичниковых структур (%)	59,6 ± 3,6 a	56,3 ± 7,1 a
Извлеченные эмбрионы (x)	5,9 ± 0,6 a	6,4 ± 1,2 a
Степень извлечения эмбрионов (%)	50,0 ± 4,0 a	38,6 ± 7,9 a
Извлеченные эмбрионы 1-2 классов** (x)	5,0 ± 0,6 a	5,5 ± 1,2 a
Степень извлечения эмбрионов 1-2 классов (%)	85,0 ± 3,8 a	82,6 ± 7,2 a
Неоплодотворенные ооциты (x)	1,0 ± 0,5 a	2,6 ± 1,0 a
Степень неоплодотворения (%)	9,7 ± 4,3 a	25,1 ± 8,4 a
Скорость реакции (> 3 CL) (%)	98,0 a	100,0 a

a, b указывают на существенные различия между процедурами (P<0,05)

* Эмбрионы + ооциты + вителлиновый слой

** См. Приложение 1. Классы качества эмбрионов (Международное общество переноса эмбрионов (IETS), 1998)

Овуляторная реакция на повторяющиеся терапевтические процедуры, связанные с множественной овуляцией, зависит от источника ФСГ. Бариль и др. (1992) отметили, что использование свиного ФСГ является менее эффективным, чем овечьего или козлиного ФСГ. Это связано с развитием гетероспецифических анти-гонадотропных антител. Можно вводить и сыворотку, но это дорогостоящая процедура.

У коз повторяющиеся терапевтические процедуры при помощи свиного ФСГ вызвали возникновение анти-ФСГ антител (Реми и др., 1991) и снижение овуляторной реакции (от 40 до 50% при третьей терапии и до 70-80% при четвертой или пятой терапии).

3. Факторы, связанные с реакцией на множественные овуляции

Внутренний фактор каждого животного играет главную роль в его реакции на терапевтические процедуры, связанные с множественной овуляцией. Исследования, проведенные со жвачными животными, показали, что лишь 68% самок производили эмбрионы, могущие быть перенесенными. Остальные 32% включали самок, которые не реагировали на стимуляцию яичников, тех самок, у которых извлечение эмбрионов или яйцеклеток не было возможным, и тех самок, которые производили эмбрионы, не могущие быть перенесенными (Дональдсон, 1984). Поэтому всегда необходимо помнить, что некоторая доля самок не будет реагировать на терапевтические процедуры, связанные с множественной овуляцией. Индивидуальное разнообразие в отношении гормональной реакции на

множественные овуляции обусловлено внешними факторами (порода, период размножения, питание), а также внутренними факторами (фолликулогенез).

Порода является важным фактором разнообразия. У самых плодовитых пород наблюдается более высокий уровень реакции на множественную овуляцию, приводящий к более переносимым эмбрионам и большему потомству (Тервит, 1986; Ритар и др., 1988; Бариль и др., 1989).

Период размножения также влияет на среднее количество овуляций у самок овец; этот показатель выше в течение репродуктивного периода, чем в течение приэстрального периода (Торрес и др., 1984). Это различие не наблюдалось у молочных коз (Бариль и Валле, 1990), хотя качество эмбрионов было выше в период размножения. Что касается породы Меринос, то мы отметили аналогичные уровни овуляции как в течение периода размножения, так и вне его; однако, во время периода размножения наблюдались более высокая степень оплодотворения и большее количество извлеченных эмбрионов.

Питание играет основополагающую роль в реагировании на процедуры, связанные с множественной овуляцией. Было показано, что оно затрагивает не только овуляторную реакцию, но также может способствовать преждевременному лютеолизу, как во время сексуального периода, так и вне его (Бариль и др., 1989; Джаббур и др., 1991). Таким образом, степень извлечения эмбрионов является низкой (Армстронг и др., 1982; Тервит, 1986). У коз преждевременный лютеолиз очень разнообразен (от 0 до 27%). Эта ситуация была также отмечена у овец (Траунсон и Мур, 1974; Джаббур и др., 1991).

Овуляторная реакция на гормонотерапию изучалась на основе присутствия фолликулов в яичниках. Было отмечено, что это положительно коррелируется с количеством малых фолликулов (от 2 до 3 мм в диаметре) при применении первой дозы ФСГ, с количеством средних фолликулов (4-5 мм) в конце процедур с применением прогестагена и с количеством крупных фолликулов (> 6 мм) в начале эструса (Гонсалес-Бульнес и др., 2000). Однако, у овец породы Меринос при иницировании суперовуляторной терапии мы не обнаружили корреляции между количеством желтых тел и количеством малых, средних и больших фолликулов, или их общим количеством.

Было высказано предположение, что гонадотропное блокирование за счет продолжительной терапии с антагонистом ГнРГ (10-14 дней) до применения ФСГ может увеличить количество овуляций и сконцентрировать их, а также снизить различие между животными и увеличить вдвое потомство у доноров (7 ягнят на одну овцу-донора), с высоким уровнем повторяемости (Когни, 1999; Когни и др., 2003). Кроме того, внутривенное введение 3 мг ЛГ в период между 32 и 36 часами после завершения терапии прогестагеном приводит к синхронизированной овуляции через 20-28 часов после применения и позволяет осуществить спланированное по времени искусственное осеменение через 48-50 часов после завершения терапии прогестагеном (Когни и др., 2003). Во Франции такая терапия дала обнадеживающие результаты, что привело к большему количеству овец с множественной овуляцией (больше 5 овуляций), и более 10 эмбрионам, могущим быть перенесенными, у доноров породы Лакаунэ. Однако, высокий уровень овуляторной реакции (> 30 желтых тел у одной самки) был связан с более низкой степенью оплодотворения и меньшим количеством эмбрионов, могущих быть перенесенными (Когни и др., 2003) (табл. 2).

Хотя в результате этой терапии была получена высокая индивидуальная повторяемость в отношении уровня овуляции между двумя последовательными терапиями, касающимися множественной овуляции, по-прежнему сохраняются большие различия между индивидуальными особями.

Таблица 2. Степень извлечения эмбрионов, степень оплодотворения и доля эмбрионов, могущих быть перенесенными, в соответствии с уровнем множественной овуляции у овец породы Лакауэ.

Количество желтых тел	Овцы-доноры	Извлеченные яйцеклетки (%)	Оплодотворенные яйцеклетки (%)	Эмбрионы, могущие быть перенесенными (%)
5-9	26	60	84 b	69 a
10-14	39	62	93 a	76 a
15-19	41	62	89 a	79 a
20-24	17	67	85 ab	73 a
25-29	13	67	82 b	77 a
30+	18	53	72 c	47 c

(a относительно b, b относительно c) χ^2 тест; $P < 0.01$. (a относительно c) $P < 0.001$ в том же столбце

В настоящее время существует несколько факторов, еще не до конца понятых, которые контролируют фолликулогенез, рост фолликулов, созревание яйцеклетки, овуляцию и оплодотворение. Дальнейший прогресс в понимании их функций и взаимосвязей позволит повысить эффективность гормональных терапий, касающихся множественной овуляции, и привести к снижению затрат и получению более значительных выгод от использования этой технологии.

4. Индуцированные овуляции у реципиентов и синхронизация эструса между донором и реципиентом.

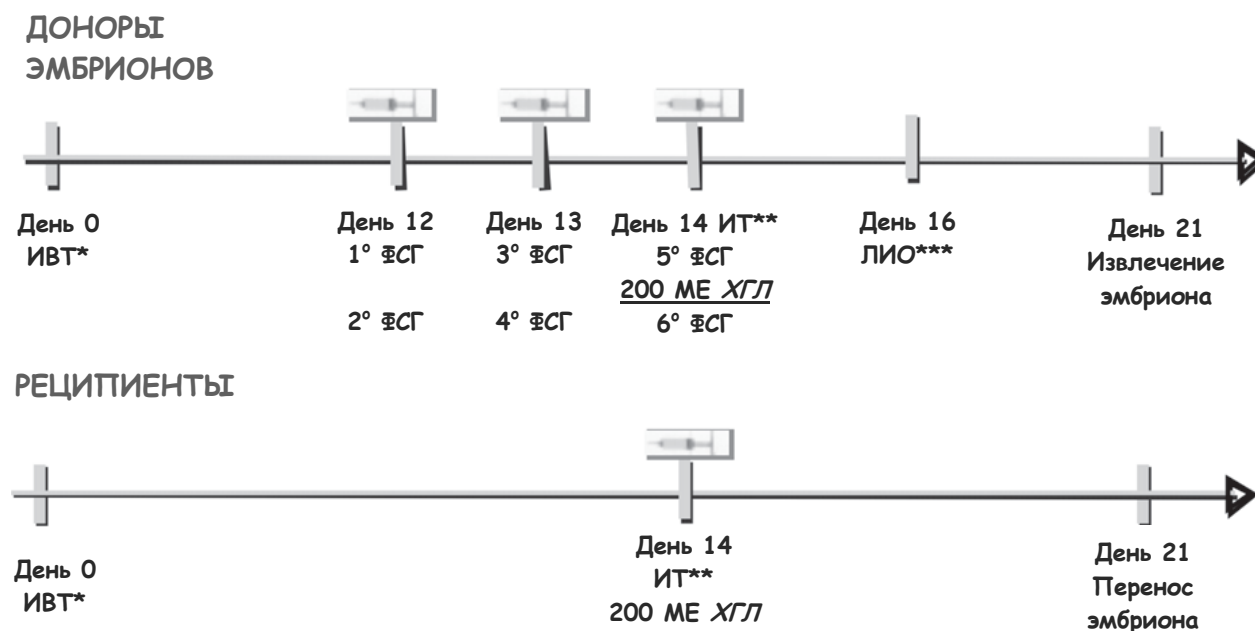
Синхронизация эструса у реципиентов при помощи терапии прогестагеном осуществляется в одно и то же время, что и у доноров. Это делается для обеспечения того, чтобы реципиенты и доноры достигали одного и того же дня эстрального цикла во время процессов извлечения и переноса эмбриона.

Синтетические аналоги прогестерона, ФГА (флуорогестона ацетат) и МАП (медроксипрогестерона ацетат), обычно используются для пессариев (интравaginaльных тампонов) для синхронизации эструса. В отношении овец необходима 14-дневная терапия; в отношении коз терапия прогестагеном длится 17 дней. В Австралии и Новой Зеландии очень часто используется прогестерон, вводимый вагинально с применением устройств для контролируемого внутреннего выпуска препарата (CIDR).

Гонадотропин сыворотки жеребых кобыл (ГСЖК) или хорионический гонадотропин лошадей (ХГЛ) обладает ФСГ-активностью и, в меньшей степени, ЛГ-активностью. Он используется в конце терапии прогестагеном для синхронизации эструса. В отношении овец и коз рекомендуется введение ГСЖК при изъятии тампона (Рисунок 1). Доза ГСЖК варьируется в зависимости от породы и репродуктивного физиологического состояния (ориентировочные значения: от 200 до 400 МЕ).

5. Оплодотворение донора

Оплодотворение самок-доноров может быть осуществлено посредством естественного спаривания в загоне или с помощью искусственного осеменения (ИО), с использованием свежей или замороженной спермы. Оплодотворение в загоне производится каждые 12 часов с начала до конца эструса.



* Интравагинальное введение тампона.

** Изъятие тампона.

*** Лапароскопическое искусственное осеменение.

Рисунок 1. График гормонотерапии для суперовуляции у овец-доноров породы Меринос и реципиентов эмбрионов.

При применении ИО посредством использования свежей или замороженной спермы рекомендуется проведение лапароскопической процедуры. В этом случае сперма помещается в рога матки близко к месту оплодотворения. Это обеспечивает повышение степени оплодотворения, а также снижение необходимой семенной дозы.

Семенные дозы

Ниже приведены рекомендуемые семенные дозы для применения ИО посредством использования свежей спермы (в млн. сперматозоидов):

- Цервикальное ИО: 800 (овцы) – от 400 до 600 (козы).
- Лапароскопическое ИО: 80 (овцы) – 100 (козы)

(Бариль и др., 1989; Валле и Бариль, 1990; Бребион и др., 1992).

В случае использования замороженной спермы для лапароскопического ИО семенные дозы у овец (Вольф и др., 1994) и коз (Валле и Бариль, 1990) составляют 100 миллионов сперматозоидов.

Оптимальное время для проведения ИО

У овец лапароскопическое спланированное по времени ИО с использованием свежей спермы осуществляется через 32 часа после начала эструса (Бребион и др., 1992).

В случае использования замороженной спермы лапароскопическое спланированное по времени ИО осуществляется через 40-55 часов после окончания терапии прогестагеном (Эванс и др., 1986). Исходя из нашей практики применения лапароскопического ИО после выявления эструса (Фото 2), овцы, у которых течка была выявлена через 24 часа после изъятия пессария, оплодотворяются затем через 24 часа; те овцы, у которых течка была выявлена через 36 или 48 часов после изъятия тампона, оплодотворяются затем через 12 часов.

У коз проведение лапароскопического ИО с использованием свежей спермы рекомендуется через 20-24 часа после начала эструса (Валле и Бариль, 1990). При использовании замороженной спермы ИО осуществляется через 46 часов после изъятия тампона (Фиени и др., 1990).

Степень оплодотворения

Эффективность оплодотворения у самок с множественной овуляцией значительно варьируется в зависимости от используемого метода оплодотворения, времени проведения ИО и индивидуальной овуляторной реакции на гормонотерапию.

Оплодотворение яйцеклеток может быть осуществлено посредством естественного спаривания, цервикального или лапароскопического ИО. Однако следует помнить, что при естественном спаривании или цервикальном ИО в случае доноров с высоким уровнем овуляторной реакции (более 10-12 овуляций) достигается низкий уровень плодовитости. Это связано с сокращением потока сперматозоидов в половых путях.

Спланированные по времени программы ИО с использованием лапароскопии и замороженной спермы для проведения терапевтических процедур, связанных с множественной овуляцией, являются очень рискованными: они должны применяться только когда известно распределение эструса для конкретной популяции, учитывая гормональный режим и время года. Эффективность оплодотворения посредством спланированного по времени ИО с использованием замороженной спермы показывает различные результаты. Хотя Армстронг и Эванс (1984) сообщили о степени оплодотворения в 50%, наш опыт показывает, что применение ГнРГ привело к более высокой степени оплодотворения. Посредством введения аналога ГнРГ (8 мг бусерелина, Reserptal) через 36 часов после изъятия тампона мы получали степени оплодотворения в районе 70-80%, независимо от того, было ли ИО проведено через 42 или 55 часов после изъятия пессария (Вольф и др., 1994).

Однако, в начале рекомендуется проведение лапароскопического осеменения после выявления течки. В ходе нашей работы с породой Меринос мы осуществляем ИО с использованием замороженной спермы после выявления эструса и с суммарной дозой в 100 миллионов сперматозоидов на самку. Овцы, у которых течка была выявлена через 24 часа после изъятия пессария, оплодотворяются затем через 24 часа; те овцы, у которых течка была выявлена через 36 или 48 часов, оплодотворяются затем через 12 часов. В этом случае мы достигаем степени оплодотворения, близкой к 80%.

У коз были получены степени оплодотворения в 32% (цервикальное ИО) и 65% (лапароскопическое ИО) с использованием свежей спермы (Мур и Эпплестон, 1979), в то время как лапароскопия с использованием замороженной спермы приводила к 70-75% плодовитости (Фиени и др., 1990).

Степень оплодотворения сильно зависит от овуляторной реакции на стимуляцию. У коз Альпийской и Зааненской пород плодовитость уменьшается при высокой овуляторной реакции (>15 желтых тел = 49%, а <15 желтых тел = 66%) (Бариль и др., 1989). Такие же результаты наблюдались у молочных овец (Бребион, не опубликовано).

Плодовитость в результате искусственного осеменения у самок с множественной овуляцией ниже, чем у необработанных контрольных животных (Мур и Эпплестон, 1979; Армстронг и Эванс, 1984). Степень оплодотворения не может быть увеличена за счет большего количества осеменений или за счет увеличения концентрации сперматозоидов в семенной дозе (Валле и др., 1991; Бребион и др., 1992).

6. Извлечение эмбрионов

Методология, используемая для извлечения эмбрионов, включает в себя введение жидкого средства, которое обеспечивает промывание струей рогов матки. Применяется коммерческое средство на основе фосфатного буферного раствора (ФБР) с 10% инактивированной коровьей, овечьей или козлиной сывороткой взрослого животного. Сыворотку можно получить посредством асептического отбора проб крови с использованием стерильных материалов. Сыворотка подвергается обработке в центрифуге при 2000g в течение 15 минут. Супернатант затем убирается, и обработка в центрифуге производится во второй раз. Затем осуществляется фильтрация посредством 22-миллиметровой мембраны. Инактивация комплементного белка осуществляется на водяной бане при температуре 56°C в течение 30 минут. Полученную в результате инактивированную и отфильтрованную сыворотку можно хранить в течение одного года при температуре -20°C.

У овец извлечение эмбриона проводится на 7 или 8 день после изъятия пессария. Так как начальное развитие эмбриона у коз задерживается на 12-24 часа, то эмбрионы собираются на 8-й или 9-й день после изъятия тампона (Таблица 3).

Эмбрионы собираются в эти дни по следующим причинам:

- Эмбрионы находятся в верхней трети рогов матки.
- Они имеют вителлиновый слой, необходимый в качестве санитарного барьера.
- Замораживание или витрификация (стеклование) осуществляются на стадиях уплотнившейся морулы или бластоцисты.

Технологии извлечения эмбрионов у мелких жвачных животных могут носить хирургический или нехирургический характер.

Такие процедуры проводятся под общим наркозом. Очень важно, чтобы животные не получали ни пищи, ни воды в течение 24 часов до операции. Внутримышечно вводится транквилизатор (2 мг 2%-го ксилазина на 10 кг массы тела) и внутривенно вводится анестетик (50 мг тиопентала натрия на 10 кг массы тела). Можно также использовать комбинацию ксилазина (2 мг 2%-го ксилазина на 10 кг массы тела) и кетамина (25 мг кетамина гидрохлорида на 10 кг массы тела), которые оба вводятся внутримышечно (0,4 и 2 мл соответственно). Кроме того, к операционной области применяется местный анестетик (1 мл 2%-го лидокаина).

Хирургический метод

Самка помещается головой вниз на наклонных носилках. Операционная область бреется и дезинфицируется. Проводится срединная лапаротомия в 5-7 см и 3 см в передней части вымени.

Таблица 3. Сравнительное развитие эмбрионов у овец и коз в разное время после изъятия интравагинального тампона (адаптировано из публикации Мура, 1980).

Количество дней после изъятия тампона	Овцы	Козы
7	Морула	Морула
8	Уплотнившаяся морула Бластоциста	Морула
9	Расширившаяся бластоциста Вылупившаяся бластоциста	Уплотнившаяся морула Бластоциста Расширившаяся бластоциста
10	Вылупившаяся бластоциста	Вылупившаяся бластоциста

Перед началом процесса извлечения эмбриона определяется овуляторная реакция (количество желтых тел), посредством либо экстериоризации яичников, либо лапароскопического наблюдения. Степень извлечения эмбрионов оценивается путем деления количества собранных эмбрионов на количество желтых тел.

Извлечение эмбрионов включает в себя размещение катетера (K33) с тупой иглой на конце (50/20), имеющей два боковых и одно центральное отверстие. Делается прокол в маточно-трубном соустье, и катетер продвигается внутрь полости рога матки (на 1 см); его фиксация на месте осуществляется при помощи сосудистого зажима или лигатуры (Фото 3 и 4). Второй прокол делается примерно в 2 см от места бифуркации рога матки для того, чтобы ввести 20 мл фосфатного буферного раствора (ФБР) при температуре 38°C (Фото 5 и 6). Это способствует возникновению струи, которая промывает полость в направлении маточно-трубного соустья, где был помещен катетер. Промывочная жидкость извлекается в заранее разогретую стерильную колбу Эрленмейера (Фото 7). Такая же процедура выполняется в другом роге матки.

После завершения процедуры извлечения эмбриона хирургические разрезы зашиваются и вводятся антибиотики.

Катетер-баллон Фолея может быть также размещен в месте бифуркации рога матки и промывочная жидкость может собираться самим катетером.

Собранная жидкость разливается в чашки Петри и проводится процедура обнаружения эмбрионов при помощи увеличительного стекла (10-и кратного).

Первое извлечение эмбрионов при помощи хирургических методов может привести к средней эффективности от 60 до 70%. Недостатком этой процедуры является

образование послеоперационных спаек, которые снижают эффективность последующих извлечений эмбрионов. Мы получили выход в 66, 41 и 35% для первой, второй и третьей хирургической процедуры соответственно.

Нехирургический метод

Нехирургический или лапароскопический метод был разработан со стороны Маккелви и др. (1986) в отношении овец и со стороны Валле и др. (1987) в отношении коз. Три прокола (с использованием троакаров) выполняются в брюшной стенке. Лапароскоп вводится через первый прокол. Трехпутный зонд вводится через второй прокол (три пути соответствуют: 1) введению фосфатного буферного раствора (ФБР), 2) выведению фосфатного буферного раствора (ФБР) и 3) инсуффляции надувного баллона). Третий прокол используется для нетравматического зажима. Этот зажим позволяет осуществлять манипуляцию с репродуктивным трактом, в целях продвижения зонда через полость матки, а также фиксировать маточно-трубное соустье во время промывания посредством ФБР.

Этот метод требует квалифицированного оператора и дорогостоящ, так как обязательно использование лапароскопа. Выход эмбрионов у него ниже (60%). Закупорка зонда сгустками или слизью может причинить значительные трудности. Но преимущество заключается в том, что он снижает образование адгезии и, следовательно, процент извлеченных эмбрионов не уменьшается с последующей операцией. Валле и др. (1987) зафиксировали выходы в 59, 58 и 68% у коз.

Среднее время, необходимое для извлечения эмбриона, составляет от 15 до 20 минут (хирургическим путем) и от 20 до 30 минут (с помощью лапароскопии) на одно животное.

Вне зависимости от используемого метода для извлечения эмбрионов, если необходимо обеспечить, чтобы самки-доноры не забеременели из-за неизвлеченных эмбрионов, рекомендуется введение простагландина F2-альфа (50 мкг клопростенола) после завершения процедуры.

7. Обнаружение эмбрионов

Собранная жидкость разливается в чашки Петри и проводится процедура обнаружения эмбрионов при помощи увеличительного стекла на теплопроводящей пластине при температуре 38°C (Фото 8). Всегда также рекомендуется проведение второй проверки чашки Петри. После обнаружения эмбрионов осуществляется их аспирация при помощи микропипетки и помещение в небольшую чашку Петри, содержащую консервант, обогащенный 20%-ной сывороткой, защищенную от воздействия света и находящуюся при лабораторной температуре. После завершения процесса обнаружения осуществляется оценка эмбрионов. Если это возможно, используйте газоуловитель и отфильтрованный воздух. Важно помнить, что эти мероприятия должны выполняться в строго стерильных условиях.

8. Оценка качества эмбрионов

Оценка качества эмбрионов проводится на основе морфологических аспектов и при 10-40 кратном увеличении. Для рассмотрения эмбрионов с разных углов их можно перемещать при помощи микропипетки или тонкой пипетки. Целостность вителлинового слоя и его сферичность должны быть соблюдены. Развитие эмбриона должно соответствовать критерию в соответствии с его датой сбора. 24-часовая

задержка допустима (Рисунок 2). Клетки должны быть четкими и иметь обычные границы; помутнение, если оно присутствует, указывает на дегенерацию.

У некоторых эмбрионов может наблюдаться частичное отделение клеток в перивителлиновом пространстве. Эта характеристика является допустимой, если остальное представляет собой единообразную клеточную массу, не имеющую помутнений. Если качество эмбриона сомнительно, то проводится вторая оценка через два часа. Данный тип морфологического исследования не позволяет провести проверку абсолютной жизнеспособности эмбрионов. Однако существенные различия в выживаемости эмбрионов (Бари и др., 2003) (Таблица 4) были обнаружены только тогда, когда переносились эмбрионы обычного качества, в сравнении с эмбрионами хорошего или отличного качества (Приложение 1). Это различие существеннее при переносе замороженных или подвергшихся витрификации эмбрионов.

Рекомендуются такие документы, как Атлас Уинтербергера-Торреса и Севеллеса (1987) по морфологии и качеству эмбрионов, Атлас IMV по вопросам эмбрионов, в качестве примеров развития и качества эмбрионов жвачных животных и бластографии раннего развития суперовулированных эмбрионов жвачных животных.

На показатель выживаемости эмбрионов не оказывает влияние дата извлечения эмбрионов (5-й или 6-й день после эструса). Эмбрионы, находящиеся на нормальной стадии развития на день их сбора (5-й день – морула; 6-й день – бластоциста), характеризуются схожими показателями выживаемости (74%) (Бари и др., 2003). Однако бластоцисты, собранные на 5-й день, характеризуются высоким показателем выживаемости по сравнению с запаздывающими морулами, собранными на 6 день.

Таблица 4. Показатель выживаемости эмбрионов различных классов качества у породы шотландских черноголовых овец (Бари и др., 2003).

Класс эмбриона	Количество перенесенных эмбрионов (n)	Показатель выживаемости эмбрионов (%)
Класс 1	825	75,6 a
Класс 2	550	73,8 a
Класс 3	114	61,4 b
Класс 4	24	37,5 b

Различные буквы указывают на статистические различия (χ^2 тест; $P < 0.01$)

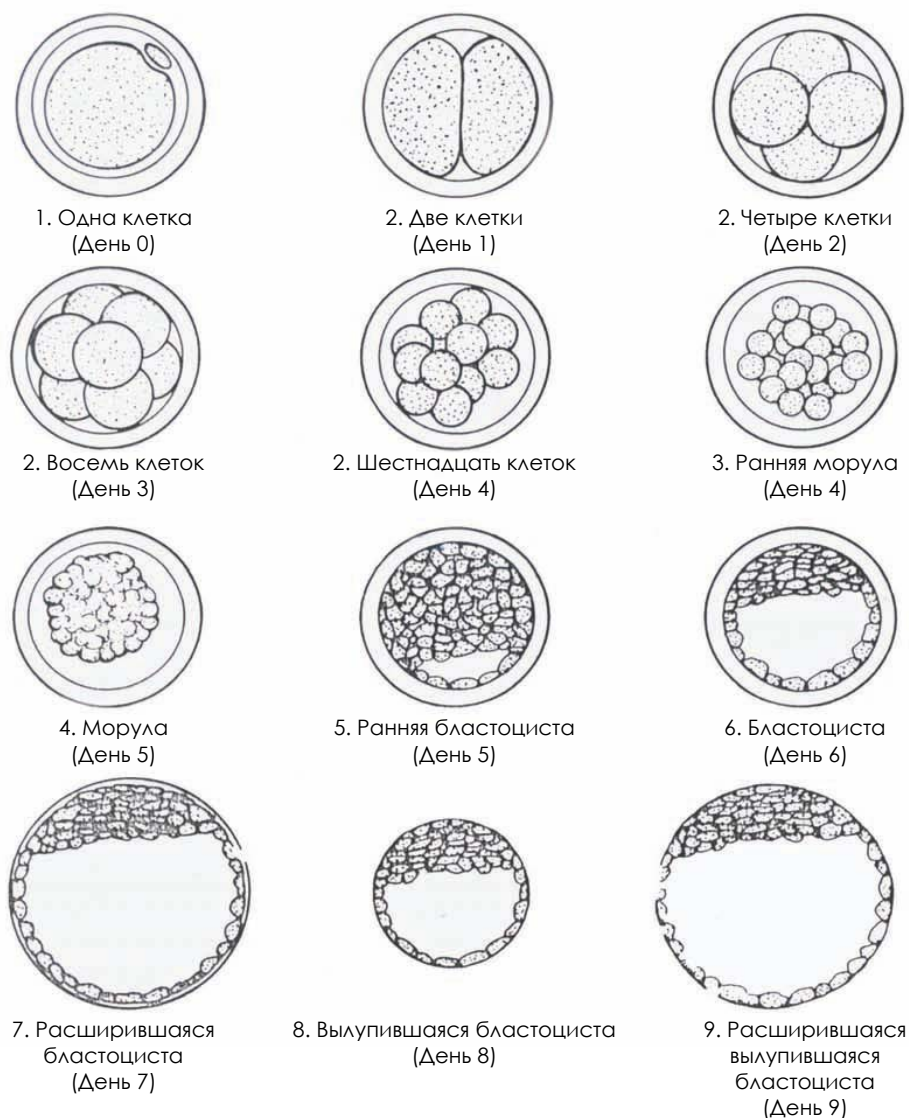


Рисунок 2. Схематическая хронология развития эмбриона у овец (в днях после эструса). Этапы развития обозначаются числами. Число 1 характеризует неоплодотворенную яйцеклетку или одноклеточного эмбриона. Число 2 характеризует эмбрионов, имеющих от 2 до 16 клеток (примерно со 2-го по 5-й день). Число 3 характеризует раннюю морулу, а числа с 4 по 9 характеризуют эмбрионов после этапа уплотнения, как показано выше. При коммерческом переносе эмбрионов эмбрионы обычно собираются с 6-го по 8-й день эстрального цикла (в состоянии морулы или бластоцисты).

9. Перенос эмбрионов

Перенос эмбрионов должен осуществляться немедленно после сбора, и ни в коем случае эмбрионы не должны находиться более двух часов в консерванте.

Что касается замороженных эмбрионов, то промежуток времени между окончанием оттаивания и переносом уменьшается до 20-30 минут.

Перенос эмбрионов обычно проводится в роге матки, ипсилатеральном к желтому телу.

Перенос эмбрионов в основном осуществляется при помощи двух альтернативных процедур: хирургической процедуры или нехирургической процедуры посредством лапароскопии (Гонсалес и др., 1991). В обоих случаях делается прокол на спинной стороне рога матки и в его верхней трети. Эмбрионы помещаются в полость матки с помощью микропипетки (хранящейся в 10 мл фосфатного буферного раствора (ФБР)).

Существует также комбинированный метод, когда рог матки визуализируется с использованием лапароскопии. Маленький разрез длиной в 1 см делается в брюшной средней линии, и рог матки обнажается при помощи зажима для того, чтобы осуществить перенос эмбрионов (перенос эмбрионов полухирургическим методом) (Фото 9 и 10).

У молочных коз более высокий показатель выживаемости эмбрионов был зафиксирован после переноса двух эмбрионов каждой самке-реципиенту (Мур и Эпплестон, 1979; Армстронг и др., 1983; Тервит и др., 1983.). У овец общая эффективность (количество произведенных ягнят на количество перенесенных эмбрионов) выше при переносе одного эмбриона каждой самке-реципиенту (Чех и Сереге, 1993).

Допустимое отклонение времени синхронизации эструса между самкой-донором и самкой-реципиентом составляет ± 1 день. При оптимальной синхронизации эструса между донором и реципиентом эффективность переноса эмбриона увеличивается (Роусон и Мур, 1966).

Важно иметь в виду так называемый «эффект доноров», определяемый как различие, наблюдаемое в отношении показателей выживаемости эмбрионов (от 0 до 78%), у эмбрионов того же качества, получаемых от разных матерей (Хейман и др., 1987).

Должно проводиться лапароскопическое или визуальное исследование яичников реципиентов с тем, чтобы обеспечить наличие самок с одним или двумя желтыми телами, соответствующими 6-му или 7-му дню эстрального цикла. Кроме того, при выборе реципиентов необходимо помнить, что выживаемость эмбрионов зависит от количества желтых тел. Армстронг и др. (1983) отметили показатели выживаемости эмбрионов в 52, 63 и 75% у реципиентов с 1-м, 2-м или 3-м желтыми телами соответственно. Лапароскопические методы способствуют хорошей классификации реципиентов на основе их овуляторной реакции.

В ряде случаев, особенно у коз, наблюдаются реципиенты с кистозными фолликулами или регрессивными желтыми телами. Эти самки не должны использоваться в качестве реципиентов.

Цервикальный перенос эмбрионов используется редко из-за трудностей при перемещении шейки матки (Левалски и др., 1991; Флорес-Фоксворт и др., 1992).

Очень важно учитывать временной интервал между процедурами извлечения эмбрионов, их обнаружения и оценки качества и соответствующими процедурами переноса эмбрионов. Ввиду сложности работы, связанной с осуществлением программы ПЭ, она должна быть очень хорошо организована и скоординирована с целью обеспечения оптимальных результатов.

10. Консервация эмбрионов

Консервация путем охлаждения до 5°C

Консервация эмбрионов способствует распространению ценного генетического материала на местном или международном рынках. Для транспортировки на короткие расстояния хранение в охлажденном виде при температуре 5°C обеспечивает консервацию в течение 24 часов в культуральной среде (культуральной среде яйцеклетки). Скорость охлаждения составляет 1°C в минуту.

Согревание эмбрионов осуществляется со скоростью 0,6°C в минуту, или, наоборот, путем размещения эмбрионов непосредственно в обогащенном фосфатном буферном растворе (ФБР) при температуре 37°C. Эмбрионы рассматриваются под увеличительным стеклом, отбираются, после чего немедленно осуществляется их перенос. Показатель выживаемости колеблется между 35 и 48% (Билтон и Мур, 1976; Драйанкорт и др., 1988).

Консервация путем замораживания в жидком азоте

В отношении домашних животных первые результаты были опубликованы в 1970-х годах (Уиттингем и др., 1972; Вилмут и Роусон, 1973). В 1976 году были опубликованы первые результаты в отношении коз (Билтон и Мур, 1976) и овец (Уилладсен и др., 1976).

Аналогично сперме этих видов также возможно осуществлять замораживание их эмбрионов и консервацию в жидком азоте на длительное время. Этот метод консервации сделал возможной международную торговлю эмбрионами, и, следовательно, генетический материал может быть распространен на глобальном уровне.

Процесс включает в себя помещение эмбрионных клеток в криопротекторную среду. Эти соединения (полиспирты) проникают в клетки за счет простой диффузии и применяются для подавления образования кристаллов льда, снижая тем самым точку замерзания. В среде, содержащей эмбрионы (внеклеточной среде), содержится больше воды, чем во внутриклеточной среде. Следовательно, в начале процесса замерзания, первые кристаллы льда образуются во внеклеточной среде. Это, в свою очередь, определяет возникновение диффузии внутриклеточной воды наружу и соответствующее уменьшение образования внутриклеточного льда. Затраченное время и скорость замораживания будут определять последующую жизнеспособность эмбриона.

У обоих видов – овец и коз – более высокий показатель выживаемости эмбрионов был зафиксирован при использовании этиленгликоля во время оттаивания, чем при использовании глицерина или диметилсульфоксида (ДМСО) (у овец – Тервит и Гулд, 1984; у коз – Ле Галь и др., 1993). Что касается контрольных значений, то были зафиксированы показатели беременности между 39 и 55% (Тервит и Гулд, 1984; Хантон и др., 1985; Ле Галь и др., 1993).

Замораживание осуществляется в отношении эмбрионов отличного или очень хорошего качества, находящихся на стадиях морулы или расширившейся бластоцисты (6-7 дней после эструса). Стадия бластоцисты эмбриона более устойчива к замораживанию, поскольку даже если некоторому количеству его клеток причинен серьезный ущерб, это не сказывается на будущем развитии.

Проведение оценки эмбрионов до их замораживания имеет жизненно важное значение; их состояние характеризует степень выживаемости после оттаивания. Бластоцисты без вителлинового слоя могут быть заморожены без ущерба для выживания. В этом случае, ограничивающим фактором является ее состояние.

Консервация эмбрионов в жидком азоте может осуществляться либо посредством технологии замораживания, либо посредством технологии витрификации (стеклования).

Технология замораживания

Эмбрионы после извлечения классифицируются и помещаются каждый в последовательные 10-минутные ванны с увеличивающимся содержанием этиленгликоля (0,5, 1 и 1,5 М) (Приложение 2) в ФБР и 20%-ной эмбриональной бычьей сыворотке при комнатной температуре. В течение этого периода происходит сокращение клеток из-за потери воды с последующим обратным расширением за счет криопротекторной среды.

По окончании этого этапа они помещаются в соломинки диаметром 0,25 мл. Важно тщательным образом пометать соломинки, указывая самку-донора, породу, количество эмбрионов и дату. Эмбрионы помещаются с 1,5 М этиленгликоля в ФБР, разделенным на обоих концах воздушным пространством и столбом жидкости из ФБР + сыворотки. Соломинка затем герметизируется при помощи поливинилового спирта.

Ренар и др. (1982) показали возможность использования двух фракций, содержащих 0,25 М сахарозы в ФБР, на обоих концах соломинки. В этом случае эмбрионы в ФБР + 1,5 М этиленгликоля помещаются в центральную камеру (разделенную воздушными камерами от остальной части). После оттаивания соломинка встряхивается для соединения фракций. Процесс исследования эмбрионов под увеличительным стеклом не осуществляется, вместо этого все содержимое соломинки переносится в самку-реципиента. Эта процедура является быстрой и обеспечивает приемлемый уровень выживаемости эмбрионов (от 55 до 65%) (Тервит Гулд, 1984; Хантон и др., 1985; Хейман и др., 1987; Ле Галь и др., 1993).

После завершения предварительной обработки эмбрионов, соломинки помещаются в программируемую морозильную камеру; кроме того, они могут быть заморожены вручную. В отношении последней процедуры требуется стальной цилиндр, в который необходимо будет поместить соломинки вместе с датчиком температуры. Цилиндр крепится к перфорированному стержню (с Т-образной перекладной) для обеспечения постепенного ската структуры в термос, содержащий азот.

Время между сбором и началом замораживания не должно превышать 40 минут.

Скорость охлаждения составляет от 1 до 3°C в минуту, до достижения отметки в -7°C. Через 30 секунд при этой температуре осуществляется диссеминация (индуцированная кристаллизация). Диссеминация производится касанием каждого края воздушной фракции, расположенной выше столба, содержащего эмбрионы, зажимом, охлажденным в жидком азоте в течение 2-3 секунд.

Это вызывает раннее образование кристаллов льда, что снижает скорость охлаждения, предоставляя клеткам больше времени для дегидратации, таким образом минимизируя повреждение клеток (де ла Вега и Уайльд, 1991).

Впоследствии температура поддерживается на уровне -7°C в течение 10 минут (время для достижения равновесного состояния), а затем скорость охлаждения составляет $0,3^{\circ}\text{C}$ в минуту до достижения температуры -35°C . Время стабилизации при температуре -35°C составляет 15 минут. Наконец, соломинки помещаются в термос с жидким азотом и погружаются в эту среду при температуре -196°C .

Технология оттаивания

Оттаивание эмбрионов осуществляется в термостатической водяной бане при температуре 37°C в течение 30 секунд. Затем постепенно осуществляется криопротекторное извлечение посредством последовательных этапов (по 5-10 минут каждый), путем погружения эмбрионов в чашки Петри с уменьшающейся концентрацией этиленгликоля (1 и 0,5 М) в ФБР + 20%-ной сыворотке, и, наконец, путем помещения их в чашку, содержащую ФБР + сыворотку. Эмбрионы затем оцениваются на основе морфологических характеристик. В ходе этой оценки эмбрионы отбираются в соответствии с полученными повреждениями в результате процесса замораживания/оттаивания. В качестве контрольного значения приемлемым считается значение от 10 до 30% поврежденных эмбрионов.

Другой метод криопротекторного извлечения после процесса оттаивания заключается в использовании сахарозы. Это вещество, благодаря своей высокой молекулярной массе, не проникает в эмбрионы. В этом случае формируется гиперосмотическая внеклеточная среда, приводящая к массивной диффузии криопротекторов наружу из эмбрионов. Кроме того, это вещество обеспечивает задержку воды во внеклеточной среде, предотвращая ее проникновение быстрее, чем отток криопротекторов. На практике размороженные эмбрионы помещаются в 0,25-0,5 М сахарозы в растворе ФБР + сыворотки на 5-10 минут, за чем следует 3 последовательные 5-10-минутные ванны посредством ФБР + сыворотки.

В случае приобретения эмбрионов, у поставщика должны быть запрошены соответствующие протоколы замораживания и оттаивания, а также медицинский сертификат.

У овец доля жизнеспособных эмбрионов после оттаивания выше для тех, что находятся на стадии бластоцистов по сравнению с теми, что находятся на стадии морул (67% против 31%) (де-Пас и др., 1994). У коз наблюдался более высокий показатель выживаемости эмбрионов, находящихся на стадии расширившейся бластоцисты или не имеющих вителлинового слоя (Чеминью и др., 1986; Ли и др., 1990). Единственным недостатком замораживания эмбрионов без вителлинового слоя является отсутствие санитарной защиты.

В отношении овец мы применяли метод медленного замораживания в цилиндре, помещаемым над парами азота. Эмбрионы были упакованы в соломинки, в центральной камере, содержащей 1,5 М этиленгликоля в ФБР + сыворотке, и имеющей 0,25 М фракций сахарозы на обоих концах соломинки. Оттаивание осуществлялось быстро на водяной бане, а фракции объединялись в чашке Петри для проведения классифицирования эмбрионов при помощи увеличительного стекла. Затем немедленно осуществлялся перенос двух эмбрионов в каждую

самку-реципиента. В этом случае мы получали показатели наступления беременности от 30 до 40%.

У коз, несмотря на применение технологии замораживания, аналогичной описанной для овец, мы получили лучшие результаты за счет размещения эмбрионов в ФБР, обогащенном 0,4%-ным бычьим сывороточным альбумином (БСА), и за счет оттаивания в 0,25 М растворе сахарозы в ФБР, за чем следовали 3 последовательные 5-10-минутные ванны посредством ФБР. В каждого реципиента переносились два эмбриона, обеспечивая показатель наступления беременности в 33%.

Технология витрификации

Витрификация представляет собой другую технологию для консервации эмбрионов при более низких температурах. Физический принцип основан на помещении эмбрионов в высокую концентрацию криопротекторов в очень небольшие объемы раствора, позволяя избегать образования кристаллов льда.

Процедура витрификации проводится при комнатной температуре (25°C) с использованием 3-х последовательных погружений эмбрионов в растворы, содержащие увеличивающиеся концентрации глицерина и этиленгликоля в ФБР с 20%-ной эмбриональной бычьей сывороткой (Тральди и др., 1999; Мартинес и др., 2006). Короче говоря, эмбрионы погружаются в: 1) глицерин 10%-ный на 5 минут, 2) глицерин 10%-ный + этиленгликоль 20%-ный на 5 минут и 3) глицерин 25%-ный + этиленгликоль 25%-ный на 30 секунд (Приложение 3). Затем эмбрионы аспирируются на кончиках с 1 мкл вещества (2 эмбриона на кончик) и погружаются в криопробирки с жидким азотом (Гиббонс и др., 2008, 2009).

Девитрификация проводится «на воздухе» при температуре 37°C в течение 6 секунд. Эмбрионы помещаются немедленно на 5 минут в раствор глицерина 12,5%-ного + этиленгликоля 12,5%-ного + 0,5 М сахарозы в ФБР с 20%-ной эмбриональной бычьей сывороткой. Затем они помещаются при комнатной температуре в два раствора 0,5 и 0,25 М сахарозы (по 5 минут на раствор). Наконец, эмбрионы дважды промывают в растворе ФБР + сыворотки (2,5 минуты на раствор) (Гиббонс и др., 2008) (Приложение 3). Используя эту методологию в лабораторных условиях мы получили показатель протрузии эмбрионов на уровне 50% для морул и 81,6% для бластоцист у овец (Гиббонс и др., 2008) и на уровне 61% для бластоцист у коз (Гиббонс и др., 2009). В естественных условиях у овец мы зафиксировали показатель выживаемости эмбрионов на уровне 42% (для морул) и 47% (для бластоцист) и показатель наступления беременности на уровне 50% для обеих эмбриональных стадий (2 эмбриона на реципиент) (Гиббонс и др., 2010). У коз в отношении бластоцист мы получили показатель выживаемости эмбрионов на уровне от 64 до 70% и показатель наступления беременности на уровне от 64 до 86% (2 эмбриона на реципиент) (Тральди и др., 2009; Гиббонс и др., 2010). Этот метод не рекомендуется для проведения витрификации морул коз из-за низкой репродуктивной эффективности.

Репродуктивная эффективность при переносе эмбрионов

Ниже приведены средние контрольные показатели эффективности, зафиксированные во время различных стадий множественных овуляций и ПЭ (обычная процедура применения ФСГ):

Среднее количество желтых тел на одну самку-донора	–	11 у овец, 14-15 у коз
Степень извлечения эмбрионов + яйцеклеток	–	60-70% у обоих видов
Степень оплодотворения при лапароскопическом ИО	–	80% у овец, 75% у коз
Доля отбираемых эмбрионов для замораживания	–	80-90% у обоих видов
Доля отбираемых эмбрионов после оттаивания	–	70-90% у обоих видов
Частота наступления беременности (прямой перенос)	–	70% у обоих видов

Количество потомков от одной самки-донора (подвергшихся процедуре произвольно):

Немедленный перенос эмбрионов: у овец: 4 ягнят на овцу-донора
у коз: 5 козлят на козу-донора

Перенос замороженных эмбрионов: у овец: от 2 до 3,2 ягнят на овцу-донора
у коз: от 2 до 3,6 козлят на козу-донора

Ниже приведены результаты, полученные на опытной станции Барилоче Национального института сельскохозяйственных технологий (INTA) в отношении овец породы Меринос, а также Ангорских коз и коз породы Кристоло:

Среднее количество желтых тел	–	у овец: 13 (a) – 17,5 (b)
	–	у Ангорских коз: 8,6 (b)
	–	у коз породы Кристоло: 16 (a)

Доля эмбрионов, извлекаемых хирургическим путем – 60% у обоих видов

Показатель наступления беременности вследствие немедленного переноса эмбрионов полухирургическим методом – 64% у овец, 60% у коз

Показатель наступления беременности вследствие немедленного переноса полухирургическим методом подвергшихся витрификации эмбрионов – 50% у овец, 64% у коз

(a) Процедура с применением 80 мг ФСГ-П (NIH Фоллитропин-V) + 200 МЕ ГСЖК

(b) Процедура с применением 200 мг ФСГ-П (NIH Фоллитропин-V) + 200 МЕ ГСЖК

Разделение эмбрионов

Возможность разделения эмбрионов позволяет увеличить эффективность с 94 до 131% (рожденных ягнят на каждые 100 разделенных эмбрионов) (Гатика и др., 1984; Чесне и др., 1987). Однако этот метод требует использования дорогостоящего микроманипулятора, что ограничивает его применение. Разделение эмбрионов также предоставляет интересную возможность получения животных-близнецов для целей генетических исследований.

Эффективность показателя наступления беременности при переносе разделенных и замороженных эмбрионов является низкой (5,6%) (Шелтон, 1992).

Обеспечение благоприятных санитарно-гигиенических условий при переносе эмбрионов

Несмотря на существование медицинских норм, риск переноса заболеваний вследствие смешивания живых животных является очень высоким. Процесс ПЭ существенно снижает этот риск, так как эмбрионы являются естественным барьером для бактерий и вирусов (Стрингфеллоу и др., 1991). В случае матерей, инфицированных вирусом катаральной лихорадки овец (BTV), было показано, что могут быть получены эмбрионы, не несущие вреда для здоровья. Следовательно, генетический материал может быть извлечен из инфицированного скота.

Пассивный иммунитет, обеспечиваемый самками-реципиентами, предоставляет бесценную защиту для здоровья плода, и даже более того в случае экспорта эмбрионов в страны, где имеются заболевания, являющиеся экзотическими по отношению к их стране происхождения. Карантинные и транспортные расходы, а также трудности, с которыми сталкиваются животные при адаптации к новой среде (климат, питание и медико-санитарные условия), также актуальны в коммерческом плане при использовании технологии ПЭ.

Международное общество переноса эмбрионов (IETS) создано для обеспечения обмена и распространения научных достижений в сфере ПЭ и связанных с этим технологий. Его комитет по вопросам импорта-экспорта распространяет научно-техническую информацию для разработки медико-санитарных правил в области торговли эмбрионами; им был опубликован важный справочный документ, касающийся общих правил процедуры ПЭ (Международное общество переноса эмбрионов, 1990).

Общие выводы

Перенос эмбрионов может способствовать увеличению численности потомства от генетически улучшенной самки, приводя в среднем к получению четырех потомков в результате процедуры применения множественной овуляции. Последние достижения в области репродуктивной эффективности процедуры ПЭ способствовали увеличению возможности его использования в программах генетического улучшения посредством дальнейшего распространения генов овец с высокой продуктивной ценностью. Необходимо будет и дальше проводить исследования с целью снижения расходов и увеличения количества потомков от овцы-донора. Это будет

способствовать его коммерческому применению, как это уже достигнуто с крупным рогатым скотом.

Не существует никаких сомнений в том, что в настоящее время ввиду медико-санитарных соображений перенос эмбрионов является наиболее безопасным способом для импорта различных высокопродуктивных биотипов. Рост международной торговли генетическим материалом посредством применения процедуры ПЭ говорит о важности данной технологии в обеспечении медико-санитарной защиты от экзотических заболеваний и, кроме того, ее важности в качестве инструмента для повышения объёма животноводческого производства.

Библиографический список

- Альберто Р., Б. Лованитти и К. Виволи. 1993 год. Супероуляция у овец австралийской породы Меринос с использованием ФСГ свиного или овечьего происхождения. *Аргентинский журнал животноводства*, выпуск 13, приложение 1: стр. 59 (абстракт).
- Армстронг Д.Т. и Г. Эванс. 1983 год. Факторы, влияющие на успех процедуры переноса эмбрионов у овец и коз. *Журнал «Териогенология»*, выпуск 19: стр. 31-42.
- Армстронг Д.Т. и Г. Эванс. 1984 год. Внутриматочное осеменение повышает плодовитость замороженной спермы у подвергшихся супероуляторной терапии овец. *Журнал по вопросам репродуктивности и фертильности*, выпуск 71: стр. 89-94.
- Армстронг Д.Т., Б.Г. Миллер, И.А. Уолтон, А.П. Фитзнер и Г.М. Уорнс. 1982 год. Эндокринные реакции и факторы, ограничивающие ответную реакцию фолликулов к ГСЖК и ФСГ. Страницы 8-15 в журнале «Перенос эмбрионов у крупного рогатого скота, овец и коз» (Дж. Шелтон, А.О. Траунсон и Н.В. Мур, под ред.). Австралийское общество репродуктивной биологии, Сидней, Австралия.
- Армстронг Д.Т., А.П. Фитзнер, Г.М. Уорнс и Р.Ф. Симарк. 1983 год. Супероуляторная терапия и перенос эмбрионов у ангорских коз. *Журнал по вопросам репродуктивности и фертильности*, выпуск 67: стр. 403-410.
- Бари Ф., М. Халидб и У. Хэйрсайн. 2003 год. Факторы, влияющие на выживаемость эмбрионов у овец после переноса в рамках программы МОЕТ. *Журнал «Териогенология»*, выпуск 59: стр. 1265-1275.
- Бариль Г., П. Касамитджана, Дж. Перрен и Дж.К. Валле. 1989 год. Производство, замораживание и перенос эмбрионов у Ангорских, Альпийских и Зааненских коз. *Журнал «Гигиена разведения»*, выпуск 24: стр. 101-115.
- Бариль Г., Б. Реми, Б. Лебеф, Дж.К. Валле, Дж.Ф. Бейкерс и Дж. Соманде. 1992 год. Сравнение ФСГ свиного происхождения, ФСГ козлиного происхождения и ФСГ овечьего происхождения в целях стимулирования множественной супероуляции у коз. Страница 126 (абстракт) в трудах 8-ой научной конференции Европейской ассоциации по вопросам переноса эмбрионов, Лион (Франция), 11 и 12 сентября 1992 года. Фонд Марселя Мерье, Лион, Франция.
- Бариль Г. и Дж.К. Валле. 1990 год. Время овуляций у молочных коз, побужденных к супероуляции при помощи фолликулостимулирующего гормона свиного происхождения во время и вне сезона размножения. *Журнал «Териогенология»*, выпуск 34: стр. 303-311.
- Билтон Р.Дж. и Н.В. Мур. 1976 год. Выращивание, хранение и перенос эмбрионов у коз в лабораторных условиях. *Австралийский журнал биологических наук*, выпуск 29: стр. 125-129.
- Бребион П., Г. Бариль, Ю. Когни и Дж.М. Валле. 1992 год. Перенос эмбрионов у овец и коз. *Проблемы зоотехнологий*, выпуск 41: стр. 331-339.
- Когни Ю., Г. Бариль, Н. Пулен и П. Мермиллод. 2003 год. Текущий статус технологий переноса эмбриона у овец и коз. *Журнал «Териогенология»*, выпуск 59: стр. 171-188.
- Когни Ю., Д. Чупин и Дж. Соманде. 1986 год. Влияние изменения пропорции ФСГ/ЛГ во время супероуляторной терапии у овец. *Журнал «Териогенология»*, выпуск 25: стр. 148 (абстракт).
- Когни Ю., 1999 год. Современное состояние переноса эмбрионов у овец и коз. *Журнал «Териогенология»*, выпуск 51: 105-116.
- Кортил Дж.М., Б. Лебеф и Г. Бариль. 1988 год. Искусственное разведение взрослых особей коз и козлят, стимулированных гормонами для овуляции вне сезона размножения. *Исследование проблем мелких жвачных животных*, выпуск 1: стр. 19-35.
- Чех С. и Дж. Серегги. 1993 год. Практический опыт переноса эмбрионов у овец. *Журнал «Териогенология»*, выпуск 39: стр. 207.
- Чемино П., Р. Прокурер, Ю. Когни, П.С. Лефевр, А. Локателли и Д. Чупин. 1986 год. Производство, замораживание и перенос эмбрионов у коз, инфицированных вирусом катаральной лихорадки, без катаральной передачи. *Журнал «Териогенология»*, выпуск 26: стр. 279-290.
- Чесне П., Г. Колас, Ю. Когни, Ю. Герин и К. Севеллек. 1987 год. Производство овец с использованием технологий супероуляции, разделения эмбрионов и их переноса. *Журнал «Териогенология»*, выпуск 27: стр. 379-387.

- Де ла Вега, А.С. и О.Р. Уайльд. 1991 год. Биологические основы криоконсервации. *Аргентинский журнал животноводства*, выпуск 11: стр. 151-165.
- Де Пас П., А.Дж. Санчес, Дж.Г. Фернандес, М. Карбайо, К.А. Домингес, К.А. Чаморро и Л. Анель. 1994 год. Криоконсервация эмбрионов овец посредством витрификации и обычного замораживания. *Журнал «Териогенология»*, выпуск 42: стр. 327-338.
- Дональдсон Л., 1984 год. Производство эмбрионов у суперовулированных коров: Корреляция количества могущих быть перенесенными эмбрионов с общим количеством эмбрионов. *Журнал «Териогенология»*, выпуск 21: стр. 517-524.
- Драйанкорт М.А., Р. Лоренц, Д. Чупин, Р. Уэбб и В. Уилмут. 1988 год. Выживаемость эмбрионов овец, хранимых при температуре 4°C в течение 24 часов. *Журнал «Териогенология»*, выпуск 30: стр. 441-446.
- Эванс Г. и Д.Т. Армстронг. 1984 год. Сокращение переноса сперматозоидов у овец посредством суперовуляторной терапии. *Журнал по вопросам репродуктивности и фертильности*, выпуск 70: стр. 47-53.
- Эванс Г., М.К Голланд, Х.Б. Нотл, П.Х. Шарп и Д.Т. Армстронг. 1984 год. Производство эмбрионов у овец при помощи препаратов ФСГ и лапароскопического внутриматочного осеменения. Страницы 313-315 в трудах «Воспроизводство овец» (Д.Р. Линдсей и Д.Т. Пирс, ред.). Академия наук Австралии и Австралийская корпорация шерсти, Канберра, Австралия.
- Эванс Г., Х.Н. Джаббур и Н.В. Мур. 1986 год. Период внутриматочного осеменения у суперовулированных овец с применением свежей и замороженной спермы. Страница 18 (абстракт) в трудах 8-ой научной конференции Европейской ассоциации по вопросам переноса эмбрионов, Лион (Франция), 11 и 12 сентября 1992 года. Фонд Марселя Мерье, Лион, Франция.
- Фиени Ф., М. Буггин, Д. Таинтуриер, Дж.Ф. Бекерс, Б. Бах-Лийор, Дж.Ф. Брувас и М. Добизэ. 1990 год. Внутриматочное искусственное осеменение при помощи трансперитонеального доступа у коз. *Сборник ветеринарной медицины*, выпуск 166: стр. 479-484.
- Флорес-Фоксворт Г., В.М. Макбрайд, Д.С. Кремер и Л.К. Нути. 1992 год. Сравнение лапароскопического и трансцервикального методов сбора и переноса эмбрионов у коз. *Журнал «Териогенология»*, выпуск 37: стр. 213 (абстракт).
- Гатика Р., М.П. Боланд, Т.Ф. Кросби и Ю. Гордон. 1984 год. Микроманипуляция с морулой овец для получения монозиготных близнецов. *Журнал «Териогенология»*, выпуск 21: стр. 555-560.
- Гиббонс А., Ф. Перейра Бонне, П. Сильвестр и М. Куэто. 2008 год. Витрификации эмбрионов у овец. В трудах первой международной конференции Института по исследованиям и технологиям репродукции животных INITRA. Факультет ветеринарной науки. UBA. 24-26 сентября. Буэнос-Айрес, Аргентина.
- Гиббонс А., А. Тральди, Р.О.К. Сильва, Д.Р. Катто, Д. Пуглиеси, М. Куэто и Ф. Перейра Бонне. 2009 год. Репродуктивная эффективность процесса витрификации эмбрионов коз на кончике микропипетки. Страница 81 в трудах VI конгресса ALEPRyCS, XV Национального конгресса AMTEO и XXIV Национального конгресса AMPCA. Керетаро, Мексика (Компакт-диск).
- Гиббонс А., Ф. Перейра Бонне и М. Куэто. 2010 год. Крионаконечники: простая технология витрификации для эмбрионов овец и коз. На 36-ой Ежегодной конференции IETS/23-м Ежегодном собрании SBTE, Кордоба, Аргентина, 9-13 января.
- Гонсалес Р., Дж.К. Гарсиа Винент, А. Гиббонс и М.И. Куэто. 1991 год. Лапароскопический перенос эмбрионов у овец породы Меринос в Патагонии (Аргентина). На XXIV Всемирном ветеринарном конгрессе, Рио-де-Жанейро, Бразилия.
- Гонсалес-Бульнес А., Дж. Сантьяго-Морено, М.Дж. Косеро и А. Лопес-Себастьян. 2000 год. Эффективность коммерческого препарата ФСГ и фолликулярный статус фолликулярного роста и суперовуляторной реакции у испанских овец породы Меринос. *Журнал «Териогенология»*, выпуск 54: стр. 1055-1064.
- Хейман Ю., К. Винсент, В. Гарнье и Ю. Когни. 1987 год. Перенос замороженных-размороженных эмбрионов у овец. *Ветеринарные записки*, выпуск 24: стр. 83-85.
- Хантон Дж.Р., У.М.К. Максвелл и Дж.П. Райан. 1985 год. Влияние добавления и удаления глицерина и метод переноса жизнеспособности эмбрионов овец. Страница 29 (абстракт) в трудах Конгресса Австралийского общества репродуктивной биологии.
- Международное общество переноса эмбрионов. 1998 год. Страницы 106-107 в Руководстве международного общества переноса эмбрионов (Д.А. Стрингфеллоу и С.М. Зайдель, ред.). IETS, Шампейн, Иллинойс, США.

- Международное общество переноса эмбрионов. 1990 год. Руководство Международного общества переноса эмбрионов, 2-е изд. (Д. А. Стрингфеллоу и С. М. Зайдель, ред.). IETS, Шампейн, Иллинойс, США.
- Джаббур Х.Н., Дж.П. Райан, Г. Эванс и У.М.К. Максвелл. 1991 год. Влияние сезонности, введения ГнРГ и препарата люпина на овариальную и эндокринную реакцию у овец породы Меринос, подвергшихся терапии с использованием ГСЖК и ФСГ-П с целью стимулирования суперовуляции. *Журнал «Репродуктивность, фертильность и развитие»*, выпуск 3: стр. 699-707.
- Ле Галь Ф., Г. Бариль, Дж.К. Валле и Б. Лебеф. 1993 год. Выживание в естественных и лабораторных условиях эмбрионов коз, замороженных в этиленгликоле или глицерине. *Журнал «Териогенология»*, выпуск 40: стр. 771-777.
- Левальски Г., А. Сулен, С. Мейнеке-Тилман и Б. Мейнеке. 1991 год. Трансцервикальный внутриматочный перенос эмбрионов у овец. Страница 160 (абстракт) в трудах 7-ой научной конференции Европейской ассоциации переноса эмбрионов, Кембридж (Великобритания), 13-15 сентября 1991 года. Фонд Марселя Мерье, Лион, Франция.
- Ли Р., А.В.Н. Камерон, П.А. Батт и А.О Траунсон. 1990 год. Максимальный показатель выживаемости замороженных эмбрионов коз достигается на стадиях развития расширившейся бластоцисты, вылупляющейся бластоцисты и вылупившейся бластоцисты. *Журнал «Репродуктивность, фертильность и развитие»*, выпуск 2: стр. 345-350.
- Мартинес А.Г., А. Валкарсель, К.К. Фурнус, Д.Г. Де Матос, Г. Йорио и М.А. де Лас Херас. 2006 год. Криоконсервация получаемых в лабораторных условиях эмбрионов овец. *Исследование проблем мелких жвачных животных*, выпуск 63: стр. 288-296.
- Маккелви У.А.К., Дж.Дж. Робинсон, Р.П. Айткен и И.С. Робертсон. 1986 год. Повторное извлечение эмбрионов у овец при помощи лапароскопии. *Журнал «Териогенология»*, выпуск 25: стр. 855-865.
- Мур Р.М., Дж.К. Осборн и И.М. Кросби. 1985 год. Аномалии яйцеклеток у овец, вызванные гонадотропином, после суперовуляции. *Журнал по вопросам репродуктивности и фертильности*, выпуск 74: стр. 167-172.
- Мур Е.Р., 1980 год. Процедуры и результаты, полученные у овец и коз. Страницы 89-95 в издании «Современная терапия в териогенологии» (Д.А. Морроу, под ред.). WB Saunders, Филадельфия, США.
- Мур Н.В. и Дж. Эпплестон. 1979 год. Перенос эмбрионов у ангорских коз. Австралийский журнал сельскохозяйственных исследований, выпуск 30: стр. 973-981.
- Мур Н.В., и Л.Е.А. Роусон. 1960 год. Перенос яйцеклеток у овец: факторы, влияющие на выживание и развитие перенесенных яйцеклеток. *Журнал по вопросам репродуктивности и фертильности*, выпуск 1: стр. 332 (абстракт).
- Мюллер Дж. 1993 год. Использование технологии искусственного осеменения с применением суперовуляции и переноса эмбрионов в овцеводстве. Технологии производства животных, INTA CD, выпуск 323: стр. 1-8.
- Реми Б., Г. Бариль, Дж.К. Валле, Р. Дюфор, К. Шове, Дж. Сауманде, Д. Чупин и Дж.Ф. Бекерс. 1991 год. Ответственны ли антитела за снижение суперовуляторной реакции у коз, которые подвергались терапии неоднократно с помощью фолликулостимулирующего гормона свиного происхождения? *Журнал «Териогенология»*, выпуск 36: стр. 389-399.
- Ренар Дж.П., Ю. Хейман и Дж. П. Озил. 1982 год., выпуск 126: стр. 22-32. Замораживание коровьих эмбрионов: новый метод оттаивания для цервикального переноса эмбрионов. *Анналы ветеринарной медицины*, выпуск 126: стр. 22-32.
- Ритар А.Дж., П.Д. Белл, П.Дж. О'мей, Т.М. Блэк, Р.Б. Джексон и Н. Мюррей. 1988 год. Суперовуляторная реакция и извлечение эмбрионов у Кашмирских и Ангорских коз после терапии с использованием ФСГ (Фоллитропина) (абстракт). В трудах 20-й ежегодной конференции Австралийского общества репродуктивной биологии, 29-31 августа 1988 года, Университет Ньюкасла, Ньюкасл, Австралия. Австралийское общество репродуктивной биологии, Канберра, Австралия.
- Роусон Л.Е.А. и Р.М. Мур. 1966 год. Перенос эмбрионов у овец: значение синхронизации эструса у животных-доноров и животных-реципиентов. *Журнал по вопросам репродуктивности и фертильности*, выпуск 11: стр. 207-212.
- Шелтон Дж.Н., 1992 год. Факторы, влияющие на жизнеспособность свежих и замороженных-размороженных демиэмбрион овец. *Журнал «Териогенология»*, выпуск 37: стр. 507-514.

- Стрингфеллоу Д.А., К.Р. Ридделл и О. Зуровач. 1991 год. Потенциал процедуры переноса эмбрионов для борьбы с инфекционными заболеваниями в животноводстве. *Новозеландский ветеринарный журнал*, выпуск 39: стр. 8-17.
- Тервит Х.Р., П.Г. Гулд, Р.Д. Маккензи, Д.Т. Кларксон и Дж. Драммондс. 1984 год. Перенос эмбрионов у Ангорских и Зааненских коз. *Новозеландский ветеринарный журнал*, выпуск 33: стр. 77-80.
- Тервит Х.Р., П.Г. Гулд, Р.Д. Маккензи и Д.Т. Кларксон. 1983 год. Технологии и достижения переноса эмбрионов у Ангорских коз. *Новозеландский ветеринарный журнал*, выпуск 31: стр. 67-70.
- Тервит Х.Р. и П.Г. Гулд. 1984 год. Глубокая заморозка эмбрионов овец. *Журнал «Териогенология»*, выпуск 21: стр. 268 (абстракт).
- Тервит Х.Р. и П.Г. Хавик. 1976 год. Модифицированная технология для промывки яйцеклеток из маток овец. *Новозеландский ветеринарный журнал*, выпуск 24: стр. 138 (абстракт).
- Тервит Х.Р. 1986 год. Перенос эмбрионов и искусственное осеменение у ангорских коз. Страницы 12-17 в трудах Мохеровой конференции, Новая Зеландия.
- Торрес С., Ю. Когни и Г. Колас. 1984 год. Перенос эмбрионов у овец. Страницы 215-239 в трудах IX конференции по проблемам овец и коз. INRA-ITOVIC-SPEOC, Париж, Франция.
- Торрес С. и К. Севеллек. 1987 год. Повторные суперовуляции и извлечение эмбрионов хирургическим методом у овец. *Журнал «Развитие репродуктивного питания»*, выпуск 27: стр. 859-863.
- Торрес С., Ю. Когни и Г. Колас. 1987 год. Перенос суперовулированных эмбрионов у овец, полученных при помощи различных ФСГ-П. *Журнал «Териогенология»*, выпуск 27: стр. 407-418.
- Тральди А., Р.О.К. Сильва, Д.Р. Катто, Д. Пуглиеси, Ф. Перейра Бонне и А. Гиббонс. 2009 год. Выживание эмбрионов коз, подвергшихся витрификации на кончике микропипетки, по сравнению со свежими эмбрионами. Страница 404 в трудах ежегодного XVIII Бразильского конгресса по вопросам репродукции животных, Белу-Оризонти МГ, Бразилия. (компакт-диск).
- Тральди А.С., Б. Лебеф, Ю. Когни, Н. Пулен и П. Мермиллод. 1999 год. Сравнительные результаты выживания в лабораторных и естественных условиях подвергшихся витрификации искусственно полученных эмбрионов коз и овец. *Журнал «Териогенология»*, выпуск 51: стр. 175.
- Траунсон А.К.О. и Н.В. Мур. 1974 год. Оплодотворение овец вследствие множественных овуляций и осеменения матки. *Австралийский журнал биологических наук*, выпуск 27: стр. 301-304.
- Цунода Ю. и Т. Суджи. 1989 год. Суперовуляции у несезонных коз Японской местной породы, с особым акцентом на прогресс в развитии эмбрионов. *Журнал «Териогенология»*, выпуск 31: стр. 991-996.
- Валле Дж.К., Г. Бариль, Ф. Ружье, Д. Чупин, Р. Прокурер и Дж.М. Кортить. 1987 год. Обоснованность и воспроизводимость процесса извлечения эмбрионов у молочных коз методом лапароскопии. Страница 60 (абстракт) в трудах 3-ей научной встречи Европейской ассоциации переноса эмбрионов, Лион (Франция), 4 и 5 сентября 1987 года. Фонд Марселя Мерье, Лион, Франция.
- Валле Дж.К., и Г. Бариль. 1990 год. Влияние периода лапароскопического внутриматочного осеменения у суперовулированных молочных коз. Страница 188 (абстракт) в трудах 6-ой научной встречи Европейской ассоциации переноса эмбрионов, Лион (Франция), 7 и 8 сентября 1990 года. Фонд Марселя Мерье, Лион, Франция.
- Валле Дж.К., П. Касамитджана, П. Бребион и Дж. Перрен. 1991 год. Технологии производства, консервации и переноса эмбрионов у мелких жвачных животных. *Сборник ветеринарной медицины. Специальная репродукция жвачных животных*, выпуск 1: стр. 293-230.
- Уокер С.К., Д.Х. Смит, А. Френшам, Р.Дж. Ашман и Р.Ф. Симарк. 1989 год. Применение терапии с использованием синтетического гонадотропин-рилизинг гормона при сборе эмбрионов у овец. *Журнал «Териогенология»*, выпуск 31: стр. 741-752.
- Уокер С.К., Д.Х. Смит и Р.Ф. Симарк. 1986 год. Периоды множественных овуляций у овец после терапии с использованием ФСГ или ГСЖК с и без ГнРГ. *Журнал по вопросам репродуктивности и фертильности*, выпуск 77: стр. 135-142.
- Уорвик Б.Л., Р.О. Берри и У.Р. Хорлашвер. 1934 год. Результаты спаривания баранов с ангорскими козами. *Труды Американского общества животноводства*, выпуск 34: стр. 225 (абстракт).

- Уиттингем Д.Г., С.П. Лейбо и П. Мазур. 1972 год. Выживаемость эмбрионов мыши, замороженных до температуры -196°C и -296°C . *Наука*, выпуск 178: стр. 411-414.
- Уилмут Ю. и Л. Роусон. 1973 год. Эксперименты по консервации эмбрионов коровы при низких температурах. *Ветеринарные записки*, выпуск 92: стр. 686-690.
- Уилладсен С.М., К. Польдж, Л.Е.А. Роусон и Р.М. Мур. 1976 год. Глубокое замораживание эмбрионов овец. *Журнал по вопросам репродуктивности и фертильности*, выпуск 46: 151-154.
- Уинтербергер-Торрес С. и К. Севеллек. 1987 год. Атлас раннего развития эмбрионов у овец. Издание INRA, Париж, Франция.
- Уольф М., А. Гиббонс, М. Куэто, П. Уиллемс и Дж. Арриго. 1994 год. Результаты искусственного осеменения с использованием замороженной спермы у овец австралийской породы Меринос, подвергшихся множественной овуляции с помощью ФСГ-П. Страница 269 (абстракт) в трудах IV Всемирной конференции по вопросам породы Меринос, Монтевидео, Уругвай.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1. Классы качества эмбрионов

Класс I, Отличный, идеальный эмбрион, сферический, симметричный, с клетками одинакового размера, цвета и текстуры. Развитие эмбриона соответствует дню извлечения эмбриона. Видимые дефекты отсутствуют. Бластомеры четко видны, а вителлиновый слой не поврежден.

Класс II, Хороший, наличие некоторых незначительных дефектов, эмбрион имеет всего несколько бластомеров, отделенных от клеточной массы, и/или имеет небольшое количество везикул (пузырьков). Он может иметь слегка неправильную форму.

Класс III, Приемлемый, эмбрион имеет определенные дефекты: клеточный детрит, неправильная форма, очень темный или очень светлый цвет и/или небольшие трещины в вителлиновом слое. Имеется небольшое количество вырожденных клеток, везикул и отделенных бластомеров.

Класс IV, Плохой, у эмбриона наблюдаются серьезные дефекты: те, которые соответствуют Классу III, плюс замедленное развитие, серьезные разрывы в вителлиновом слое (эмбрион может быть частично смещен с него), очень несимметричная форма, тенденция распадаться с образованием гранул и вакуолей в бластомерах. Включает в себя стадии до 8 клеток и дегенерацию. Данный класс эмбриона не подлежит переносу.

Приложение 2. Среда для замораживания

Для приготовления 1 М раствора этиленгликоля добавьте его 5,59 мл к 100 мл ФБР с 20%-ной эмбриональной бычьей сывороткой. С помощью простого расчета можно получить пропорции этиленгликоля для 0,5 и 1,5 М концентраций.

Для приготовления 0,25 М раствора сахарозы добавьте 8,56 г сахарозы к 100 мл ФБР с 20%-ной эмбриональной бычьей сывороткой.

Приложение 3. Технология витрификации (Гиббонс и др., 2008, 2009)

Растворы для процедуры витрификации

Раствор 1

4,5 мл раствора А* + 0,5 мл глицерина (10%)

5 минут при температуре 25°C

Раствор 2

3,5 мл раствора А + 0,5 мл глицерина (10%) + 1 мл этиленгликоля (20%)

5 минут при температуре 25°C

Раствор 3

2,5 мл раствора А + 1,25 мл глицерина (25%) + 1,25 мл этиленгликоля (25%)

30 секунд при температуре 25°C

Растворы для процедуры нагревания

Раствор 1

3,75 мл раствора А + 0,625 мл глицерина (12,5%) + 0,625 мл этиленгликоля (12,5%) + 0,86 г сахарозы (0,5 М)**

5 минут при температуре 25°C

Раствор 2

5 мл раствора А + 0,86 г сахарозы (0,50 М)

5 минут при температуре 25°C

Раствор 3

5 мл раствора А + 0,43 г сахарозы (0,25 М)

5 минут при температуре 25°C

Раствор 4

5 мл раствора А

2,5 минуты при температуре 25°C

Раствор 5

5 мл раствора А

2,5 минуты при температуре 25°C

* Раствор А: 28 мл ФБР + 7 мл сыворотки (ФБР + 20% эмбриональная бычья сыворотка)

** РМ сахарозы: 342,296 г (для 0,5 М раствора = Добавить 171,148 г сахарозы к 1000 мл раствора)



Фото 1. Яичники с множественными овуляциями после применения процедуры с использованием 80 мг ФСГ и 200 МЕ ГСЖК.

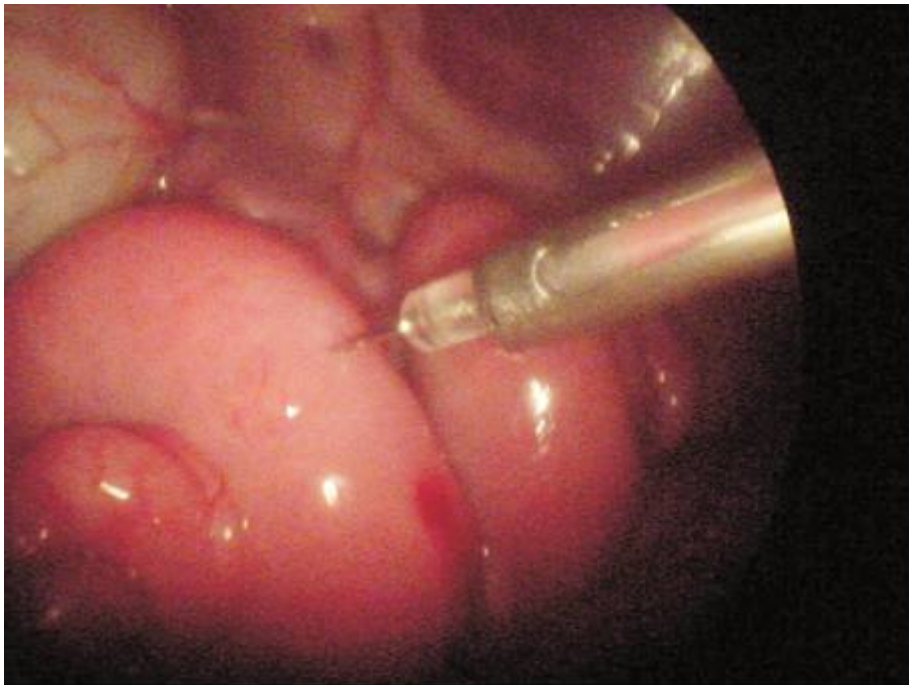


Фото 2. Внутриматочное искусственное осеменение при помощи замороженной спермы посредством проведения лапароскопии у овец-доноров.



Фото 3 и 4. Прокол и фиксация катетера к рогу матки (маточно-трубному соустью) для извлечения эмбрионов хирургическим методом.

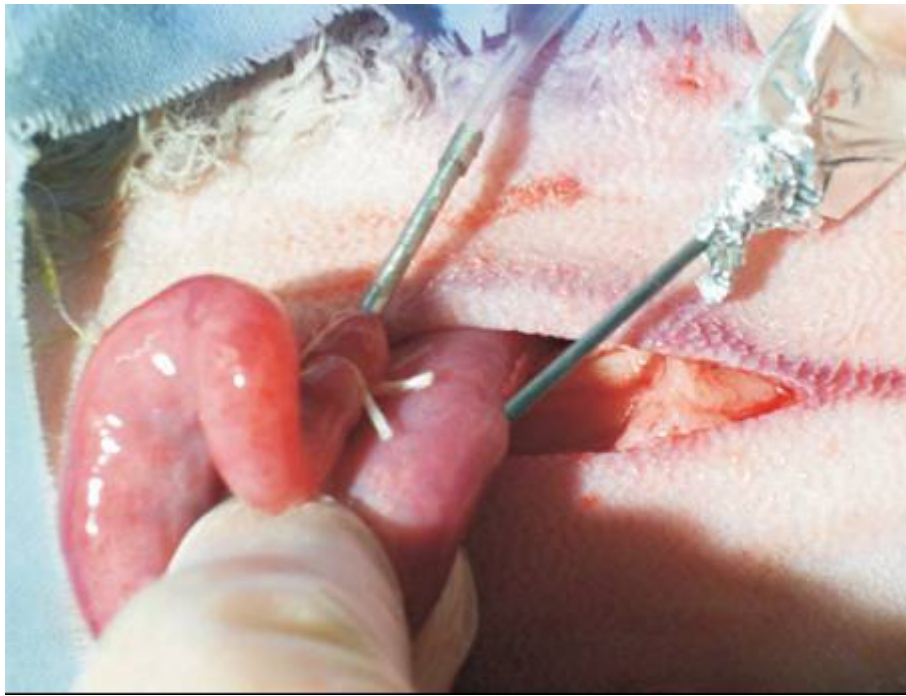


Фото 5 и 6. Прокол рога матки (дистальной трети) и извлечение эмбрионов посредством промывания струей



Фото 7. Извлечение эмбрионов посредством промывания струей в колбе Эрленмейера.



Фото 8. Обнаружение и оценка эмбрионов при помощи увеличительного стекла.



Фото 9. Прокол рога матки (проксимальной трети) для переноса эмбрионов полухирургическим методом.

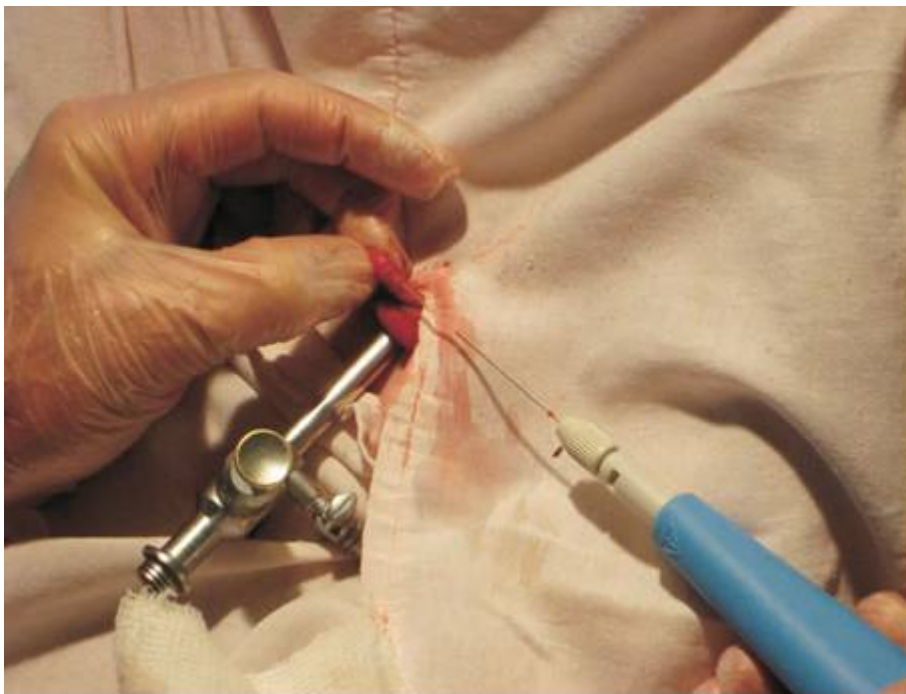


Фото 10. Перенос эмбрионов полухирургическим методом посредством экстериоризации рога матки при помощи зажима.