**Введение**

Под трансплантацией зародышей понимают перенос зародышей из половых органов животных-доноров в половые органы животных-реципиентов. При этом в организме реципиентов наступает нормальная беременность с развитием зародышей, а затем и плодов (А.П. Студенцов, 1999).

Современное сельскохозяйственное производство базируется на и использовании высокоэффективных технологий производства молока мяса, обеспечивающих получение прибыли. В связи с этим необходимо ускоренное создание новых пород, линий, семейств высокопродуктивного скота с качествами, удовлетворяющими требованиям конъюнктуры рынка. Мощным средством реализации поставленных задач наряду с искусственным осеменением, является метод трансплантации эмбрионов, позволяющий значительно снизить генерационный интервал и ускорить оценку матерей быков, обеспечить размножение животных с высокой генетической ценностью и малочисленных пород (М.И. Прокофьев, 1998).

В связи с необходимостью совершенствования скота черно-пестрой породы в 70-е годы прошлого столетия осуществлялся завоз животных голштинской породы. Их помеси на территории Российской Федерации интенсивно Результатом использовались в условиях промышленной технологии скрещивания и длительной работы с помесными стадами первого-четвертого поколения к 2005 году в черно-пестрой породе были апробированы 6 типов: «Ирменский», «Уральский», «Ленинградский», «Непецинский», «Московский», «Барыбинский». Это позволило создать новую племенную базу черно-пестрой породы и обеспечить возможность разведение скота при ограниченном импорте племенного материала из-за рубежа. В настоящее время эти типы сформировали современную структуру породы. При этом обеспечивается выведение высокоценных племенных быков, которые поддерживают сформированную генетическую структуру породы.

В настоящее время, несмотря на то, что численность высокопродуктивных коров с удоем свыше 7000 кг молока за лактацию в отдельных стадах нашей страны возросла, обеспечить систематическое и достаточное воспроизводство ремонтных быков от полновозрастных коров затруднительно. Это связано с малой подготовленностью кадров, территориальным удалением недостаточным племенных заводов от научных центров, государственной материальной и обеспечением информационной поддержки мероприятий по трансплантации эмбрионов. Поэтому одной из первейших задач в нашей стране должна стать разработка системы воспроизводства высокоценного племенного материала с помощью трансплантации эмбрионов. В настоящее время в мировой практике около 80% быков, находящихся на племенных предприятиях и используемых в системе искусственного осеменения, получены путем трансплантации эмбрионов. В нашей стране работы по пересадке эмбрионов и совершенствованию аспектов самого метода, начатые в 70-х годах прошлого века, широкого внедрения в практику племенного скотоводства пока не получили. Однако, в связи с переходом на новые социально-экономические отношения и необходимостью дальнейшего совершенствования крупного рогатого скота, интерес к современным технологиям разведения, кормления и содержания животных возрастает. Одним из путей повышения эффективности отрасли, совершенствования скота на региональном уровне и отдельных хозяйств является воспроизводство и селекция высокопродуктивных животных (И.Р. Чернева, 2007).

1. **Перспективы внедрения трансплантации эмбрионов**

На современном этапе одним из основных методов совершенствования молочного скота является искусственное осеменение. Однако оно не обеспечивает в достаточной мере ускоренного выведения животных с высокими показателями продуктивности.

В сложившейся ситуации метод трансплантации эмбрионов открывает огромные возможности в разведении и воспроизводстве крупного рогатого скота как с целью повышения эффективности племенной работы, так и увеличения производства говядины за счет получения двоен (И.Р. Чернева, 2007).

Трансплантация эмбрионов открывает огромные перспективы ускорения темпов селекционного прогресса в животноводстве.

С внедрением в практику разведения животных метода искусственного осеменения резко возросли масштабы использования высокоценных племенных производителей для получения потомства, между тем как влияние маточного поголовья на селекционный процесс осталось прежним. Так, от коровы за всю ее жизнь получают 3–6 потомков, между тем как потомство от быков – улучшателей исчисляется десятками и сотнями тысяч голов.

Однако биологические возможности маточного поголовья для воспроизводства также велики, если учесть, что яичники содержат огромное количество потенциальных яиц.

Современная технология трансплантации эмбрионов позволяет получить от коровы – рекордистки за ее жизнь несколько десятков телят. В США от одной коровы голштинской породы с выдающейся молочной продуктивностью получили 131 теленка. В одном из фермерских хозяйств США за 6 сборов от пяти коров заморозили 201 эмбрион, получили 113 телят.

Трансплантация эмбрионов расширяет возможности обмена генетическим материалом между странами и континентами. Транспортировка эмбрионов несравненно проще и дешевле, чем животных; к тому же отпадают ветеринарные проблемы, поскольку прочная оболочка непроницаема как для бактерий, так и для вирусов.

США, Канада, Англия, Новая Зеландия осуществляют экспорт эмбрионов в десятки стран мира. В Оренбургской области уже много лет функционирует смешанная англо – российская фирма по заготовке и экспорту эмбрионов оренбургских пуховых коз.

В молочном скотоводстве крупномасштабное воздействие метода эмбриопересадок на генетических прогресс достигнуто путем комплектования центров и станций исскуственного осеменения быками – трансплантатами, полученными от наиболее выдающихся родителей плановых пород. Так, уже в 1986 г. в центрах искусственного осеменения США и Канады было свыше 100 быков – трансплантатов.

Расчеты показывают, что трансплантация эмбрионов усиливает ежегодный генетический прогресс в животноводстве на 3%.

Метод трансплантации эмбрионов в перспективе может быть использован для создания генофонда редких и исчезающих пород животных.

Разработка техники культивирования ооцитов позволяет получить потомство от животных, выбывших из эксплуатации.

Уже в настоящее время трансплантация эмбрионов становится неотъемлемой составной частью селекционных программ (Н.И. Полянцев, 2001).

Целью настоящей работы является разработка путей разведения крупного рогатого скота молочных пород с использованием трансплантации эмбрионов, совершенствование признаков селекции широко распространенных и исчезающих пород скота. Обоснование подходов, направленных на выведение и оценку коров и быков с высокой племенной ценностью, ускоренное размножение перспективных родственных групп, разработка элементов системы МОЭТ то есть программы множественной овуляции и эмбриотрансплантации. Первая такая программа была разработана в Великобритании F.W. Nicholas, С. X. Smith в 1983 году. Она предусматривала разведение ядра по форме закрытой популяции, но в последующем, по предложению ТНЕ Meuwissen, схема была изменена и принято разведение по форме открытой популяции. Коровы-доноры приобретались из других хозяйств, а само стадо получено пересадкой эмбрионов от высокоценных доноров и производителей из Северной Америки. Подобные программы в последующем были разработаны в Германии, Австрии, Франции и других странах с целью получения маток для использования в качестве матерей быков-производителей.

Разработан и обоснован метод ускоренной оценки племенной ценности быков – трансплантатов. Предложена техника проведения маркирования достоверности и семейного анализа при паспортизации генетического и контроле Показаны происхождения животных – трансплантатов. возможности ускоренного создания семейств коров методом трансплантации эмбрионов; разработаны и адаптированы к условиям РФ элементы системы МОЭТ. Практическая проведенные значимость работы заключается в том, что исследования позволили разработать способы ускорения темпов разведения высокоценного скота черно-пестрой породы методами трансплантации эмбрионов. Предложены искусственного способы осеменения и иммунной племенной ускоренной оценки ценности быков – трансплантатов, позволяющие значительно раньше начать использование семени молодых быков – трансплантатов, в полтора раза сократить сроки создания высокоценных семейств коров-доноров эмбрионов (И.Р. Чернева, 2007).

1. **Отбор доноров**

Донор – это высокоценное, выдающееся животное, от которого после гормонального вызывания полиовуляции и осеменения спермой проверенного производителя – улучшателя получают несколько зародышей. Отбирают только тех животных, которые обладают способностью к множественной овуляции и дают в течение длительного срока их использования большое количество зародышей, пригодных к пересадке. В качестве доноров лучше использовать здоровых коров в возрасте от 4 до 5 лет с хорошо развитой молочной железой, пригодной к машинному доению, и у которых не было каких-либо осложнений родов и послеродового периода. Первая стадия возбуждения полового цикла после родов должна быть синхронной и полноценной, с ярко выраженными феноменами: течки, полового возбуждения и охоты.

Операция пересадки зародышей экономически выгодна только в том случае, когда в качестве доноров берут выдающихся в племенном отношении животных. В некоторых случаях для получения зародышей рекомендуют использовать ценных в племенном отношении коров в заключительные сроки их продуктивной жизни, чтобы получить от них больше потомков (А.П. Студенцов, 1999).

В большинстве случаев в качестве коров-доноров отбирают матерей потенциальных племенных быков. Благодаря этому обеспечивается высокий селекционный дифференциал. Оценка и отбор коров-доноров, выделенных в группу матерей быков, проводят в два этапа. На первом этапе племенная ценность донора оценивается по главным признакам молочного скота – по уровню молочной продукции и жирномолочности. На втором этапе, когда отобраны доноры с высокой племенной ценностью по главным признакам, число признаков в зависимости от цели селекции расширяется. К ним относят форму вымени и сосков, свойства молокоотдачи, резистентность, крепость костяка и копыт, тип и воспроизводительные качества.

Нужно иметь в виду, что оценка коровы-донора по родословной и собственной продуктивности является не окончательной, так как в этом случае не учитывается эффект расщепления и рекомбинации генов. Поэтому окончательно оценивать корову-донора можно только при получении и оценке ее потомства.

Высокие затраты на получение телят путем трансплантации эмбрионов обусловливают необходимость отбирать таких доноров, от которых регулярно можно получать большое количество эмбрионов. Предпочтение следует отдавать коровам, сохранившим в течение трех отелов стабильную воспроизводительную способность. Исследованиями установлено, что потенциальные коровы-доноры с хорошими и устойчивыми воспроизводительными способностями отличаются предрасположенностью к воспроизводству эмбрионов, которые можно регулярно получать через каждые два месяца.

Межотельный период является интегральным показателем воспроизводительной способности коров. Его составные части: сервис-период и период стельности.

Сервис-период более точно и намного раньше, чем интервал между отелами, выявляет потенциальные возможности воспроизводительной функции у коров. Он тесно связан с межотельным периодом (коэффициент корреляции составляет 0.9). Оптимальный сервис-период не должен превышать 80 дней. Однако анализ сервис-периода, проведенный в ведущих племенных стадах черно-пестрой породы, показал, что данный показатель воспроизводительной функции коров имеет высокий коэффициент изменчивости, который составил 61%.

Сервис-период в основном зависит от интервала между отелом и первым осеменением, и интервала между первым и последним, т.е. эффективным осеменением. Высокопродуктивных коров следует осеменять на втором месяце после нормального отела. Это обусловлено тем, что первый половой цикл проявляется слабо, половая охота клинически плохо определяется или вовсе не обнаруживается.

Первое осеменение коров на втором месяце после отела не удлиняет сервис – и межотельный период. При оптимальном сервис-периоде до 80 дней после первого и второго осеменений средняя оплодотворяемость коров составляет 95–98%, а продолжительность межотельного периода не превышает одного года.

Для оценки воспроизводительных способностей коров, отобранных в качестве потенциальных доноров, необходимо анализировать такие параметры как оплодотворяемость от первого осеменения и индекс осеменения. При правильной технике осеменения и своевременном определении половой охоты оплодотворяемость коров от первого осеменения должна составлять в среднем 60%.

Важным показателем воспроизводительной способности коров является индекс осеменения, т.е. количество осеменений на одно оплодотворение. Индекс осеменения характеризуется высокой степенью изменчивости – коэффициент вариабельности может достигать 70%. Существенное влияние на изменчивость индекса осеменения оказывают такие факторы, как продолжительность периода от отела до первого осеменения, своевременное выявление коров в половой охоте, оплодотворяющая способность спермы быка и др. Индекс осеменения коров, выделенных в группу потенциальных доноров, не должен превышать 1.5. У коров-доноров при всех отелах должны отсутствовать осложнения (мертворождаемость, задержание последа, послеродовые заболевания половых органов).

Через 15–20 суток после отела ветеринарный специалист методом ректальной пальпации контролирует у потенциальной коровы-донора состояние половых органов, чтобы исключить такие нарушения воспроизводительной функции как киста яичника, гипофункция, воспаление яичниковой связки, эндометриты (Б.П. Завертяев, 1999).

1. Суперовуляция

Важным звеном в трансплантации эмбрионов крупного рогатого скота является гормональное вызывание суперовуляции у коров-доноров. В группу доноров переводят только тех коров, которые положительно реагируют на введение гормонов. Для стимуляции множественной овуляции используют гонадотропин СЖК в сочетании с простагландинами и другими биологически активными веществами. Этот способ, как показывает практика, позволяет вызвать суперовуляцию примерно у 70% коров.

Одним из существенных недостатков этого способа суперовуляции является крайне высокая степень вариабельности числа овуляций, даже при использовании одной и той же концентрации гонадотропина СЖК. Она составляет от 0 до 50 овуляций на одну корову-донора. Оптимальным результатом суперовуляции является выход из яичника в воронку яйцепровода 10–20 яйцеклеток.

По современному представлению реакция коров на суперовуляцию в значительной степени определяется количеством и качеством фолликулов яичников во время их стимуляции гонадотропинами. Экспериментально было доказано, что во время суперовуляции для получения хорошей реакции необходимо наличие определенного количества малых антральных фолликулов, чувствительных к гонадотропной стимуляции. Недостаток таких фолликулов, или напротив, наличие больших по размеру фолликулов снижают уровень реакции или она вообще отсутствует. Это может свидетельствовать об интраовариальном регулировании процесса суперовуляции. Поскольку фолликулы растут асинхронно, то в каждый период инъекция гонадотропинов будет оптимальной лишь для ограниченного числа фолликулов.

Кроме размера фолликула, на реакцию введения гонадотропинов существенное влияние оказывает интенсивность митотического индекса, которая у нормального фолликула повышается при формировании полости. Установлено что высокий митотический индекс неатретических фолликулов положительно коррелирует с интенсивностью суперовуляции.

Имеются данные, свидетельствующие о том, что на реакцию гонадотропинов отвечают только те малые антральные фолликулы, размеры которых не превышают 2 мм. Установлено что такие фолликулы гормонально активны и быстро овулируют.

Атретические фолликулы с высоким митотическим индексом, напротив, не овулируют, а после прохождения фазы лютеинизации подвергаются её воздействию и имитируют наличие жёлтого тела.

Следовательно, для эффективной суперовуляции решающим является физиологическое состояние фолликулов в лютеальной фазе яичника.

Анализ работы станций по пересадке эмбрионов показал, что хорошими донорами можно считать коров, которые после многократных суперовуляций имеют хорошую реакцию яичника и производят большое число пригодных для пересадки эмбрионов за одно вымывание. Однако лишь небольшая часть доноров обнаруживает повторную реакцию яичников после вызывания суперовуляции. В основном же коровы-доноры нерегулярно отвечают на повторную гормональную обработку, поэтому количество овуляций и выход эмбрионов не являются стабильными.

Для оценки предрасположенности, или потенциальной изменчивости коров на пригодность в качестве доноров, были рассчитаны варианты признаков, на основе которых был определен коэффициент повторяемости. Рассчитанные коэффициенты повторяемости признаков предрасположенности коров в качестве доноров колебались в пределах 17.3–23.3%. Это свидетельствует о том, что по итогам оценки за первое вымывание эмбрионов надежность повторного результата составит лишь 20%. Следовательно, по оценке признака пригодности за первое вымывание эмбриона невозможно достоверно судить о пригодности коровы в качестве донора.

Изменчивость пригодности коров в качестве доноров включает наследственные и ненаследственные факторы. Причем вклад ненаследственных факторов значительно выше вклада факторов генетических.

Отмечено, что прекращение кормления донора после обработки гонадотропинами достоверно уменьшает реакцию яичника на введение гормонов. Для суперовуляции и получения биологически полноценных эмбрионов необходимо обеспечить полноценное кормление донора, сбалансированное не только по основным питательным веществам, но особенно по аминокислотам и микроэлементам. Кормление доноров должно быть таким, чтобы они находились в хорошем физиологическом состоянии.

Для получения суперовуляции наиболее широкое распространение во многих странах мира получил ГСЖК с простагландинами.

Хороших результатов суперовуляции можно ожидать, когда к моменту инъекции гонадотропина в яичниках коровы функционирует желтое тело диаметром 1.5 см. При наличии в одном из яичников развитого фолликула диаметром 10 мм полиовуляция снижается. Интенсивность множественной овуляции также снижается, когда кроме хорошо развитого желтого тела в яичнике находится развитый фолликул, фолликулярная или лютеиновая киста. Следовательно, эффективность суперовуляции в большой степени определяется физиологическим состоянием яичников.

На число овуляций существенное влияние оказывает интервал между временем введения ГСЖК и началом половой охоты. Определен оптимальный интервал, во время которого можно получить наибольшее количество овуляций, он составляет 4–7 суток. При уменьшении этого срока до 1–3 суток число овуляций существенно снижается, а при увеличении свыше 7 суток, хотя число овуляций возрастает, но формируются. (М.И. Прокофьев, 1998)

Для вызывания суперовуляции у крупного рогатого скота используются гонадотропные препараты (гонадотропин сыворотки жеребых кобыл – ГСЖК и фолликулостимулирующий гормон – ФСГ – гипофиза животных), для синхронизации половых циклов – аналоги простагландина Ф2-альфа (эстрофан, магэстрофан, клопростенол, суперфан, ремофан, клатрапростин, эстуфалан и др.). Препараты ГСЖК обладают комплексной фолликулостимулирующей и лютеинизирующей активностью. Период полураспада экзогенного ГСЖК у коров составляет около 6 дней. Соотношение ФСГ и ЛГ в различных партиях неодинаковое, что сказывается на результативности суперовуляции. Стимуляция роста фолликулов препаратами ГСЖК сопровождается, как правило, увеличением массы яичников, образованием после овуляции разного числа и величины желтых тел. Из-за длительного распада ГСЖК в крови животных накапливаются повышенные концентрации гормонов. Изменение эндокринного статуса при индукции суперовуляции может оказывать неблагоприятное действие на оплодотворяемость яйцеклеток, развитие зародышей, а также на физиологическое состояние половых органов (в частности, наблюдается кистозное перерождение яичников). Для исключения длительной стимуляции роста фолликулов применяется анти-СЖК. Обработка антисывороткой в день проявления охоты нейтрализует циркулирующую в крови животных ГСЖК и тем самым прекращает дальнейшую стимуляцию роста фолликулов в яичниках. Это создает более благоприятный фон для овуляции, оплодотворяемости яйцеклеток и последующего развития зародышей. В практике используются стандартные гонадотропные препараты высокой степени очистки: сергон (Чехия), фоллигон (Голландия), прегмагон (Германия). Эти препараты инъецируют донорам на 11–12-ый день полового цикла, однократно, в дозе 50 И.Е. на 100 кг живой массы животного. Применение этих гонадотропинов обеспечивает вызывание множественной овуляции у 75–78% животных и получение в среднем 3,5–4,0 жизнеспособных эмбриона на донора.

Опыт работы по вызыванию суперовуляции у коров-доноров сывороточными и гипофизарными препаратами показал, что при использовании гипофизарных гормонов (ФСГ-п, ФСГ-супер, фолликотропин, фоллитропин) получаются более стабильные и высокие результаты суперовуляции и эмбриопродукции. Так, процент коров-доноров, реагирующих на обработку сывороточными гонадотропинами, составил 75,0–78,3%, гипофизарными препаратами – 85,3–88,8%, число овуляций на донора – соответственно 8,3–9,7 и 10,2–12,0, количество пригодных эмбрионов – 3,5–4,0 и 5,5–6,1 (Б.П. Завертяев, 1999).

эмбрион корова трансплантация осеменение

1. **Осеменение коров-доноров**

Результаты суперовуляции определяются эффективным осеменением коров-доноров. Проблема оплодотворения яйцеклеток и получения биологически полноценных эмбрионов все ещё остается открытой. Как показывают результаты исследований, только 60–65% эмбрионов пригодны для трансплантации, остальные яйцеклетки, образовавшиеся в результате гормональной обработки гонадотропинами, оказываются либо неоплодотворенными, либо после оплодотворения отстают в развитии или дегенерируют. Причина этих нарушений остается неизвестной (Н.И. Полянцев, 2001).

Для их осеменения берут сперму выдающихся быков-производителей, проверенных по качеству потомства и признанных улучшателями продуктивности. Имеются доказательства, что при использовании некоторых быков достигается более высокая степень оплодотворяемости коров – доноров, поэтому следует оценивать быков и по данному показателю. Отбор быков и работу со спермой проводят с соблюдением ветеринарно-санитарных правил и согласно действующей инструкции по искусственному осеменению коров и телок. После гормональной обработки доноров у них с помощью быков-пробников выявляют половую охоту не менее двух раз в день. Примерно у 10 – 12% животных признаки стадии возбуждения полового цикла не проявляются. Осеменение животных, у которых обнаружена охота, проводят несколько раз с 12-часовыми интервалами до ее окончания, иногда его повторяют 3–4 раза. В каждой дозе спермы должно быть не менее 40–50 млн живых подвижных спермиев. Чаще используют способ осеменения с ректальной фиксацией шейки матки, сперму вводят в ее канал.

Некоторые зарубежные авторы предлагают вводить сперму в полость тела матки. Имеются также рекомендации вводить одну порцию спермы в левый, а вторую – в правый рог матки. Свежие спермии сохраняют жизнеспособность в половых путях самок дольше, чем замороженные и оттаянные. Поэтому при использовании свежей спермы в течение охоты можно проводить 1–2 осеменения. При этом достигается более высокая степень оплодотворяемости. Нецелесообразно осеменять доноров в отдаленные сроки после окончания охоты, поскольку в дальнейшем это может оказывать вредное влияние на степень извлечения пригодных к пересадке зародышей (А.П. Студенцов 1999).

1. **Извлечение и оценка эмбрионов**

Оплодотворение яйцеклеток происходит в яйцепроводе. Образовавшиеся зиготы подвергаются дроблению, и большинство из них у крупного рогатого скота попадают в матку на 4-й день. Зародыши целесообразно извлекать у коров на 7–8-й день после первого осеменения (до освобождения зародыша из прозрачной оболочки). Для извлечения зародышей используют 2 способа: не хирургический и хирургический.

При не хирургическом способе извлечения зародыше животных фиксируют в станке. Прямую кишку освобождают от содержимого и проводят тщательное ректальное исследование. Определяют, сколько желтых тел находится в каждом яичнике. Хвост с помощью тесемки фиксируют. Проводят туалет и дезинфекцию наружных половых органов и промежностей. Для прекращения перистальтики прямой кишки эпидурально вводят 10 мл 2%-ного раствора новокаина. Для вымывания зародышей из матки применяют различные инструменты. Используют гибкий одноходовой катетер Фолея с упругим мандреном и надувным баллончиком. Инструмент должен быть стерильным. Сначала катетер вводят во влагалище по верхнему его своду и проводят под ректальным контролем через канал шейки матки в рог матки. Для более полного извлечения зародышей нужно, не травмируя слизистую оболочку, как можно глубже ввести инструмент в рог матки после того как катетер достигнет в роге матки необходимого положения, мандрен удаляют и в баллончик катетера накачивают 10–15 мл воздуха. При этом катетер фиксируется в роге матки и промывная жидкость не вытекает мимо катетера.

Закрепив катетер, промывают полость рога матки с помощью шприца Люэра вместимостью 50–60 мл. В рог матки в зависимости от его величины вводят порциями от 40–60 мл промывной жидкости, затрачивая на промывание каждого рога не более 500 мл. Наполнение матки промывной средой и степень ее оттока контролируют ректально.

Для более полного извлечения зародышей верхушку рога матки приподнимают и выпрямляют. Некоторые авторы рекомендуют яйцепровод вблизи верхушки рога матки осторожно зажать большим и указательным пальцами. При этом предотвращается поступление в брюшную полость жидкости, содержащей зародыши. Но практика показывает, что поступление в брюшную полость жидкости из рога матки отмечается только при наличии большого давления в матке, поэтому яйцепровод можно не зажимать. Перед извлечением катетера следует удалить воздух из баллончика. Таким же образом промывают и второй рог.

В качестве среды для промывания используют фосфатно-буферный солевой раствор (ФБС) Дюльбекко.

Раствор готовят на тридистиллированной воде. Первые 4 вещества растворяют 800 мл, а 5-е и 6-е каждый отдельно в 100 мл. в итоге получают три раствора которые автоклавируют, а затем смешивают. В таком виде их можно хранить при 4 градусах до 2 недели. Непосредственно перед употреблением в ФБС вводят следующие компоненты (в расчете на один литр): альбумин бычьей сыворотки – 4г; глюкоза – 1г; натрий-пироват – 0,036г; пенициллин – 100 тыс. ЕД.

Собранную в цилиндр промывную жидкость отстаивают 20–35 мин. при температуре 20–37 градусов, чтобы зародыши опустились на дно, после чего верхний слой удаляют с помощью сифона. Нижний слой жидкости порционно по 20–30 мл для обнаружения зародышей исследуют в больших часовых стеклах или чашках Петри под бинокулярной лупой при 10–50-кратном увеличении. Найденных зародышей при помощи пастеровской пипетки переносят в среду для кратковременного хранения (среда Дюльбекко с добавлением 20% фетальной сыворотки теленка). После оценки зародышей их культивируют при 37 градусах до момента пересадки или оставляют для хранения.

Хирургическим способом зародышей извлекают при общем или местном обезболивании. Разрезают брюшную стенку по белой линии или чаще в области голодной ямки справа или слева, подтягивают рог матки к поверхности раны, делают разрез вблизи его основания и вставляют специальный катетер. Затем через иглу, введенную в полость рога у его верхушки, или через канюлю, вставленную в яйцепровод, вводят специальную среду, которую вместе с зародышами собирают через катетер. При этом методе получают до 70% жизнеспособных зародышей. У коровы можно извлекать зародышей непосредственно из яйцепровода (в течение первых 4 дней после осеменения). Но хирургический способ, по мнению многих специалистов, имеет лишь научное значение. Он трудоемок, требует, больших расходов, и поэтому его применяют только у мелких животных (овец, коз и др.) после операции у животного значительно снижается уровень молочной продуктивности, имеется риск потери высокоценного донора при общем обезболивании. Его нельзя часто повторять, так как в послеоперационный период образуются спайки, из-за чего возникают трудности в извлечении зародышей, а затем могут развиваться необратимые изменения, приводящие к бесплодию доноров (А.П. Студенцов, 1999).

Оценка эмбрионов. Оценка эмбрионов крупного рогатого скота производится несколькими методами. Наибольшее распространение получил морфологический метод. Установлено, что результаты имплантации эмбрионов зависят от того, насколько полно оценена способность оплодотворенных яйцеклеток к развитию.

По морфологическим признакам и эмбриональной стадии развития, эмбрионы можно классифицировать на пригодные и непригодные к трансплантации. При морфологической оценке эмбрионов основное внимание обращают на формулу зиготы, состояние её зоны пеллюцида, число бластомеров, равномерность дробления, выраженность эмбриобласта и трофобласта.

Кроме морфологической, дается оценка эмбрионов по адсорбционным свойствам оболочек и цитоплазмы бластомеров к различным красителям. Для улучшения морфологической оценки используют флюоресцентную окраску, позволяющую отличить живые эмбрионы от погибших. В частности, этот метод наиболее пригоден для оценки жизнеспособности эмбрионов крупного рогатого скота после их культивирования и замораживания. С помощью флюоресцентных красящих веществ FDA и DAP1 через 3–10-минутный период возможно быстрое и достаточно надежное определение способности эмбрионов к развитию в ранних стадиях. Живые эмбрионы и даже живые бластомеры ярко флюоресцируют после инкубации в FDA, но не флюоресцируют после инкубации в DAP1. У погибших эмбрионов или бластомеров реакции обратные. Эти методы позволяют более точно определять жизнеспособность эмбрионов под микроскопом.

Ряд авторов предлагает использовать синьку Эванса. В живых эмбрионах при температуре 37 градусов ею окрашивается только зона пеллюцида, которую затем обесцвечивают в растворе Рингера. В мертвых же эмбрионах краска прочно фиксируется на бластомера.

Однако следует учитывать, что флюоресцентная окраска лишь дополняет и улучшает основной метод оценки эмбрионов – морфологический. Наиболее важными морфологическими признаками при оценке жизнеспособности эмбрионов служат объем, окраска, расположение клеток, величина перивиталлинового пространства и вид неповрежденной зоны пеллюцида. Идеальный эмбрион должен быть компактным, сферической формы, с однородной окраской, с клетками одинаковой величины, с гладкой, плоской и равномерно сформированной зоной пеллюцида, без включений в перивителлиновом пространстве.

Важнейшим критерием для оценки качества эмбрионов является интенсивность развития стадий. Эмбрионы с замедленным развитием не используются для пересадки, замораживания и других манипуляций.

При оценке качества эмбриона в нашей стране принята 5-балльная шкала с учетом следующих показателей: соответствия стадии развития эмбриона его возрасту; правильности формы прозрачной оболочки и ее целостности; равномерности дробления бластомеров, состояния цитоплазмы; прозрачности перивителлинового пространства.

Наиболее пригодными для трансплантации являются эмбрионы, извлеченные из матки коровы-донора на 7–8 сутки после первого осеменения. Как показывают результаты исследований и практика, в это время нормально развитые эмбрионы, пригодные для трансплантации реципиентам, находятся в стадии поздней морулы или бластоцисты. Эти эмбрионы используют для пересадки гормонально подготовленным коровам-реципиентам.

Выбраковке подлежат дегенерированные неоплодотворенные яйцеклетки (ооциты), которые можно обнаружить при извлечении эмбрионов. Морфологически неинтактные, непригодные для трансплантации эмбрионы имеют дефектную морулу, или бластоцисту, признаками которых являются дефекты прозрачной оболочки, распад бластомеров, разная величина бластомеров, нарушение межклеточной связи.

В стадии поздней бластоцисты непригодные для трансплантации эмбрионы характеризуются деформацией и ослаблением бластомеров, разрывом межклеточных связей и целостности зоны пеллюцида (И.Р. Чернева, 2007).

1. **Пересадка эмбрионов реципиентам**

В качестве реципиента отбирают гинекологически здоровых коров после двух-трех нормальных половых циклов. Для отбора реципиентов основным показателем является отсутствие гинекологических отклонений, а продуктивные, племенные и породные качества большой роли не играют. Вместе с тем, у реципиентов с плохой упитанностью, низкой оплодотворяемостью после первого осеменения, могут плохо приживаться эмбрионы. В среднем на каждого донора отбирают 5–6 реципиентов. Большинство специалистов считает, что в качестве реципиентов наиболее пригодны полновозрастные телки с хорошими племенными кондициями.

Основным условием хорошего приживления эмбрионов служит синхронность проявления половой охоты у доноров и реципиентов.

Разница во времени в проявлении половой охоты не должна превышать 24 ч, оптимальные же результаты получаются при разнице не более 12 часов. При современном уровне техники трансплантации рекомендуется пересаживать эмбрионы сразу после их извлечения из рогов матки донора и оценки.

В настоящее время пересадка эмбрионов реципиентам производится хирургическим и нехирургическим способами. При пересадке нужно точно знать местонахождение эмбриона в половых путях коровы. Это связано с переходом предимплантационного периода, в котором находится эмбрион до пересадки, в новый период эмбрионального развития – имплантационный.

При естественном течении эмбрионального периода зародыш на стадии морулы или бластоцисты находится в верхнем отделе рога матки, поэтому и наиболее благоприятным местом для его аппликации является верхняя часть рога матки реципиента. Установлено, что пересадка эмбрионов глубоко в рог матки реципиента лучше всего обеспечивается хирургическим способом. При нехирургической же пересадке, которая происходит в период диэструса, место аппликации эмбриона в роге матки контролируется менее точно. Эффективность хирургического способа пересадки эмбриона составляет 60–70%, а число телят – 3–4 на донора. Хирургический способ использовали в основном до середины 70-х годов. Однако он требует больших затрат средств. Кроме того, широкое применение хирургического метода сдерживается сложностью проведения операций в производственных условиях, получением травм вследствие резекции мышц, и невозможностью многократного использования реципиента. Поэтому последние 10–15 лет пересадку эмбрионов в основном осуществляют нехирургическим способом. При нехирургической пересадке основным достоинством, кроме простоты и экономичности, является возможность многократного использования реципиента. Разработано несколько способов нехирургической пересадки эмбрионов. Однако все они основаны на одном принципе – введении эмбриона в рог матки через шейку, вследствие чего этот способ назван также цервикальным.

После пересадки эмбрионов проводят тщательный контроль за реципиентами, обращая особое внимание на возможное проявление у них повторной половой охоты. Для установления стельности у коров-реципиентов используют несколько методов: визуальный; по уровню прогестерона в крови или молоке; клинический, главным образом путем ректальной пальпации.

Важным звеном селекционно-племенной работы является достоверность установления истинного происхождения телят, полученных при трансплантации эмбрионов от генетически ценных родителей. Истинное происхождение можно установить по группам крови и типам белков крови. Пробу крови берут у теленка в возрасте от 4 недель до 4 месяцев.

Существенной причиной, снижающей эффективность нехирургической пересадки эмбрионов, является возможное повреждение эндометрия при введении катетера. В то же время обобщение результатов исследований по нехирургической пересадке эмбрионов показывает, что эффективность пересадки в большей степени зависит не от того, как глубоко будет введен катетер в рог матки, а от того, насколько правильно выполнено введение.

Однако на этот счет имеется и другая точка зрения: что конструкция приборов существенно не влияет на результаты извлечения и пересадки эмбрионов. Эти результаты более связаны с типом гонадотропина, квалификацией оператора, качеством и стадией развития эмбрионов. В целом же следует отметить, что нехирургический метод пересадки эмбрионов обеспечивает аппликацию зародышей в среднем 50–60%, а применение маточных релаксантов перед пересадкой – до 75%. Это существенно выше, чем при хирургическом методе. Технология нехирургического метода трансплантации сходна с искусственным осеменением коров и продолжается 3–5 минут, или 15–20 пересадок в час. Особого внимания заслуживает приём, заключающийся в нехирургической пересадке двух эмбрионов, по одному в каждый рог матки, что еще больше повышает эффективность трансплантации. Этот приём может быть применен для повышения частоты рождения разнояйцевых (дизиготных) двоен. Он позволяет получить двойные отелы у коров, особенно мясных пород, намного быстрее, чем генетическим путем (т.е. селекцией). Результаты проведенных исследований показывают, что нехирургическая пересадка дополнительного эмбриона во второй рог матки дает возможность увеличить выход новорожденных телят на 30%. При пересадке двух эмбрионов в каждый рог матки частота двоен составляет в среднем 55–60%, вместо 2% при естественном многоплодии коров. Можно пересаживать (подсаживать) эмбрион и оплодотворенной корове, но в контрлатеральный по отношению к желтому телу в яичнике рог матки. Средняя приживляемость эмбриона осемененной корове при нехирургической подсадке составляет 50%. Обобщая результаты экспериментов по нехирургическому методу пересадки эмбрионов, можно
придти к заключению, что пересадка двух эмбрионов в два рога матки реципиента или подсадка одного предварительно осемененному реципиенту в контрлатеральный рог матки являются эффективными и перспективными методами в биотехнологии трансплантации эмбрионов (П.Б. Завертяев, 1999).

1. **Хранение эмбрионов**

После оценки на жизнеспособность эмбрионы дважды промывают в фосфатном буфере Дюльбекко с добавлением антибиотиков, засасывающих в минипайету вместе с небольшим количеством среды. Для пересадки используют в первые 2–4 ч после извлечения из половых путей донора.

Необходимость сохранения жизнеспособности эмбрионов более продолжительное время возникает в случаях: отсутствия достаточного количества подходящих реципиентов; сомнительного качества вымытых эмбрионов; создание банка эмбрионов для осуществления долгосрочных селекционных программ; обмена генофондом между странами и континентами на коммерческой основе.

Существует несколько способов хранения эмбрионов: кратковременное вне организма, кратковременное в организме, долговременное в сжиженных газах.

При разработке способа кратковременного хранения эмбрионов вне организма был использован опыт культивирования тканей и клеток. Наиболее подходящей средой оказалась ТСМ 199 с добавлением 20% эмбриональной сыворотки крови оленей. Эмбрионы хранят в атмосфере обогащенной углекислым газом, при постоянной температуре 37 градусов. В таких условиях они остаются жизнеспособными 24–48 ч. Имеются сообщения о том, что снижение температуры до 10 градусов позволяет продлить их жизнеспособность до 5–6 суток.

На протяжении 3–4 суток эмбрионы можно хранить в яйцепроводах крольчих, выживаемость составляет в средне 73%. В настоящее время этот способ не применяется.

На сегодня известно 2 способа глубокого замораживания эмбрионов: в программируемом режиме (ступенчатое замораживание); одномоментный (витрификация).

При замораживании по первому способу отобранные эмбрионы (отличного и хорошего качества) последовательно проводят через растворы криопротектера (глицерин или диметилсульфоксид) возрастающих концентраций, приготовленные на фосфатно-буферном солевом растворе Дюльбекко с добавлением 20% фетальной сыворотки. После этого эмбрионы переносят в пробирки или ампулы (по 1–4 в каждую) вместе с 0,3 – 0,4 мл среды с криопротектором. Емкости с эмбрионами герметизируют (пробирки закрывают фольгой, ампулы запаивают) и помещают в камеры замораживателя, где охлаждают до -7 градусов в режиме 1 градус в минуту. После достижения указанной температуры вызывают кристаллизацию среды. Для этого в жидком азоте пинцетом касаются стенки пробирки(ампулы) в зоне верхнего края столбика среды. Дальнейшее охлаждение (до -28 градусов или -35) ведут со скоростью 0,5 градуса в минуту, затем скорость уменьшают до 0,1 градус в минуту; через 10 минут доводят до конечной температуры погружением в жидкий азот.

Одномоментное замораживание (витрификация) – отвердение при чрезвычайно высокой вязкости среды, что ведет к образованию стекловидных структур. Это возможно при высокой концентрации криопротектора и быстром охлаждении.

Замораживают быстрым методом в минипайетах емкостью 0,25 мл в пайету, последовательно засасывают 0,5 М раствор сахарозы, воздух, 1,0 М раствор глицерина с эмбрионом, воздух, 0,5 М раствор сахарозы. Концы закрывают с обеих сторон пластиковыми пробками. После эквилибрации пайету, содержащую эмбрион, выдерживают 5 мин в парах жидкого азота, затем опускают в сосуд с жидким азотом (Н.И. Полянцев, 2001).

Эффективность трансплантации эмбрионов крупного рогатого скота во многом определяется условиями хранения зигот. Самым эффективным и перспективным методом консервации эмбрионов является их глубокое замораживание (криоконсервация) в жидком азоте при температуре -196 градусов. Разработка метода долговременного хранения криоконсервированных эмбрионов значительно расширяет возможности трансплантации. Только в этом случае она может быть надежной биотехнологической основой селекционной программы.

Долговременное хранение глубокозамороженных эмбрионов имеет ряд преимуществ. Отпадает необходимость в содержании больших стад или групп реципиентов, так как пересадки могут быть проведены в любое время независимо от сроков взятия эмбрионов от доноров, что существенно повышает рентабельность трансплантации. Кроме того, криоконсервация эмбрионов позволяет создавать эмбриобанки от генетически ценных животных, а также сохранять генофонд редких и исчезающих пород и транспортировать эмбрионы в любые страны мира. По оценке специалистов криоконсервация эмбрионов экономически оправдана, она исключает генетический дрейф, т.е. изменение частоты генов в популяции, вызванные случайными причинами.

При соблюдении правильной биотехнологии выживаемость эмбрионов составляет 90%, а стельность коров-реципиентов после нехирургической пересадки находится в пределах 50–55%. Однако нередко в производственных условиях при несоблюдении технологии замораживания-размораживания выживаемость эмбрионов уменьшается, что существенно снижает рентабельность криоконсервации. Обосновано, что использование метода криоконсервации эмбрионов в производственных условиях является рентабельным только в том случае, если выживаемость эмбрионов после размораживания будет не менее 80%, а процент стельности коров-реципиентов составит 55–60%.

По принятой в России технологии, эмбрионы замораживают с применением автоматических устройств, обеспечивающих регулирование скорости охлаждения в заданных режимах. После герметизации емкости с эмбрионами ампулы или пробирки маркируют, затем охлаждают с 20 до -6 градусов со скоростью 1 градус в минуту, проводят кристаллизацию, охлаждение со скоростью 0.3 градуса в минуту и погружают в жидкий азот. Применяется также и другой режим: охлаждение от -7 до -35 градусов со скоростью 0.3 градуса в минуту; от -35 до -38 градусов со скоростью 0.1 градус в минуту и погружение в жидкий азот. Оттаивание эмбрионов производится на водяной бане с температурой 25 или 37 градусов в течение 10–12 секунд. Для хранения и транспортировки замороженных эмбрионов используют сосуды Дьюара различных типов.

Практика криоконсервации эмбрионов крупного рогатого скота свидетельствует о том, что на выживаемость эмбрионов существенное влияние оказывает не только технология глубокого замораживания и оттаивания, но и их качество и стадия развития. Для успешной криоконсервации следует отбирать эмбрионы без морфологических нарушений, находящиеся на стадиях поздней морулы или ранней бластоцисты.

Необходимость отбора эмбрионов диктуется еще и тем обстоятельством, что у 10% из них обнаруживается неправильное развитие, а при криоконсервации повреждаются в среднем еще 25% клеток бластоцисты. Такие эмбрионы испытывают большую редукцию интактных бластомеров, вследствие чего переживаемость и дальнейшее развитие после замораживания и оттаивания существенно нарушаются.

Таким образом, соблюдение правильной биотехнологии криоконсервации и пересадки эмбрионов позволит обеспечить стельность реципиентов на том же уровне, что и при пересадке свежеполученных эмбрионов. Вместе с тем метод криоконсервации в будущем может быть существенно упрощен, или вообще можно будет отказаться от удаления криопротектора и пересаживать эмбрионы реципиентам непосредственно после оттаивания без дальнейших манипуляций. По прогнозу специалистов, криоконсервированные эмбрионы могут храниться десятки и сотни лет (И.Р. Чернева, 2007).

**Заключение**

Разведение крупного рогатого скота молочных пород с помощью
трансплантации эмбрионов позволяет: обеспечить размножение
высокоценных племенных быков-производителей; формировать поголовье
заводских семейств; усилить давление по отбору быков-производителей,
дочерей – трансплантантов, повысить генетический тренд по селекционным
признакам.

Сравнение молочной продуктивности дочерей быков – трансплантантов и их сверстников, полученных путем искусственного
осеменения показало, что удой первых оказался более
высоким по сравнению с дочерьми быков от искусственного осеменения.

Применение метода трансплантации эмбрионов в заводских
семействах от высокоценных коров-доноров сокращает сроки их
формирования в 1,5 раза по сравнению с искусственным осеменением за счет
получения большего числа потомков.

Применение элементов системы МОЭТ дает возможность
увеличения численности полученных путем трансплантации высокоценных
ремонтных быков за одинаковые воспроизводительные циклы
быко – воспроизводящих коров и увеличить число быков, получающих
племенные категории после проверки по качеству потомства в 4 раза. В
закрытом нуклеусном стаде сокращается срок воспроизведения животных
через лучшую его часть поголовья почти в 3 раза.

Расчет затрат на получение одного высокоценного ремонтного быка
методом трансплантации из отечественных эмбрионов показал, что они в 2,2
раза больше по сравнению с расходами на искусственное осеменение, но
меньше в 5,4 раза, чем на покупку быка из-за рубежа и в 3,5 раза, чем на приобретение эмбрионов за пределами страны (И.Р. Чернева, 2007).

**Список литературы**

1. Завертяев Б.П. Биотехнология в воспроизводстве и селекции крупного рогатого скота. – Л.: «Агропромиздат», 1999.
2. Полянцев Н.И., Подберезный В.В. Ветеринарное акушерство и биотехника репродукции животных. Ростов н/Д.: Феникс, 2001. – 480 с.
3. Прокофьев М.И. Регуляция размножения сельскохозяйственных животных. – Л.: «Наука», 1998.
4. Студенцов А.П., Шипилов В.С., Никитин В.Я. Ветеринарное акушерство, гинекология и биотехника размножения. – 7-е изд., перераб. и доп. – М.: Колос, 1999. – 495 с.
5. Чернева И.Р. Лекции по биотехнологии и пересадке эмбрионов. Московская ветеринарная академия им. Скрябина, 2007.