УДК 636.2.082.4:619.616.2

ПРИСТРІЙ ДЛЯ УВЕДЕННЯ ЕМБРІОНІВ ТА СПЕРМИ КОРОВАМ І ТЕЛИЦЯМ

Рецензенти: док-р б. наук, проф. Бугров О.Д.; канд. с.-г. наук Шигимага В.О.

В.М. Хмельков, Г.С. Тихона
Інститут тваринництва НААН України

Розроблено оригінальну конструкцію та виготовлено дослідні зразки одноразового полімерного багатофункціонального пристрою, що може використовуватись як для трансплантації ембріонів, так і штучного осіменіння самиць великої рогатої худоби. Вдосконалення запропонованого пристрою спрямоване на підвищення санітарного рівня біотехнологічних робіт із репродукції, уникнення травматизації слизової матки та виключення втрат біоматеріалу при його перенесенні в статеві шляхи самиць. Зручність та надійність у користуванні доведені під час застосування у практичних умовах.

Ключові слова: **реципієнт, ембріотрансплантація, приживлюваність, штучне осіменіння, заплідненість,**

Для виконання робіт з біотехнології відтворення великої рогатої худоби (трансплантація ембріонів, штучне осіменіння) фахівцями на практиці застосовується цілий арсенал пристроїв та інструментів як багаторазового, так і одноразового використання.

Для нехірургічної пересадки ембріонів у практиці скотарства використовують різні інструменти багаторазового використання. Найбільш відомі катетери Кассу в різних модифікаціях, а також інструмент виробництва фірми «Руш Нейштад» [1]. Також вітчизняними фахівцями використовувалися інструменти виробництва Одеського заводу “Ветприбор” [2] та розробки ІТ НААНУ [3]

Недоліками даних конструкцій є:

1) висока вартість інструментів (відносно тих, що виробляються за кордоном);

2) не у всіх моделей зовнішня поверхня катетерів відповідає 8-му класу чистоти [4];

3) постійні витрати праці та енергії для підготовки інструментів до роботи.

Усування перелічених недоліків можна досягти шляхом використання для ембріопересаджень полімерних одноразових інструментів. Їх застосування забезпечує високий рівень гігієни, дає змогу максимально вирішити санітарні вимоги шляхом додержання асептики і антисептики. Із практики відомо, що найбільш придатними полімерами у виробництві одноразових інструментів є поліетилен та полістирол. Вони мають необхідні фізико-хімічні та технологічні властивості. З урахуванням даних щодо токсикологічних властивостей у свій час були рекомендовані для промисловості такі марки поліетилену: 10802-020, 15802-020, 1770-010, 16802-070 [5].

З одноразових пристроїв для ембріотрансплантації є одноразовий пристрій для пересадки ембріонів, що включає розміщений у герметичній упаковці прозорий порожній полімерний циліндричний корпус з виштовхувальним пристосуванням у вигляді полімерного балона, який закріплено на одному кінці корпуса для заповнення або видалення з порожнини циліндра буферного середовища з ембріоном. Другий кінець корпуса витягнутий під кутом у вигляді капіляра, що звужується та служить для заправки ембріона. Перед проведенням

пересадки пристрій розміщують у захисний полімерний тонкостінний санітарний чохлик [6].

Недоліком цієї конструкції є те, що ембріон у визначеному об'ємі поживного середовища втягується в корпус інструмента за допомогою стиснення стінок балона. При проходженні шийки матки оператор змушений маніпулювати корпусом пристрою, який має визначну гнучкість, унаслідок чого вміст інструмента зміщується до протилежного краю або ж довільно віддаляється у порожнину матки ще до уведення інструмента в краніальну частину рога матки, тобто виникає втрата біоматеріалу.

Крім того, мають місце технологічні складності, пов'язані з заправкою біоматеріалу через подовжений кінець інструмента, бо останній підлягає обламуванню і, внаслідок чого, може статися змішування ділянок із середовищем із фрагментом рідини де знаходиться ембріон. У таких випадках необхідна перезарядка інструмента.

Також відомий одноразовий полімерний пристрій, що дає змогу виконувати пересадки ембріонів, схожий за конструкцією з попереднім [7]. Основним недоліком таких пристроїв можна вважати той факт, що ембріон з достатньо великою кількістю середовища Дюльбекко уводиться безпосередньо в корпус інструменту. Треба враховувати, що у світовій практиці ембріони розміщують у пайєтах як один із надійніший способів його фіксації в мінімальній кількості середовища (0,2 мл). Вказані інструменти також можуть бути використанні і для штучного осіменіння спермодозами у необлицьованих гранулах.

Враховуючи вищевказане було б доцільним мати на озброєнні біотехнологів-практиків універсальний пристрій, який можна використовувати у разі потреби як для штучного осіменіння, так і для ембріотрансферу.

Мета досліджень полягала в розробці багатофункціонального одноразового пристрою для уведення в статеві шляхи самиць великої рогатої худоби як сперми, так і ембріонів.

Матеріали та методи досліджень. З урахуванням фізіологічних властивостей статевих шляхів корів та телиць та вимог щодо техніки ембріотрансплантації і штучного осіменіння було розроблено оригінальну конструкцію та виготовлено дослідні зразки одноразового пристрою. Як контроль було взято пристрій багаторазового використання виробництва Одеського заводу "Ветприбор". У дослідах використовували фізіологічні, мікробіологічні, мікроскопічні методи досліджень. Досліди проводили як в лабораторії трансплантації та кріоконсервації ембріонів інституту, так і в умовах господарств Харківської області. Бактеріологічні дослідження проводили за загальноприйнятими методиками.

Дослідження зовнішньої поверхні одноразового пристрою для пересадки ембріонів із полімерного матеріалу на наявність гострих виступів та подряпин, визначення їх розмірів проводили мікроскопічно. Визначення адгезивних властивостей поверхні пристрою для пересадки ембріонів проводили шляхом постановки модельних дослідів з їх інокулювання мікроорганізмами. Для цього після стерилізації дослідного пристрою на його поверхню наносили чисті добові культури клітин E.coli; St.aureus у розрідженні 1:100 і 1:1000, а потім проводили дворазове відмивання стерильним фізіологічним розчином, розлитим у пробірки по 5 мл. Після кожного відмивання інструменту з пробірок відбирали приблизно 1 мл змиву для проведення посіву на живильні середовища. Облік колоній мікроорганізмів, які зросли на живильних середовищах, проводили через 24, 48,

72 години. Мікробну забрудненість кінцевої частини інструменту визначалися шляхом занурення його в пробірку із фізіологічним розчином, а потім із пробірки проводили посіви на живильні середовища за загальноприйнятою методикою. Кінцеву частину дослідного пристрою, після дворазового відмивання, занурювали в (м'ясо-пептонний бульйон) на 4 години, а потім робили посів на (м'ясо-пептонний агар). Облік колоній проводили через 24, 48, 72 години. Контрольні досліди проводили аналогічно, але із застосуванням металевого інструменту для пересадки ембріонів багаторазового використання заводського виробництва.

Для визначення травматичності дослідного та контрольного пристроїв імітували пересадку ембріонів на дослідних тваринах, а потім проводили відмивання інструментів фізіологічним розчином. Отримані змиви центрифугували, а з осаду робили мазки та проводили облік кількості епітеліальних клітин, визначали наявність клітин крові.

Науково-виробничу перевірку запропонованого одноразового багатофункціонального пристрою для проведення штучного осіменіння корів було організовано в умовах молочнотоварної ферми ДП ДГ "Українка Слобідська" ІТ НААНУ. Дослідження були проведені на коровах чорно-рябої української молочної породи, для чого було виготовлено власноручно у лабораторних умовах 57 пристроїв.

Для осіменіння були сформовані чотири групи корів (3 дослідні та 1 контрольна) у загальній кількості 121 голова. Корови 1-ї дослідної групи (24 голови) були осіменені спермою в пайетах; 2-ї групи (33 голови) – спермою в облицьованих гранулах; 3-ї групи (36 голів) - спермою у відкритих гранулах з використанням полістеролової піпетки. Тварини контрольної групи (28 голів) осіменяли спермою у облицьованих гранулах інструментом з металевим подовженням. Осіменіння усіх корів проводили ректоцервікальним методом.

Результати досліджень. У результаті порівняльних дослідів було встановлено, що у дослідному пристрої зовнішня поверхня відповідає ГОСТу 2789-73, а саме 8-му класу чистоти поверхні (середня нерівність не має перевищувати 2,0-3,2 мкм). У пристрої який пропонується один кінець корпуса обладнаний знімним наконечником із розміщеною, співосно в середині нього, конусоподібною порожньою голкою, а другий - має фланець; виштовхувальне пристосування виконано у вигляді металевого стержня, діаметр якого відповідає внутрішньому діаметру упаковки біоматеріалу; причому внутрішня поверхня голки, як і зовнішня поверхня наконечника, мають бути не менше 8-го класу чистоти, а її зовнішній діаметр у верхній частині відповідати внутрішньому діаметру упаковки біоматеріалу.

Пристрій містить розміщений у стерильному полімерному санітарному чохлі циліндричний полімерний прозорий корпус 1 та стержень 2 з дисковим упором 3 (рис.1). Один кінець корпуса обладнаний круглим знімним фланцем 4 для фіксації його пальцями, а другий – зовнішньою різьбою 5 для з'єднання з наконечником 6, який має в середині співосно з отвором, конічну порожню полімерну голку 7, на якій фіксується відкритий кінець пайєти 8 з ембріоном (спермою).

Пристрій для уведення біоматеріалу в статеві шляхи самиць використовується таким чином. Підготовку і заправку інструмента проводять у стерильному боксі, з дотриманням правил асептики. Для цього пайєту з ембріоном розміщують в наконечнику, фіксуючи її на конусоподібній голці; протилежний кінець пайєти нанизують на стержень, після чого за допомогою різьби наконечник закріплюють на корпусі пристрою.

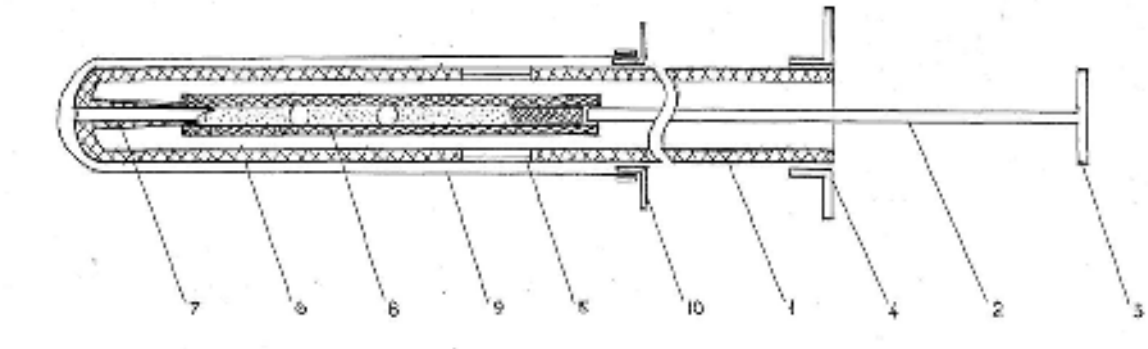

Рис. 1. Пристрій для уведення ембріонів та сперми в статеві шляхи самиць:
1 – корпус; 2 – стержень; 3 – дисковий упор; 4 – фланець; 5 – різьба;
6 – наконечник; 7 – порожня голка; 8 – пайєта; 9 – чохлик; 10 – замок.

Для забезпечення санітарного рівня зібраний пристрій розміщують у стерильний тонкостінний полімерний чохлик 9, відкритий кінець якого фіксують в спеціальному замку 10. Готовий до роботи інструмент передають оператору безпосередньо перед пересадкою.

Після санітарної обробки зовнішніх статевих органів тварини (реципієнта) оператор одягає на руку поліетиленову рукавичку, зволожує її теплою водою та розкриває статеві губи. В утворену щілину, не торкаючи інструментом зовнішніх статевих органів, уводить підготовлений пристрій у піхву до матки під ректальним контролем. Потім санітарний чохлик проривають та обережно проводять пристрій через канал шийки матки в її ріг на необхідну глибину. Обережним рухом, ректально, спеціаліст переконується в правильності розташування краніальної частини пристрою в маточному розі. Після цього, натискуючи на стержень, уводить вміст пайєти в порожнину матку. Потім пристрій видаляється зі статевого тракту.

Запропонований пристрій для уведення біоматеріалу в статеві шляхи самиць окрім пересадок ембріонів, може використовуватися для штучного осіменіння, причому спермодозами в різній упаковці (пайєти, облицьовані гранули) та без неї (необлицьовані гранули). В даному випадку вміст інструмента вводять у краніальну частину шийки матки.

Із метою обґрунтування можливості використання в роботі з біологічними об’єктами одноразового пристрою було вивчено його фізіологічні та санітарно-гігієнічні показники.

Нами одержані результати модельних досліджень з вивчення росту мікроорганізмів на живильних середовищах що були отриманні з пристроїв для пересадки ембріонів. Із табл. 1 видно, що кількість мікроорганізмів після 2-х відмивань пристроїв значно знижується: E.coli у змиві з контрольного пристою зменшується у середньому від 1040,2 до 640,3 м.т./мл, тобто у 1,6 раза; з дослідного – від 1150,1 до 850,5 м.т./мл, тобто у 1,8 раза; Ps.aerug. з контрольного пристрою – від 1200,1 до 850,4 м.т./мл, тобто у 1,3 раза, з дослідного – від 840,1 до 686,6 м.т./мл, або у 1,2 раза.

Іспити дослідних зразків запропонованого пристрою було проведено на 17 телицях та 4-х коровах. Визначали час, який необхідно для уведення в ріг матки дослідного та контрольного пристрою, за допомогою методу хронометрії. При імітації пересадки ембріонів на коровах встановлено, що для проходження шийки

матки з використанням дослідного й контрольного пристроїв було витрачено однаковий час (1,8-2,1 хвилини).

1. Ріст мікроорганізмів на живильних середовищах зі змивів, які отримані з пристроїв для пересадки ембріонів

Пристрій	Розрідження мікроорганізмів	Ріст мікроорганізмів на пл. агарі, м.т./мл	
		до відмивання	після відмивання
E.coli			
Металевий	1 : 100	1040,2	640,3
Одноразовий	1 : 100	1150,1	850,5
Ps.aerugenosa			
Металевий	1 : 100	1200,1	850,4
Одноразовий	1 : 100	840,1	686,6

Мікроскопічний аналіз поверхні інструменту показав, що у одноразового дослідного пристрою нерівності поверхні не перевищують 2,0-3,2 мкм та округлі за формою, що відповідає технічному стандарту інструментів - 8 класу чистоти поверхні й виключає травмування епітелію шийки матки.

Модельні дослідження з інокуляції пристроїв для пересадки ембріонів показали, що у дослідного полімерного та контрольного металевого (виробництва заводу "Ветприбор" після шліфування та полірування) інструментів після дворазового відмивання стерильним фізіологічним розчином відбувається деконтамінація в рівному ступеню. Визначення остаточної мікробної контамінації наконечника дослідного пристрою прямим методом показало, що має місце наявність на його поверхні поодиноких мікроорганізмів, в основному кокових форм.

На наступному етапі досліджень проводили відмивання дослідного та контрольного пристрів для визначення на їх поверхні епітеліальних клітин та клітин крові. Доведено, що у змиві з дослідного пристрою були нараховані 222 епітеліальні клітини та поодинокі клітини крові, в основному лейкоцити, а з контрольного пристрою – 234 епітеліальні клітини та поодинокі лейкоцити. Клітинний склад змивів із поверхні дослідного та контрольного пристрою в основному відповідав цитологічному складу шийки матки.

Придатність пристрою для уведення біоматеріалу у статеві шляхи самиць до виробничих умов була підтверджена у ході ембріопересаджень на коровах та телицях-реципієнтах, що проводились в у мовах СВК "Україна" Зміївського району Харківської області (табл.2).

2. Результати трансплантації ембріонів при використанні різних пристроїв

Вид пристрою	Усього реципієнтів, голів	Стало тільними, голів	Приживлюваність, %
Пропонований	12	5	41,67
Відомий	14	6	42,86

При порівнянні результатів аплікації ембріонів 7-8-добового віку металевим пристроєм відомої конструкції та пропонованим пристроєм показник приживлюваності знаходився на одному рівні 42,86 та 41,67 відповідно.

У наступному досліді доводили можливість використання запропонованого пристрою в якості інструмента для штучного осіменіння корів. Заплідненість тварин визначали за результатами ректального дослідження (табл. 3).

Одержані результати після штучного осіменіння як в дослідних групах тварин, так і в контролі знаходяться майже на одному рівні: 50,0-54,17 %, у порівнянні з контролем по групах, різниця несуттєва.

Встановлено, що після штучного осіменіння, з використанням запропонованого пристрою, повторно прийшло в статеву охоту 11 голів першої групи, де запліднюваність корів була найвищою у порівнянні з самицями інших групп на 1,39-4,17 %.

3. Ефективність використання одноразового багатофункціонального пристрою для штучного осіменіння корів

Групи тварин	Кількість тварин, голів		% запліднення (M±m)
	осіменили	запліднилось	
1	24	13	54,17±10,17
2	33	17	51,52±8,7
3	36	19	52,78±8,32
Контроль	28	14	50,0±9,45

Найнижчий відсоток запліднення маток спостерігали у контрольній групі.

Таким чином, запропонований дослідний одноразовий пристрій можна вважати багатофункціональним і з успіхом використовувати в біотехнологічній практиці. На цей пристрій одержано патент на авторське свідоцтво [8].

Висновки:

1. Встановлено, що пристрій для уведення біоматеріалу в статеві шляхи корів та телиць придатний до використання при проведенні ембріопересаджень та штучного осіменіння спермодозами в різній упаковці та без неї.

2. Показано, що застосування даного пристрою дає змогу знизити мікробну контамінацію біоматеріалу та травматизацію слизової матки при проведенні біотехнологічних робіт.

Бібліографічний список

1. Методические указания по использованию французской технологии трансплантации эмбрионов /ВНПО по племенному делу в животноводстве Госагропрома СССР.[Жильцов Н.З. и др.]. - Москва, 1986. – С. 37.

2. Мусульбас М.С. Методические подходы оценки качества катетеров для пересадки эмбрионов /Науч. конф. «Новое в методах зоотехнических исследований». .[Мусульбас М.С., Бугров А.Д., Хмельков В.Н.]. – Ч.1. - Харьков, 1992. – С. 182-185.

3. А. С. 1792326 СССР, МКИ А61 D7/02. Устройство для пересадки эмбрионов / Осташко Ф.И., Сушко А.Б., Исаченко В.В., Ивануха Н.А., Передера К.Б. - № 4873452; заявл. 8.10.90; опубл. 1.10.92.

4. Тихона Г.С. Способи підвищення приживлення ембріонів великої рогатої худоби при трансплантації: автореф. дис.на здобуття наук. ступ.:спец. 03.00.20 – біотехнологія. /Тихона Г.С.. – Х.,. 1996. – С.18-20.

5. Осташко Ф.И. Воспроизведение стада в промышленном скотоводстве /Ф.И. Осташко. - Киев: Урожай,1982.- С.100-101.

6. А.с.: 1359936 СССР, МКИ А61 D7/02. “Устройство для пересадки эмбрионов” /Осташко Ф.И., Дибиров М.К., Хмельков В.Н., Песоцкий В.В. - № 3946555; заявл. 19.08.85; опубл. 15.08.87.

7. А. с.: 1724205 СССР, МКИ А61 D7/02. “Устройство для введения биоматериала в половые органы самок” / Бугров А.Д., Мусульбас М.С., Шеховцов С.Ю. - № 4814110/15; заявл. 16.04.90; опубл. 07.04.92, Бюл. № 13.

8. Патент на винахід №78750 Україна С2 , А61D 7/00. Пристрій для введення біоматеріалу в статеві шляхи самиць. /Дібіров М.К., Сушко О.Б., Хмельков В.М., Тихона Г.С. №20040806539; заявл.04.08.2004; опубл.25.04.2007, Бюл. № 5.

УСТРОЙСТВО ДЛЯ ВВЕДЕНИЯ ЭМБРИОНОВ И СПЕРМЫ КОРОВАМ И ТЕЛКАМ

Хмельков В.Н., Тихона Г.С., Институт животноводства НААНУ

Разработано оригинальную конструкцию и изготовлен опытный образец одноразового полимерного многофункционального устройства, который может использоваться как для трансплантации эмбрионов, так и искусственного осеменения маток крупного рогатого скота. Усовершенствование предлагаемого устройства направлено на повышение санитарного уровня биотехнологических работ по репродукции, исключение травматизации слизистой матки и потерь биоматериала при его переносе в половые пути самок. Удобство и надежность в использовании доведены во время применения устройства в практических условиях.

Ключевые слова: реципиент, эмбриотрансплантация, приживляемость, искусственное осеменение, оплодотворяемость.

APPLIANCE FOR EMBRYOS AND SPERM ADMINISTRATION TO THE HEIFERS

Khmelkov V., Tykhona G.; Institute of animal science, NAASU

This article highlights the experimental research results on the appliance elaboration for embryos and sperm administration to the heifers. The appliance is characterized by original design. Polymeric multifunctional experimental patterns for single use were manufactured. The appliance is destined for embryo transplantation (ET) and artificial insemination (AI) of cattle females. The appliance proposed to be implemented during bio-technological procedures on reproduction. The unit is designed for non-traumatic operations on uterus mucus. Bio-stuff loss is excluded by administration into reproductive female tract. The appliance is handy and valid during exploitation. The test data were obtained under operation conditions. The unit supposed to improve sanitary conditions.

Key words: ET animal, embryo transplantation (ET), survival rate, artificial insemination (AI), conception rate.