

УДК 612.017.1: 63

Ахмадиев Г.М.

**ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ И ПРИНЦИПЫ ОЦЕНКИ
СОВМЕСТИМОСТИ ЖИВОТНЫХ ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ
ЭМБРИОНОВ**

*Елабужский институт (филиал) ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский)
федеральный университет», Республика Татарстан,*

UDC 612.017.1: 636

Akhmadiev GM

**IMMUNOBIOLOGICAL BASIS AND PRINCIPLES FOR DETERMINING
THE COMPATIBILITY OF ANIMALS DURING EMBRYO**

*Elabuga Institute (branch) FGAOU VPO "Kazan (Volga) Federal University" The
Republic of Tatarstan,*

Целью настоящей работы является применение иммунобиологических основ и принципов определения совместимости крупного рогатого скота при трансплантации эмбрионов для получения жизнеспособного потомства плацентарных жвачных животных. Поэтому, необходимо в каждом случае в биотехнологическом приеме размножения животных, во время лабораторных исследований использовать аллоантигены эритроцитов или белков сыворотки периферической крови животных доноров и реципиентов.

Совместимость животных при трансплантации эмбрионов устанавливалась путем постановки: реакции скорости оседания эритроцитов периферической крови донора и реципиента. Для чего из исследуемой крови выделялась сыворотка и к сыворотке донора добавлялась кровь реципиента, а к сыворотке реципиента – кро

вь донора, далее под наклоном пинеток 45° определялась скорость оседания эритроцитов и сравнивалась с контролем. Для отбора животных

при трансплантации эмбрионов использовали устройство, которое состоит из штатива, набора пипеток, основания и стойки для регулирования угла наклона. Учет осуществляли визуально. Животных для трансплантации эмбрионов определяли совместимыми в том случае, когда разница скорости оседания эритроцитов в опытной и контрольной пробах составляла в пределах 1-10 мм.

Ключевые слова: иммунология, биотехнология, прием, трансплантация, эмбрион, донор, реципиент, совместимость, скорость оседания эритроцитов, устройство, размножение, животные, отбор, аллоантигены, эритроциты, периферическая кровь, кровь, сыворотки крови, пипетки, наклон, опыт, контроль, проба, крупный рогатый скот, плацентарные жвачные животные, технология, хозяйственно – полезные признаки, воспроизводство, животный донор, животный реципиент.

The purpose of this paper is to identify the immunological basis and principles determine the compatibility of animals in embryo. Therefore, it is necessary in each case to biotechnological methods of reproduction of animals in laboratory research use alloantigens erythrocytes or serum proteins of the peripheral blood of animals donors and recipients.

Compatible animals embryo established by asking: - the reaction of erythrocyte sedimentation rate of the peripheral blood of the donor and the recipient. What is the study of blood serum and stood out to the blood serum of the donor recipient was added, and by the serum of the recipient - blood donor, on a slope 45 ° pinetok determined erythrocyte sedimentation rate and compared with the control. For the selection of animals used for embryo transfer device that consists of a tripod, set pipettes, base and stand for adjusting the angle of inclination. Accounting is performed visually. Animals for the embryo to determine the compatibility in the case when the difference of erythrocyte sedimentation rate in the experimental and control samples in the range of 1-10 mm.

Keywords: immunobiology, biotechnology, reception, transplantation, embryo donor, the recipient, compatibility, erythrocyte sedimentation rate, unit,

reproduction, animal selection, alloantigens, red blood cells, peripheral blood, blood, blood serum, pipettes, tilt, experience, control, Sample, cattle, placental ruminants, technology, economic - useful features, vozproizvodstvo, animal donor, recipient animal

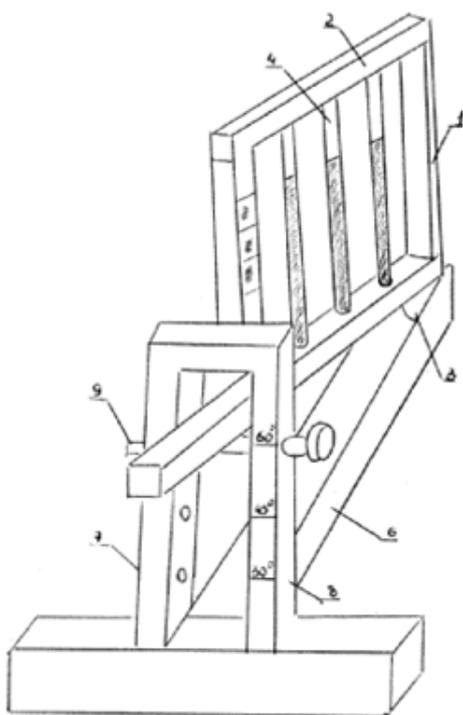
Введение. В современных условиях в агропромышленном комплексе областях, а именно в животноводстве проблема получение жизнеспособного потомства с высокими хозяйственно-полезными признаками постоянно остается актуальной проблемой. Решение этой проблемы связано с внедрением биотехнологических приемов размножения плацентарных жвачных животных. Для этого необходимы более эффективные способы технологии и приемы воспроизводства животных, одной из таких форм является способ определения совместимости животных при пересадке эмбрионов от животного донора к животному реципиенту.

Характер иммунобиологических, иммуногенетических и иммунофизиологических взаимоотношений после оплодотворения у плацентарных жвачных животных в системе мать-эмбрион - плод можно наиболее объективно оценить только при наличии антигенов, специфических для данной конкретной системы крови донора и реципиента[7]. На сегодняшний день неизвестно, какие из антигенов тканевой совместимости /МНС/ присутствуют на эмбрионе животного донора в период предшествующий имплантации во время беременности.

Цель и задачи. Целью настоящей работы является выявление иммунобиологических основ и принципов определения совместимости крупного рогатого скота при трансплантации эмбрионов для получения жизнеспособного потомства плацентарных жвачных животных. Поэтому, необходимо в каждом случае в биотехнологических приемах размножения животных, во время лабораторных исследований использовать аллоантигены эритроцитов или белков сыворотки периферической крови животных доноров и реципиентов [1].

Материал и методы исследований. Иммунологические методы исследований нами использовались для определения совместимости животных доноров и реципиентов при трансплантации эмбрионов. Совместимость животных при трансплантации эмбрионов устанавливалась путем поставок: - реакции скорости оседания эритроцитов периферической крови донора и реципиента. Для чего из исследуемой крови выделялась сыворотка и к сыворотке донора добавлялась кровь реципиента, а к сыворотке реципиента – кровь донора, далее под наклоном пипеток 45° определялась скорость оседания эритроцитов и сравнивалась с контролем. Сущность предложенного способа, заключается в том, что для этого у донора и реципиента из яремной вены брали кровь в утренние часы до кормления животных. Часть полученной крови использовали для получения сыворотки донора и реципиента[2].

Для отбора животных при трансплантации эмбрионов использовали устройство, которое состоит из штатива, набора пипеток, основания и стойки для регулирования угла наклона. Сущность устройства осуществляющего способ поясняется чертежом, где на фиг.1 – прибор в сборе. Прибор содержит боковую стойку 1, сверху 2 и нижним 3 основаниями, образующими рамку между которыми установлены пипетки 4 с пробами крови. В свою очередь на стойке 1 нанесены деления для визуального фиксирования протекания реакции. Нижнее основание 3 при помощи шарнир-соединения 5 прикреплено одним концом к крестовине 6, на которой укреплена стойка 7 с выполненными отверстиями 8 для фиксации штифтом 9. Против каждого отверстия 8 нанесены риски с ценой деления 30° , 45° , 60° и выше.



Фиг.1

С учетом возможности влияния иммунобиологического и иммуногенетического статуса донора и антигенных факторов эмбриона на иммунофизиологическое состояние реципиента способ осуществляли с сывороткой крови донора и кровью реципиента в предложенном устройстве.

Аналогичным образом ставили контрольные пробы, вместо сыворотки крови донора и реципиента брали изотонический раствор хлористого натрия.

Отбор животных для трансплантации эмбрионов производили по результатам исследования скорости оседания эритроцитов в опытных и контрольных пробах через час.

Учет осуществляли визуально. Животных для трансплантации эмбрионов определяли совместимыми в том случае, когда разница скорости оседания эритроцитов в опытной и контрольной пробах составляла в пределах 1-10 мм.

Реакция бласттрансформации лимфоцитов донорской крови в присутствии белков сыворотки реципиента и наоборот ставили /М.М. Авербаху, /1974/. Для этого из стерильной пробирки, содержащей 1 мл. цельной крови с каплей гепарина на 0,1 мл. помещали в пробирки из нейтрального стекла, содержащие 4 мл. среды 199 и 1 мл. сыворотки мелкого рогатого скота.

В питательную среду добавляли 200 ед/мл. пенициллина и 100 ед/мл. стрептомицина (для поддержания стерильности), а затем оптимальную дозу тканевого антигена (сыворотку крови) животного-реципиента из расчета 40 мкг белка на 1 мл. культуральной жидкости. Пробирки помещали вертикально в термостат при температуре 37° С. Через 5 суток инкубации производили снятие, фиксацию и окраску посева клеток. Для чего из пробирки, в которой культивировались клетки, удаляли всю надосадочную жидкость. Осадок тщательно ресуспендировали и заливали на 10 мин. 8 мл 10% раствора уксусной кислоты. Жидкость с клетками переливали в центрифужные пробирки, их центрифугировали в течение 10 минут при 3000-4000 об/минуту. Всю надосадочную жидкость удалили до последней капли. Клетки фиксировали в той же пробирке 6-7 каплями этилового спирта. Осадок ресуспендировали в спирте и выливали на стекло. Стекло высушивали на воздухе и окрашивали азурэозином. Под микроскопом в иммерсионной системе считали 300-500 клеток. Процент бластообразования определяли, учитывая следующие клеточные формы: лимфоциты /диаметр клетки 7,0-7,5 мкм/, бластоподобные переходные формы /диаметр клетки 8-13 мкм/, бласты /диаметр клетки более 14мкм/, клеток в состоянии митоза

Нами были испытаны реакции: бласттрансформация лимфоцитов и скорость оседания эритроцитов донора и реципиента по нашей методике.

Более экономически выгодным и эффективным для практики животноводства, для определения совместимости животных при трансплантации эмбриона от донора к реципиенту оказалась реакция оседания эритроцитов в системе периферической крови донора и реципиентов. Реакция проводилась в предложенном устройстве.

Результаты исследования и обсуждение. Результаты исследования сравнительной эффективности известного /РБТЛ/ и предлагаемого способов отбора животных для трансплантации эмбрионов представлены в табл. 1.

Таблица 1

Сравнительная эффективность известного и предполагаемого

способов отбора животных для трансплантации эмбрионов

Способы	Количество подопытных животных	Исход пересадки эмбрионов у реципиентов	
		Беременность	Аборт
Известный /контроль/	5	2	1
Предполагаемый /опыт/	5	4	-

Данные табл.1 показывают, что предлагаемый способ имеет достоверное преимущество перед известным методом. Исход пересадки эмбрионов у 5 животных реципиентов при использовании известного способа определения совместимости при трансплантации привел к 2-ум физиологически нормально протекающей беременности, а при использовании предлагаемого способа соответственно к 4. Среди животных реципиентов при использовании предлагаемого способа спатологией беременности и абортировавших не выявлено.

Результаты определения скорости оседания эритроцитов в системе крови доноров и реципиентов представлены в табл. 2.

Таблица 2

**Скорость оседания эритроцитов крови животных
доноров и реципиентов (M±m; n=9)**

Показатель	Индивидуальные номера животных доноров							
	6512				6513			
	опыт	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт	контроль
Скорость оседания эритроцитов, мм/час	9,60 ± 1,09	2,72± 0,50	10,56 ± 1,09	2,72± 0,50	12,78 ± 1,09	2,72± 0,50	14,78 ± 1,09	2,72± 0,50
Td		5,73		6,53		8,38		10,05

P		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001
---	--	--------	--	--------	--	--------	--	--------

По результатам исследования скорости оседания эритроцитов в системе крови донора и реципиентов совместимыми животными были:

1. Донор /6512/ - Реципиент (6337); 2. Донор /6513/ - Реципиент (4951);
3. Донор /6512/ - Реципиент (б/н); 4. Донор /6512/ - Реципиент (3447) 5. Донор /6512/ - Реципиент (6305).

Как видно из табл. 2, по скорости оседания эритроцитов у животных доноров и реципиентов были установлены достоверные различия в опытных и контрольных пробах. В опытных пробах этот показатель составил $9,60 \pm 1,09$; $10,56 \pm 1,09$; $12,78 \pm 1,09$; $14,78 \pm 1,09$, а в контрольных пробах соответственно $2,72 \pm 0,50$ ($P < 0,001$).

Проведенный анализ позволил установить степень генетического сходства у доноров и реципиентов, которая близка по величине скорости оседания эритроцитов в пределах 1-10 мм. Приведенные в табл. 1 данные свидетельствуют о большом сходстве поголовья доноров с реципиентами по сравнению с показателями СОЭ по отдельным реципиентам. С объединением животных в большие группы идет сглаживание их индивидуальных особенностей. У реципиентов с не привившимися эмбрионами более высокие показатели скорости оседания эритроцитов.

Процесс приживания эмбрионов при трансплантации происходит генетической информацией двух организмов сопряженного с иммунофизиологическими факторами третьего, и отличается от сложившегося в процессе естественной эволюции (плод объединяет генетический материал двух особей и контактирует с иммунобиологическими механизмами одного из них).

Все это указывает на необходимость более внимательного отношения к иммуногенетическому, иммунобиологическому и иммунофизиологическому статусу как доноров, так и реципиентов при приеме пересадке эмбрионов от донора к реципиенту.

Заключение. Результаты изучения иммунобиологической совместимости и несовместимости животных при трансплантации эмбрионов показали, что исход пересадки зависит от скорости содержания эритроцитов в системе периферической крови животных доноров и реципиентов. Нами были установлены достоверные различия в опытных и контрольных пробах в системе периферической крови коров-доноров и коров-реципиентов. В опытных пробах этот показатель составил 9.60 ± 1.09 ; 10 ± 1.09 ; 12.78 ± 1.09 и 14.78 ± 1.09 , а в контрольных пробах соответственно 2.72 ± 0.05 ($P < 0.001$).

На это указывают утверждение М.А. Фроловой, М.И. Вербицкого, Е.А. Зотикова (1984) и др. о том, что интенсивность, продолжительность и исход иммунологической реакции определяется степенью антигенных различий между донором и реципиентом, уровнем реактивности реципиента, характером трансплантата, наличием в нем лимфоидной ткани удельным содержанием антигенов гистосовместимости.

Эффективность пересадки эмбрионов крупного рогатого скота определяется многими факторами, которые были обобщены NewcombPowson (1980). Вначале считали, что восприимчивость матки в лютиеновую фазу к инфекции и возможность выброса эмбрионов из половой системы самки вследствие стимуляции шейки матки при трансцервикальном введении эмбрионов является причиной низкой эффективности нехирургической пересадки эмбрионов. Однако имитация пересадки эмбрионов осемененным животным показала, что при определенных предосторожностях опасность заноса инфекции в матку маловероятна, а выброс пересаженных яйцеклеток из матки после 4-го цикла отсутствует[3;4].

Установлено, что пересадка эмбрионов в рог матки на стороне яичника с желтым телом по сравнению с его основанием более эффективна. Механизм этого явления еще окончательно не ясен, но можно предполагать, что местоположение эмбриона оказывает прямое влияние на его способность проявлять лютеотропный или антилютеотический сигнал к яичнику во время естественного лютеолизиса.

Эффективность пересадки эмбрионов в значительной степени определяются синхронностью проявления охоты у донора и реципиента. У крупного рогатого скота максимальный процент беременностей получают после синхронной пересадки. Как ранняя, так и запоздалая пересадка эмбрионов сопровождается примерно одинаковым снижением процента их приживляемости.

Полное соответствие по антигенам донора и реципиента возможно только у однояйцевых, оно обеспечивает стойкое приживание пересаженного эмбриона (или органа) без применения иммунодепрессивной терапии. Во всех остальных случаях развивается иммунологический конфликт между реципиентом и трансплантатом. Интенсивность, продолжительность и исход иммунологической реакции определяется степенью антигенных различий между донором трансплантата, наличием в нем лимфоидной ткани, удельным содержанием антигенов гистосовместимости [5].

Таким образом, наши исследования по изучению совместимости животных при трансплантации эмбрионов согласуются с исследованиями Н.О. Суховой и др. (1992). Авторы указывают на необходимость анализа влияния генетического сходства доноров и реципиентов на приживляемость эмбрионов. Ими выявленные факты противоречат сложившемуся представлению о эффективной и лучшей оплодотворяемости коров при осеменении их спермой менее сходных по генотипу быков -производителей. С понижением индекса генетического сходства производителей–доноров, производителей-реципиентов по антигенам эритроцитов крови уменьшается приживляемость трансплантатов-эмбрионов. У животных реципиентов, с прижившимися эмбрионами по сравнению с небеременными, достоверно ниже показатели гетероагглютининов и более высокий уровень естественных (нормальных) антител [6].

Литература

1.Адо А.Д. Иммунология аллергических реакций // Вестник АМН СССР, 1974 .- № 1. – С. 58-62.

2.А.с. 173227, СССР, МКИ G 01 33/53. Способ определения совместимости животных при трансплантации/ Ахмадиев Г.М., Амансугуров А.Г.; - № 4834220/14 – 045815 – Заявлено 20. 04. 9 0; Оpubл. Б.И., 1992, № 17.

3.Сергеев Н.И. и др. Криоконсервирование и трансплантация эмбрионов // Животноводство, 1984.,№ 9.- С. 29-32.

4.Сергеев Н.И., Горбунов В.И. Пересадка эмбрионов у крупного рогатого скота // Животноводство, 1979,- № 12.- С. 49-51.

5.Соколовская И.И., Милованов В.К. Иммунология воспроизведения животных.- М.: Колос, 1981.- 264 с.

6.Сухова Н.О. Приживляемость трансплантатов крупного рогатого скота с учетом иммунобиологического статуса производителей, доноров, реципиентов // Доклады Российской академии с.-х. наук, 1992, № 11-12.- С. 27-30.

7.Тихонов В.Н. Генетические системы групп крови животных.- Новосибирск: Наука, 1985.- 116.

8.Долаев А.Р. Особенности воспроизводительной функции аборигенных карачаевских коз //автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук.- Ставрополь , 2009. -23 с

REFERENCES

1. Ado AD Immunology of allergic reactions // Journal of Medical Sciences of the USSR, 1974. - № 1 - S. 58-62.

2.A.s. 173227, USSR, MКИ G 01 33/53. The method for determining the compatibility of animals for transplantation / Akhmadiev GM Amansugurov AG; - № 4834220/14 - 045 815 - Declared 20. 04. 9 0, publ. B., 1992, № 17.

3.Sergeev NI etc. cryopreservation and embryo transfer // Animal Husbandry, 1984., № 9. - S. 29-32.

4.Sergeev NI Gorbunov, VI Embryo transfer in cattle // Zhivotnovdstvo, 1979, - № 12. - P. 49-51.

5.Sokolovskaya II, VK Milovanov Immunology of reproduction of animals. - M.: Kolos, 1981. - 264.

6.Suhova NO Graft acceptance of cattle with the immunobiological status manufacturers, donors, recipients / / Reports of the Russian Academy of Agricultural Science, 1992, № 11-12. - S. 27-30.

7. Tikhonov VN Genetic systems of blood groups of animals. - Nauka, Novosibirsk, 1985. – 116 c .