

REZUMAT

Cuvinte cheie : vacă, embriotransfer, embrioni, hormoni, FSH,

Principalele obiective ale prezentei teze de doctorat au fost actualizarea unor informații în domeniul embriotransferului la vaci ca și componentă a biotehnologiilor de reproducție.

Studiile s-au axat mai mult pe îmbunătățirea unor tehnici de creștere a potențialului reproductiv al femelelor cu mare valoare genetică.

Teza care se intitulează „**Contribuții la îmbunătățirea biotehnologiei embrio transferului la bovine**” cuprinde un număr de 221 pagini și este structurată pe două părți principale.

Lucrarea cuprinde 61 de figuri și 28 de tabele.

Prima parte a lucrării se desfășoară pe parcursul a 58 pagini și cuprinde patru capitole, reprezentând un studiu bibliografic critic al cunoștințelor actuale despre organogeneza, morfologia funcției de reproducție la vacă și biotehnologiile de reproducție la această specie.

Capitolul I se referă la *organogeneza aparatului genital*, la mecanismele prin care iau naștere diferitele stadii de dezvoltare ale segmentelor aparatului genital femel.

Capitolul II oferă informații despre *morfologia aparatului genital la vacă* și rolul fiecărui segment al acestuia în formarea și dezvoltarea unei noi vieți.

Capitolul III oferă informații privind *fiziologia reproducerii la vacă*, prezentând în detaliu mecanismele neuro-endocrine care controlează succesiunea de evenimente ale funcției de reproducție la vacă. Sistemul nervos central, prin mecanismele sale de control trimite comandă la organele responsabile de secreția hormonilor implicați asigurarea funcției reproductive.

Capitolul IV oferă date despre stadiul actual al *biotehnologiei transferului de embrioni* în lume. Pe parcursul a zece subcapitole sunt descrise în detaliu fiecare etapă din cadrul acestei tehnici.

De asemenea, este prezentată modalitatea prin care aceste tehnici de embriotransfer pot să crească de zece ori sau mai mult într-un an rata de reproducere a vacilor valoroase și de cinci ori sau mai mult viața productivă.

Acest capitol prezintă și modalitatea prin care această activitate de embriotransfer este înregistrată și codificată la nivel internațional, trasabilitatea datelor despre tratamentele făcute donatoarelor și modul de conservare al embrionilor obținuți, pentru ca practicienii să poată desfășura corect programele de sincronizare.

Partea a doua a lucrării se întinde pe 98 pagini și nouă capitole, în care sunt prezentate cercetările personale și concluziile parțiale.

La finalul lucrării sunt prezentate concluziile generale și sursele bibliografice consultate urmate de anexe.

Interesul pentru studierea biotehnologiei embriotransferului rezultă din faptul că după anul 2000, investițiile masive făcute în România în ferme de vaci de lapte de mari dimensiuni a necesitat găsirea rapidă a unor metode de ameliorare genetică, pentru creșterea producției și a productivității.

Capitolul V se referă la *scopul lucrării*, la obiectivele stabilite și importanța multitudinii de factori care influențează reușita embriotransferului.

Lucrarea de față a urmărit mai multe obiectivele importante care au fost sistematizate etapizat, să respecte astfel o ordine cronologică succesivă : selectarea donatoarelor după criterii morfo-productive; selectarea recipientelor; găsirea unor noi protocoale de tratament pentru poliovulație; alegerea unei metode eficiente de recoltare a embrionilor; evaluarea și implantarea embrionilor recoltați; alegerea unei tehnici de crioconservare optime; utilizarea embriotransferului în tratarea unor stări de infecunditate.

Pentru toate aceste obiective majore s-au căutat proceduri de lucru, care să elimine stresul pentru animale și să ușureze activitatea practicienilor, astfel încât embriotransferul să devină o manoperă de rutină și nu o corvoadă.

Capitolul VI se referă la *cercetările privind inducerea poliovulației la vacile donatoare*. Acest capitol este structurat în trei subcapitole.

Primul subcapitol face referire la materialele necesare de lucru (animalele folosite, respectiv 25 de vaci de lapte din rasele Holstein, Montbeliarde și Normandă la care s-au aplicat tratamentele de poliovulație) și metodele utilizate (protocoalele de poliovulație)

Produse comerciale utilizate au fost: Pridolest[®], Folligon[®], PRID[®], Folltropin[®], Pluset[®], Prosolvin[®], Prostol[®].

Subcapitolul doi descrie rezultatele obținute la cele patru loturi de donatoare la care s-au aplicat diferite protocoale de poliovulație.

Un răspuns slab la tratamentul de poliovulație (o medie de 4,8 embrioni colectați per donatoare cu rată medie de recuperare de 39,13%) a fost observat la lotul P1, care a fost poliovulat cu produsul Folligon[®].

Gonadotropina corionică ecvină (PMSG) din produsul Folligon[®] datorită timpului de înjumătățire prea lung, determină dezvoltarea mai multor valuri foliculare fără sincronizarea ovulației.

Lotul P3 unde s-a utilizat produsul Pluset® (fără implant intravaginal cu eliberare lentă de progesteron, PRID®), a avut un răspuns mai bun, o medie de 8 embrioni colectați per donatoare cu o rată medie de recuperare de 66,66%. Lipsa implantului intravaginal PRID® a avut ca efect o secreție de inhibină de către foliculul dominant care a blocat dezvoltarea mai multor foliculi ovarieni din valul folicular următor.

La celelalte două loturi P2 și P4 unde s-a folosit produsul Folltropin® administrat pe cale clasică (intramusculară) și pe cale mixtă (epidural și intramuscular) ambele cu implant intravaginal, răspunsul la tratamentul de poliovulație a fost superior față de loturile P1 și P3 și relativ apropiat între ele. Astfel, la lotul P2 s-au obținut o medie de 9,1 embrioni colectați per donatoare cu o rată medie de recuperare de 77%, iar la lotul P4 în urma analizei rezultatelor, o medie de 8,8 embrioni per donatoare cu rată medie de recuperare de 78,57%.

Rezultatele similare arată că protocolul de poliovulație cu administrarea FSH – lui pe cale mixtă (epidurală și intramusculară) este o alternativă de lucru care poate fi implementată în programele de embriotransfer.

Capitolul VII al prezentei teze tratează etapa *sincronizării ciclului estral între receptoare și donatoare*. Este structurat de asemenea în trei subcapitole: primul subcapitol descrie materialele și metodele de lucru, al doilea subcapitol se referă la rezultatele obținute de la cele patru protocoale de sincronizare, iar în al treilea subcapitol sunt descrise concluziile parțiale.

Au fost selectate 225 de receptoare împărțite în patru loturi, la care s-au aplicat trei protocoale de tratament diferite. Astfel, la loturile S1 și S2 s-a aplicat același protocol de sincronizare dar cu produse comerciale diferite S1 (Pridolest® și Prosolvin®) iar S2 (PRID® și Prosolvin®), la lotul S3 s-a aplicat un protocol de sincronizare cu administrare aleatorie de prostaglandină F2α, iar la lotul S4 s-a aplicat protocolul de sincronizare cu administrare de analog sintetic al prostaglandinei în urma examenului ecografic morfometric al corpului galben.

În urma analizei rezultatelor obținute s-a observat o sincronizare de 90 – 91% la loturile S1 și S2 cu un interval între estrul receptoare – donatoare de + 0,19 ore la lotul S1 și + 0,20 ore la lotul S2.

La lotul S3 tratat aleatoriu cu analog sintetic de prostaglandină F2α s-a obținut o sincronizare de 62% cu un interval între estru receptoare – donatoare de + 0,32 ore.

Cel mai bun rezultat a fost observat la lotul S4 la care s-a obținut o sincronizare de 95%, și un intervalul estru receptoare – donatoare de + 0,17 ore. Acest lucru se datorează avantajului oferit de examinarea și monitorizarea ecografică.

Capitolul VIII se referă la *recoltarea embrionilor* ca etapă importantă în cadrul biotehnologiei embriotransferului. Este împărțit în trei subcapitole ca: materiale și metode utilizate, rezultatele obținute și câteva concluzii parțiale. La subcapitolul întâi sunt prezentate lista materialelor și echipamentelor de care este nevoie ca: medii de lavaj uterin, catetere Luer sau Foley cu dublă cale, tubulatură tip “Y” pahare filtre colectoare cu dimensiunea porilor de 80 microni, plăcuțe, stereolupă pentru evaluarea calității embrionilor, seringi, etc.

Lavajul uterului s-a făcut prin două metode: prima LFC (metoda lavajului fiecărui corn) cu poziționarea cateterului cât mai profund la nivelul cornului uterin și a doua metodă LBS (metoda lavajului bicornual simultan) cu poziționarea cateterului înaintea cervixului.

După executarea ambelor metode de lucru s-au obținut rezultate diferite și anume: prin metoda LFC au fost recoltați un număr total de 69 de embrioni față de 117 prin metoda LBS, o diferență procentuală de 41,03%.

În ce privește numărul embrionilor transferabili s-a constatat de asemenea diferențe semnificative între cele două metode, s-au colectat 57 de embrioni transferabili prin metoda LFC față de 106 prin metoda LFB o diferență procentuală de 46,23% între cele două metode.

Referitor la numărul mediu de embrioni colectați per donatoare s-au observat diferențe comparative între cele două metode, numărul mediu de 6,9 embrioni colectați per donatoare colectați prin metoda LFC față de 9 embrioni colectați per donatoare prin metoda LBS, o diferență procentuală între cele două metode de 23,34%.

În ce privește media embrionilor transferabili per donatoare, s-a constatat o diferență procentuală 30,49%, adică au fost clasificați 5,7 embrioni transferabili prin (LFC) per donatoare comparativ cu 8,2 embrioni transferabili per donatoare prin metoda LFB.

În concluzie metoda LBS (lavajul bicornual simultan) este mai eficientă, mai ușor de executat, mai comodă și mai rapidă decât metoda LFC (lavajul fiecărui corn separat) și poate fi aplicată de către practicieni.

Capitolul IX se referă la etapa de *congelare a embrionilor*, modalitate de păstrare pe termen lung a embrionilor colectați atunci când nu există suficiente receptoare sincronizate sau când se dorește comerțul internațional cu aceștia.

Se structurează pe două subcapitole: primul subcapitol se referă la materialele necesare: medii de congelare, paiete și pipete pentru aspirarea embrionilor, instalație de congelare Criocell, azot lichid și metodele de lucru și pregătirea embrionilor pentru congelare. S-a lucrat după două protocoale de congelare pentru două loturi de embrioni.

Protocolul folosit pentru lotul de embrioni C1 a fost acela cu începerea congelării de la temperatura de 0°C și protocolul pentru lotul de embrioni C2 a fost cu începerea congelării de la temperatura camerei.

Rezultatele obținute la acest capitol se discută în corelație cu rezultatele din **capitolul X**, cu rata de gestației obținută în urma *implantului embrionilor*, întrucât aceste capitole sunt două etape interconectate în cadrul biotehnologiei de embriotransfer. Rata gestației rămâne singura metodă de evaluare a eficacității congelării.

Capitolul X se referă la *implantul embrionilor* proaspeți sau congelați. Acest capitol este structurat pe trei subcapitole: materiale necesare și metode: trei loturi de receptoare sincronizate, ghene speciale de implant (cu capăt metalic rotunjit pentru a facilita traversarea cervixului), procaină 2%, seringi, ace, ecograf Tringa pentru examenul ovarelor și stabilirea pe care corn uterin se va face implantul.

Subcapitolul doi face analiza rezultatelor obținute în urma implantării, iar la subcapitolul trei câteva concluzii parțiale.

Analiza rezultatelor obținute după controlul gestației prin examen ecografic arată că: la lotul T1 (la care s-au implantat embrioni proaspeți) rata gestației obținute a fost de 67% reprezentând un număr de 57 gestații confirmate din 85 embrioni implantați.

La lotul de receptoare T2, la care s-au implantat embrioni congelați din lotul C1 (cu plecare de la temperatura de 0°C), rata gestației obținute a fost de 53%, adică, în urma controlului de gestație, au fost confirmate 19 gestații din 36 embrioni implantați.

La lotul T3 la care au fost implantați embrioni congelați din lotul C2 (la care temperatura de plecare a congelării a fost temperatura camerei) rata de gestație a fost de 48%, fiind confirmate în urma controlului de gestație 20 de gestații din 42 embrioni implantați.

Analiza comparativă pe loturi arată că cea mai bună rată de gestație (67%) a fost observată la lotul T1 la care s-a folosit pentru implant embrioni proaspeți, o rată de gestație care se încadrează în limitele 60 – 70% raportate de IETS (International EmbryoTransfer Society). [www.iets.com]

În ce privește rata gestației dintre loturile T2 și T3 (la care au fost implantați embrioni congelați) se observă o diferență de 5% între cele două loturi (53% la T2) față de (48% la T3) ceea ce presupune că metoda de congelare a embrionilor din lotul C1 (congelați cu plecare de la temperatura de 0°C) a fost mai eficientă decât metoda de congelare a embrionilor din lotul C2, datorită timpului mai scurt de expunere a embrionilor în spațiul extrauterin.

Capitolul XI se referă la *terapia infecundității dobândite* cu ajutorul embriotransferului. În acest capitol structurat tot pe trei subcapitole cu materiale și metodă,

rezultate și discuții și concluzii parțiale sunt descrise modalitățile prin care anumite femele foarte bune producătoare pot să-și continue activitatea productivă chiar dacă cea reproductivă s-a încheiat.

Pentru acest capitol au fost tratate prin implant embrionar un lot de 6 vaci cu obstrucția căilor genitale anterioare, diagnosticate în urma testării permeabilității cu fenolsulfaleină.

După executarea controlului de gestație au fost diagnosticate 3 gestații, ceea ce înseamnă că au fost recuperate 50% din vacile care ar fi fost reformate.

Terapia prin embrio transfer a stărilor de infecunditate dobândită poate fi o soluție alternativă pentru salvarea unor femele și prelungirea activității productive a acestora.

Capitolul XII descrie concluziile generale desprinse în urma realizării acestui studiu.

Capitolul XIII se refera la câteva recomandări practice pentru tehnicienii din teren.

Bibliografia cuprinde un număr de 128 referințe care au fost citate de-a lungul tezei dintre care 21 români și 107 străini.