

УДК 612: 636.4:59.082.591.1.

© 2008

*Мартиненко Н.А., доктор біологічних наук,  
Чирков О.Г., кандидат сільськогосподарських наук,  
Денисюк П.В., кандидат біологічних наук,  
Лобченко В.О., кандидат біологічних наук,  
Інститут свинарства ім. О.В. Квасницького УААН*

## ТРАНСЦЕРВІКАЛЬНА ТРАНСПЛАНТАЦІЯ ЕМБРІОНІВ У СВИНАРСТВІ XXI СТОЛІТТЯ: ПРОБЛЕМИ І ПЕРСПЕКТИВИ

*Рецензент – академік УААН, доктор біологічних наук, професор В.Ф. Коваленко*

**Ключові слова:** трансцервікальна трансплантація, ембріон, імплантація, біотехнологія, свинарство.

**Постановка проблеми.** Трансплантація ембріонів – провідна ланка всіх репродуктивних біотехнологій, без якої неможливо одержати кінцевий результат, тобто приплід.

Однак практичне визнання у свинарстві трансплантація ембріонів одержала, перш за все, в плані оздоровлення стад, як метод вилучення неінфікованого генетичного матеріалу від цінних у племінному відношенні маток зі стад, уражених вірусними хворобами, а також для запобігання занесення інфекції при введенні нового генетичного матеріалу в стада [47-48; 51]. І в цьому аспекті хірургічний метод трансплантації (ХМТ), не зважаючи на складність і високу вартість, вважається економічно вигідним. Проте вагомим поширенням у свинарстві трансплантація ембріонів зможе набути лише за умов наявності ефективних способів нехірургічної, тобто трансцервікальної трансплантації (ТЦТ).

**Мета досліджень:** розкрити закономірності застосування у сучасному свинарстві ТЦТ ембріонів і пов'язані з цим проблеми.

**Методика досліджень** – аналіз і синтез літературних та власних експериментальних і теоретичних даних.

**Аналіз основних досліджень і публікацій, у яких започатковано розв'язання проблеми.** Існує близько двох десятків способів ТЦТ, і майже всі вони базуються на конструюванні пристроїв, здатних долати опір цервікса (cervix uteri) механічним шляхом, що у більшості випадків вимагає повної анестезії або седатії реципієнта [29, 31, 36, 46 та інші]. Таким, що не вимагає

*Висвітлено сучасний стан і перспективи розвитку трансцервікальної трансплантації (ТЦТ) ембріонів у свинарстві. Зроблено висновки про епізодичний характер її застосування у 2000-2008 рр., при одночасному поширенні в інноваційних біотехнологіях застосування хірургічного і напівхірургічного (ендоскопічного) методів трансплантації. Причина – у низькому рівні імплантації після ТЦТ, у зв'язку з чим зусилля дослідників із різних країн світу концентруються на вирішенні саме цієї проблеми.*

анестезії, є спосіб W. Haezeleger а. В. Kemp, 1994 [27], але він може бути застосований виключно до свиноматок, які неодноразово поросилися, і після перевірки у комерційних умовах [22] на поголів'ї 44 свиноматок, з яких опоросилося 18 (7,2±2,8 поросят), повідомлень про подальше застосування цього

способу не з'являлось. У цьому досліді було 22,85% відновлення циклів реципієнтами з 23-го по 49-й день, що свідчить про високу ембріофетальну смертність, пов'язану, очевидно, з початковою локалізацією ембріонів у тілі матки. Зокрема доведено [9] негативний вплив секретів тіла матки на виживання сперміїв кнур, що, можливо, не є індиферентним також і для ембріонів.

Принципово новий, заснований на фізіологічних особливостях матки свині [4], атравматичний і придатний для застосування в умовах свиноферми, спосіб ТЦТ ембріонів було розроблено в Інституті свинарства ім. О.В. Квасницького УААН [1]. Спосіб забезпечує 83,33% опоросів і розмір гнізда поросят 9,2±1,06, серед яких 76,3±13,3% – трансплантаційного походження. Однак і він не одержав поширення на комерційному рівні через необхідність складного й дорогого генетичного аналізу походження приплоду попередньо спарованих реципієнтів. Великі сподівання поклалися на глибоку внутрішньоматкову трансплантацію (ГВМТ) ембріонів свиней, започатковану розробкою універсального пристрою для осіменіння, і ТЦТ ембріонів [5] і дослідженнями Martinez E. et al., 2001-2004 [37]. Одержання 70,8% опоросів і 6,9±0,7 поросят було сенсаційним, оскільки новий метод ТЦТ дозволяв пересаджувати обмежену кількість ембріонів ранніх стадій розвитку в краніальну тре-

тину рогу матки. Цим способом було одержано приплід із вітрифікованих бластоцист [24], із системи ембріопродукції *in vitro* [53], приплід запланованої статі при застосуванні спермсексінгу [43]. Проте, як і в розробках попередників, негативні випадки були пов'язані з труднощами проходження цервікального каналу та рогу матки гнучким катетером. Намагання подолати опір м'язів матки призводить до їх спазматичного скорочення і повної непрохідності через позапрогове подразнення рецепторів. Окрім того, факт наявності у багатьох дослідках ГВМТ відновлення циклів реципієнтами пізніше 23 діб (близько 71,4% випадків, за даними Bathgate R, Morton K.M. et al., 2007 [13], свідчить про високий рівень ембріональної смертності і необхідності доопрацювання протоколу ГВМТ ембріонів свиней. Впродовж останніх років, до сьогодні включно, повідомлення про позитивні результати від застосування ГВМТ ембріонів свині надходять переважно від дослідницьких груп, які займаються розробкою цього способу і не мають стабільності при використанні іншими дослідниками. Головною причиною називають травму матки катетером, що було доведено групою дослідників із Австралії – Bathgate R et al., 2007 [12-13], Bathgate R et al., 2008 [11], в експериментах зі штучного осіменіння свиней цим пристроєм. Усі свиноматки відновили цикли у межах 57 діб після осіменіння сексованою спермою і 37% – після осіменіння несексованою. Кровотеча зі слизової оболонки матки і цервікса мала місце у 27% свиноматок. При цьому, цервікальна кровотеча відповідала наявності крові на катетері або появі її з вульви відразу після видалення катетера. Маткова ж кровотеча проявлялася витіканням крові назовні через 12 год. або пізніше, навіть на 2-3-ій день після осіменіння. Окрім того, мав місце і комбінований варіант обох типів кровотечі. Незважаючи на те, що автори не знайшли вірогідної різниці у результатах запліднення свиноматок із кровотечею і без такої, наявність кровотечі, безумовно, впливає на виживання трансплантованих ембріонів, для яких кров є токсичною. Розробники способу ГВМТ (JM Vazquez, J Roca, MA Gil, et al., 2008) заперечують об'єктивність досліджень і висновків групи австралійських учених, посилаючись на конструктивні недоліки використаного ними пристрою [55]. Проте з усього цього постає головне: істотне значення для уникнення травми репродуктивного тракту реципієнта при ГВМТ має хронологія проникності цервікса і рогів матки в залежності від гормонального регулюючого

впливу, об'єктивним вираженням чого є дні естрального циклу свиноматки.

У наших дослідженнях (неопубліковані дані) визначення днів естрального циклу реципієнта, в які доцільно здійснювати трансцервікальну ГВМТ ембріонів свиноматкам і навіть ремонтним свинкам, привело до висновку, що оптимальним періодом є 5,5-6-та доба естрального циклу. У цей період у 100% спроб була зареєстрована проникність рогу матки для внутрішньоматкового катетера на глибину 80-115 см від голівки зовнішнього катетера, який вводився до упору в перші замки цервікса. Оскільки довжина рогів матки статевозрілих ремонтних свинок складає 100-115 см, а у свиноматок, які мали один опорос, – 130-150 см, то найбільш імовірним місцем розташування верхівки внутрішнього катетера (а, отже, й місцем введення ембріонів) є середня, або навіть краніальна третина рогу. Мінімальна проникність рогу матки була у 2-3-денних реципієнтів: 50% дослідженого поголів'я. Затримка у проходженні замків цервікса також залежала від дня естрального циклу реципієнта. Поодинокі її випадки тривалістю від 3 до 25 хв. спостерігали на 4-5,5 дні, а максимально вираженою затримка була на шосту добу: у всіх реципієнтів, тривалістю від 23 до 47 хв. За цими загальними попередніми даними, оптимум для ГВМТ ембріонів свині (ранні бластоцисти) припадає на 5,5 добу естрального циклу.

Аналіз сучасних наукових публікацій з питань трансплантації ембріонів у свинарстві свідчить про вельми обмежене застосування ТЦТ. Майже весь приплід від застосування різних репродуктивних біотехнологій одержується з використанням хірургічного методу трансплантації (ХМТ). Так були одержані поросята з вітрифікованих ембріонів у дослідках Berthelot F, et al., 2000 [15], Beeb L.F., et al., 2002 [14], Misumi K. et al., 2003 [39] та ін. Слід підкреслити, що низький рівень опоросів реципієнтів у таких дослідках пов'язаний із недостатньою розробкою інноваційних технологій, а не застосованого в них ХМТ, про що, наприклад, свідчить зростання до видової норми вагітності та опоросів у реципієнтів одночасно з удосконаленням процесу кріоконсервації ембріонів [16]. З ефективністю окремих репродуктивних технологій пов'язана кількість пересаджуваних ембріонів, що впливає на умови їх розвитку у матці реципієнта. Так, для одержання кількох поросят у результаті ядерної пересадки необхідно, аби реципієнту було трансплантовано не менше 120 модифікованих ембріонів, що пов'язане не тільки з низьким рівнем їх імплантації,

але й неадекватними культуральними умовами *in vitro*, а тому пошукові роботи ведуться в обох напрямках [49]. Для порівняння, щоб отримати позитивний результат від трансплантації вітрифікованих ембріонів достатньо пересадити всього 20 шт., щоб мати 55% опоросів і 4-5 поросят у гнізді. Проте результати ХМТ вітрифікованих бластоцист у виробничих умовах комерційних стад істотно вищі, ніж при застосуванні ТЦТ. Наприклад, ХМТ 568 вітрифікованих ембріонів здійснили R.D. Cameron et al., 2004 [18], і одержали поросят від 75% реципієнтів. Трансгенні й нетрансгенні клони мініатюрних свиней нещодавно одержано Kugome M. et al., 2008, при застосуванні ХМТ реконструйованих ембріонів у ампулу яйцепроводу або ріг матки домашніх свиней [33]. Аналогічно при використанні ХМТ, Estrada JL et al., 2008, одержали клони Юкатанських мінісвиней [23], а Wakai T. et al., 2008, – мінісвиней, клонованих із використанням ооцитів домашньої свині [56]. Взагалі клони свиней одержано із застосуванням ХМТ у численних дослідках [20-21; 34-35 та ін.]. Отже, незважаючи на існування різноманітних способів ТЦТ, ефективність їх залишається низькою або вони не затребувані через конструктивні недоліки пристроїв чи складність процедури. Все більше поширюється напівхірургічний спосіб ендоскопічної трансплантації ембріонів [17, 28, 42, 44-45]. Низька ефективність будь-якого способу ТЦТ обумовлена комплексом факторів фізичної та фізіологічної природи, які виникають у процесі трансплантації, перешкоджаючи імплантації ембріонів у матці реципієнта [8]. У зв'язку з цим останнім часом розгорнулися дослідження, спрямовані на попередження дії таких негативних чинників і підвищення рівня імплантації. Виявлено вищий рівень імплантації бластоцист, ніж ранніх чи пізніх морул, тому в сучасній репродуктології поширена практика культивування до стадії бластоцисти призначених для трансплантації модифікованих або одержаних *in vitro* ембріонів [14, 21, 25, 35]. До речі, засновники ГВМТ також пересаджували ембріони на стадії бластоцисти [19, 37]. У зв'язку з цим виникає сумнів щодо необхідності застосування досить травматичної ГВМТ, адже для бластоцист не є обов'язковою локалізація у верхній третині рогу матки. Головне те, що, незважаючи на численні варіанти ТЦТ, залишається актуальним зменшення травмування при проходженні цервікально-маткового каналу, і чим менше глибина введення катетера у ріг, тим менша зона і сила подразнення. Навіть незначне подразнення рецеп-

торів матки викликає викид простагландину  $F_{2\alpha}$ , який є специфічним лютеолітичним фактором [50]. Це призводить до резорбції жовтих тіл і загибелі не лише трансплантованих, але й власних ембріонів реципієнта, якщо він був попередньо спарований. На підставі розкритих фізіологічних закономірностей моторики і секреторної активності матки свині, ми дійшли висновку про необхідність визначити оптимальну для локалізації ембріонів ділянку рогу матки, мінімально віддалену від біфуркації для зменшення подразнення. У результаті було розроблено альтернативний спосіб ТЦТ ембріонів, який має назву локально-фіксованого і був запатентований в Україні [3] після одержання приплоду трансплантаційного походження [7]. Очевидно, що саме за таким способом майбутнє ТЦТ ембріонів свині, – підтвердженням тому є поява аналогічних розробок вчених із Японії – Nakazawa Y., Misawa H., Fujino Y. et al., стаття яких була подана до редакції журналу *J. Reprod. Dev.*-29.10.07 і опублікована 2008 р. – Vol. 54, N 1, February. – P. 30-34 [41]. Для порівняння: пріоритет нашого патенту від 02.07.2007, публікація статті, вересень 2007 р. На підставі розкритих у нашій лабораторії просторових особливостей впливу маткових секретів на життєдіяльність спермій [9], було визначено оптимальну ділянку фіксованої позиції внутрішнього катетера у розі матки на глибині 35 см від біфуркації. Практично до такого ж висновку (на підставі морфометричних досліджень матки) дійшли й японські дослідники, визначивши, що оптимальним місцем локалізації трансплантованих ембріонів є відстань 20-30 см від біфуркації. Співпадають і дані відносно оптимальної кількості середовища трансплантації для виживання ембріонів до народження: 1,6 мл. (а за нашими даними – 2 мл.).

Здійснений нами (Н.А. Мартиненко, 2008) аналіз досліджень із підвищення ефективності трансплантації ембріонів тварин різних видів, а також у медичній репродуктології, свідчить, що подальший їх напрям усе більше концентрується навколо питання підвищення рівня імплантації у реципієнта [8]. Окрім фізичних і фармацевтичних способів запобігання експульсії пересаджених ембріонів, існують суто фізіологічні. Це розробка об'єктивних тестів якості ембріонів [6, 32, 38, 40, 51, 54] і жорстка їх селекція. Це також метод попереднього парування реципієнтів із створенням умов для пріоритетного розвитку трансплантантів шляхом корекції хронологічної конфігурації біологічної системи "мати-плід" [2], який забезпечує 83,33% опоросів і  $76,3 \pm 13,3\%$

поросят трансплантаційного походження у гнізді. [10]. Це і варіант спільної трансплантації одиничних нормальних ембріонів і певної кількості партеногенотів [30], заснований на тому ж фізіологічному принципі. Суть у тім, що партеноготи здатні жити близько 30 діб у матці реципієнта, підтримуючи її гормональний статус, необхідний для процесу імплантації, що й забезпечує близько 77,8% опоросів нормальними поросятами, які розвинулись із поодиноких ембріонів. Цей метод запропоновано для одержання приплоду із реконструйованих (трансгенних, клонованих, заморожених тощо), нечисленних ембріонів. Досить перспективним стосовно підвищення рівня імплантації є також метод введення спермальної плазми у матку реципієнта [10, 26, 47].

**Узагальнюючі висновки з аналізу сучасного стану ТЦТ ембріонів:**

#### БІБЛІОГРАФІЯ

1. Патент UA 28926 A, Кл. А 61D 19/04 Україна. Спосіб нехірургічної трансплантації ембріонів свині / Мартиненко Н.А., Денисюк П.В., Чирков О.Г.; пріор. 12.11.97; Опубл. 29.12.99, Бюл. №8 від 29.12.99; Бюл. №5-11 від 16.10.2000.
2. Патент UA 4709, Кл. А 61D19/00. Україна. Спосіб оптимізації умов розвитку трансплантованих трансцервікально ембріонів свині / Чирков О.Г., Мартиненко Н.А., Денисюк П.В., Корінний С.М.; пріор. Опубл. 08.11.02; Бюл. №2 від 15.02.2005.
3. Патент UA № 28378 U, Кл. А 61 D 19/04.Україна. Спосіб локально - фіксованої внутрішньоматкової трансплантації ембріонів свиней// Мартиненко Н.А., Чирков О.Г., Денисюк П.В., Лобченко В.О.; пріор. 02.07.07. Опубл. 10.12.07. Бюл. №20.
4. Патент UA №,13543 Кл. А 61D19/00. Україна. Спосіб визначення ступеня проникності цервікального каналу свині // Чирков О.Г., Мартиненко Н.А., Денисюк П.В., - пріор. від 22.07.2005.- Опубл. 17.04.2006. Бюл. № 4.
5. WO/2002/102272. Device for sow intra-uterine insemination and embryo transfer // Int. N P T/US2002/004889, Int. filling date 30.02/2002// SIMMET, Ludvig, Priority date: 14.06.2001 US 09/883,135.
6. *Мартиненко Н.А.* Еластичність та міцність прозорої оболонки яйцеклітин великої рогатої худоби як показник їх біологічної нерівноцінності та різноякісності. – Фізіол. журн. АН УРСР. – 1965. – XI. – 4. – С. 432-436.
7. *Мартиненко Н.А., Коваленко В.Ф., Чирков О.Г. та ін.* Нове вітчизняне досягнення у галузі ре-

– на сучасному етапі застосування ТЦТ ембріонів у свинарстві має епізодичний характер і припадає, в основному, на експериментальні розробки окремих дослідницьких груп;

– практично в усіх інноваційних репродуктивних біотехнологіях для одержання приплоду з обмеженої кількості модифікованих ембріонів застосовується метод хірургічної трансплантації і набуває поширення напівхірургічний (ендоскопічний) метод як для трансплантації, так і для вирішення питань молекулярно-генетичної регуляції репродуктивних процесів;

– причиною обмеженого застосування ТЦТ є низький рівень імплантації й виживання до народження ембріонів-трансплантантів, у зв'язку з чим зусилля дослідників із різних країн світу спрямовані на вирішення саме цієї проблеми.

продуктивної біотехнології // Вісник аграрної науки. – 2007. – №9. – С. 37-40.

8. *Мартыненко Н.А.* Факторы повышения уровня имплантации трансплантированных эмбрионов (обзор). Вісник Полтавської державної аграрної академії. – 2008. – №2. – С. 223-230.

9. *Пилипенко С.В.* Вивчення впливу секрету різних відділів матки та яйцепроводів свиноматки на виживаність спермів кнура. // Світ медицини та біології. – 2006 – № 1. – С. 44-48.

10. *Чирков О.Г.* Фізіологічні фактори оптимізації умов розвитку в матці реципієнта ембріонів свині, трансплантованих нехірургічно (трансцервікально). Дисертація. ... канд. с.-г. наук, 03.00.13. – фізіол. людини і тварин. Ін-т свинарства ім. О.В. Квасницького УААН. – Полтава, 2005. – 134 с.

11. *Bathgate R., Grossfeld D., Susetio M. et al.* Early pregnancy loss in sows after low dose, deep uterine artificial insemination with sex-sorted, frozen-thawed sperm// J.Anm.Sci. – 2008. – 104. – (2-4). – P. 440-444.

12. *Bathgate R., Eriksson B.M, Thomson P.C. et al.* Field fertility of frozen-thawed boar sperm at low doses using non-surgical, deep uterine insemination // Anim. Reprod Sci. – 2007. – 103. – (3-4). – P. 323-35.

13. *Bathgate R., Morton K.M., Eriksson B.M., et al.* Non-surgical deep intra-uterine transfer of in vitro produced porcine embryos derived from sex-sorted frozen-thawed boar sperm// Animal Reprod. Sci. – 2007. – 99. – P. 82-92.

14. *Beeb L.F., Cameron R.D., Blackshaw A.W. et al.* Piglets born from centrifuged and vitrified early and

- peri-hatching blastocysts// *Theriogenology*. – 2002. – 57. – 9. – P. 2155-2165.
15. *Berthelot F., Martinat-Botte F., Locatelli A. et al.* Piglets born after vitrification of embryos using the open pulled straw method // *Cryobiology*. – 2000. – 41. – 2. – P. 116-124.
16. *Berthelot F., Martinat-Botte F., Perreau C., Trqui M.* Birth of piglets after OPS vitrification and transfer of compacted morula stage embryos with intact zona pellucida// *Reprod Nutr Dev*. – 2001. – 41. – 3. – P. 267-272.
17. *Brussow K-P., Tomer H., Kanitz W., Ratky J.* In vitro technologies related to pig embryo transfer // *Reprod Nutr Dev*. – 2000. – 40. – 5. – P. 469-80.
18. *Cameron R.D., Beebe L.F., Blackshaw A.W., Keates H.L.* Farrowing rates and litter size following transfer of vitrified porcine embryos into a commercial swine herd // *Theriogenology*. – 2004. – 61. – (7-8). – P. 1533-1543.
19. *Cuello C., Berthelot F., Martinat-Botte F. et al.* Piglets born after non-surgical deep intrauterine transfer of vitrified blastocysts in gilts. *Anim. Reprod.Sci.* – 2005. – 85. – (3-4). – P. 275-286.
20. *Du Y., Kragh P.M., Zhang Y. et al.* Piglets born from handmade cloning, an innovative cloning method without micromanipulation// *Theriogenology*. – 2007. – 68. – 8. – P. 1104-1110.
21. *Du Y., Kragh P.M., Zhang Y. et al.* Piglets born from vitrified cloned blastocysts produced with a simplified method of delipitation and nuclear transfer // *Cloning Stem Cells*. – 2007. – 9. – 4. – P. 469-476.
22. *Ducro-Steverink D.W., C. G. Peters, C.C. Maters et al* Reproduction results and offspring performance after non-surgical embryo transfer in pigs // *Theriogenology* 2004. – 62. – (3-4). – P. 522-531.
23. *Estrada J.L., Collins B., York A. et al.* Successful cloning of the Yucatan minipig using commercial/occidental breeds as oocyte donors and embryo recipients// *Cloning Stem Cells*. – 2008. – 10. – 2. – P. 287-296.
24. *Cuello C., Berthelot F., Martinat-Botte F. et al.* Piglets born after non-surgical deep intrauterine transfer of vitrified blastocysts in gilts// *Anim. Reprod.Sci.* – 2005. – 85. – (3-4). – P. 275-286.
25. *Gajda A., Smorag Z.* Culture of pig embryos before cryopreservation // *Reprod. Fert. Dev.* – 2005. – 17. – 2. – P. 193-198.
26. *Geva E., Yovel I., Lerner-Geva L., Lessing J.B.* Intrauterine insemination before transfer of frozen-thawed embryos may improve the pregnancy rate for couples with unexplained infertility // *Fertil Steril*. – 2000. – 73. – 4. – P. 755-760.
27. *Hazeleger W., Kemp B.* Farrowing rate and litter size after transcervical embryo transfer// *Reprod.Dom.Anim.* – 1994. – 29. – P. 481-487.
28. *Hazeleger W., Kemp B.* Recent developments in pig embryo transfer // *Theriogenology*. – 2001. – 56. – 8. – P. 1321-1331. Review.
29. *Kano M., Ichikawa A., Masuda T., Kobayashi S.* Non-surgical porcine embryo transfer by a balloon catheter producing subsequent high farrowing rate // *Anim. Sci. Journal*. – 2000. – 71. – 6. – P. 579-585.
30. *Kawarasaki T., Otaki M., Tsuchiya S. et al.* Co-transfer of parthenogenotes and single porcine embryos leads to full-term development of the embryos // *ARS2008*. – 2008 Apr 8. (Pub. ahead of print).
31. *Killian D.B., Steawart A.N.* Litter size following nonsurgical embryo transfer in gilts// *J.Anim.Sci.* – 1991. – 69. – Suppl. 1. – Referat 160.
32. *Kuliev A., Verlinsky Y.* Impact of preimplantation genetic diagnosis for chromosomal disorders on reproductive outcome / *Reprod. Biomed. Online*. – 2008. – 16. – 1. – P. 9-10.
33. *Kurome M., Ishikawa T., Tomii R. et al.* Production of transgenic and non-transgenic clones in Miniature pigs by somatic cell nuclear transfer// *J. Reprod. Dev.* – 2008. – 54. – 3. – P. 156-163.
34. *Kwang-Wook Park, Liangxue Lai, Hee-Tae Cheong et al.* Mosaic Gene Expression in Nuclear Transfer-Derived Embryos and the Production of Cloned Transgenic Pigs from Ear-Derived Fibroblasts – *Biol Repr.* – 2002. – 66. – P. 1001-1005.
35. *Lee J.S., Kim H.S., Hyin S.H. et al.* Production of transgenic cloned piglets from genetically transformed fetal fibroblasts selected by green fluorescent protein// *Theriogenology*. – 2005. – 63. – 4. – P. 973-991.
36. *Li J., Rieke A., Day B.N., Prather R.S.* Technical note: porcine non-surgical embryo transfer// *J.Anim.Sci.* – 1996. – 74. – P. 2263-2268.
37. *Martinez E.A., Caamano J.N., Gil M.A. et al.* Successful nonsurgical deep uterine embryo transfer in pigs // *Theriogenology*. – 2004. – 61. – 1. – P. 137-146.
38. *MASSON* Prognostic factors of implantation / 2004. – 33. – N1. – C2. – P. 21-24.
39. *Misumi K., Suzuki M., Sato S., Saito N.* Successful production of piglets derived from vitrified morulae and early blastocysts using a microdroplet method // *Theriogenology*. – 2003. – 60. – 2. – P. 253-260.
40. *Murayama Y., Yoshida M., Mizuno J. et al.* Elasticity Measurement of Zona Pellucida Using a Micro Tactile Sensor to Evaluate Embryo Quality // *J. Mammalian Ova Research*. – 2008. – 25. – 1. – P. 8-16.
41. *Nakazawa Y., Misawa H., Fujino Y. et al.* Effect

- of volume of non-surgical embryo transfer medium in ability of porcine embryos to survive to term / *J.Reprod.Dev.* – 2008. – 54. – 1. – P. 30-34.
42. NOTES: the hybrid technique// *J Laparoendosc Adv Surg Tech A.* 2007. – 17. – 4. – P. 402-406.
43. *Rath D., Ruiz S., Sieg B.* Birth of female piglets following intrauterine insemination of a sow using flow cytometrically sexed boar semen. *Vet Rec* 2003. – 152. – P. 400-401.
44. *Ràtki J., Brüssow K.-P., Torner H. et al.* Minimal invasive surgery in pig reproductive studies.- *Reprod. biotech. update and its related physiology.* – Eds.: Miyamoto H., Mquabe N., Shobo H.. – Kyoto, Yapan. – 2000. – P. 303-310.
45. *Ràtky J., Brüssow K.-P., Solty L. et al.* Ovarian response, embryo recovery and results of embryo transfer in hungarian native pig breed// *Theriogenology.* – 2001. – 56. – 5. – P. 969-978.
46. *Reichenbach H.D., Modl J., Brem G.* Piglets born after transcervical transfer of embryos into recipient gilts // *Vet.Rec.* – 1993. – 133. – P. 36-39.
47. *Robertson S.A., O'Leary S., Armstrong D.T.* Influence of semen on inflammatory modulators of embryo implantation/ *Reprod.Suppl.* – 2006. – 62. – P. 231-245.
48. *Romachn Jim.* Embryo preserves genetics, side-steps PRRS // *National Hog Farmer.* – 2000. – Nov. 15.
49. *Sag D., Hass P., Petersen B. et al.* Improved in vitro development of porcine embryos produced by nuclear transfer, IVF and parthenogenesis// *Reprod. Fert. Dev.* – 2005. – 17. – 2. – P. 181-182.
50. *Schrack F.N. et al.* Prostaglandin F<sub>2α</sub> appears to directly influence early embryonic survival in Cattle: would administration of Flunixin meglumine be beneficial during embryo transfer// *Proc. American Embryo Transfer Assoc.* – 2000. – P. 9-16, Sacramento CA.
51. *Scott L.* The biological basis of non-invasive strategies for selection of human oocytes and embryos// *Hum. Reprod.Update.* – 2003. – 9. – 3. – P. 237-249.
52. *Smits J.M., Hazeleger W., Merks J.W.* Resistance of porcine embryos Merks J.W. Improved pig health with farm management systems. Project “Beautiful stream of pigs” 21 // *Tijdschr Diergeneeskd.* – 2002. – 127. – P. 219-225.
53. *Suzuki C., Iwamura S., Ioshioka K.* Birth of Piglets through the Non-Surgical Transfer of Blastocysts Produced In Vitro// *J. Reprod. Dev.* – 2004. – 50. – 4. – P. 487-491.
54. *Tsai Y.C., Chung M.T., Sung Y.H. et al.* Clinical value of early cleavage embryo/ *Int J Gynaecol Obstet.* – 2002. – 76. – 3. – P. 293-297.
55. *Vazquez J.M., Roca J., Gil MA. et al.* Low-Dose Insemination in Pigs: Problems and Possibilities// *Reprod.Dom.Anim.* – 2008. – 43 (Suppl. 2). – P. 347-354.
56. *Wakai T., Sugimura S., Yamanaka K. et al.* Production of viable cloned miniature pig embryos using oocytes derived from domestic pig ovaries // *Cloning Stem Cells.* – 2008. – 10. – 2. – P. 249-262.