

ТЕХНИКА МИКРОХИРУРГИЧЕСКОЙ ДЕНУДАЦИИ ЯЙЦЕКЛЕТОК И ЭМБРИОНОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

В.И. Лисин

Институт животноводства УААН

В статье представлена техника денудации яйцеклеток и эмбрионов млекопитающих путем разрушения их прозрачной оболочки разрезанием. Разработанная техника денудации проста в исполнении и технологически удобна для использования в различных микрохирургических методах. Она является щадящей для объекта и обеспечивает минимальную степень риска механического повреждения клеточной массы при освобождении ее из прозрачной оболочки.

яйцеклетка, эмбрион, микроманипуляции, денудация

Процедура освобождения яйцеклеток и эмбрионов из прозрачных оболочек (т.е. денудация) довольно широко применяется и в экспериментах с этими объектами и в некоторых эмбриональных технологиях (таких как получение монозиготных близнецов из частей эмбрионов, а также получение эмбриональных химер). Существуют различные способы денудации, каждый из которых характеризуется своими особенностями и, соответственно, имеет как определенные преимущества, так и недостатки при использовании в различных ситуациях. Выбор исследователем того или иного способа денудации определяется целью работы, качеством и количеством используемых для этого объектов, а также материальной оснащенностью лаборатории.

Денудация объекта может выполняться как чисто механически [1-3], так и в комплексе с химическими, в т.ч. и ферментативными, воздействиями на прозрачную оболочку, вызывающими ее лизис и облегчающими процесс денудации [4-5]. Среди существующих в настоящее время способов денудации следует выделить три наиболее известных и часто применяемых на практике способа. Один из них, пожалуй, самый простой и доступный, был использован и описан А.Тарковским еще в 1961 году [1] в пионерских опытах по получению агрегационных химерных эмбрионов мыши. Он представляет собой чисто механическое удаление прозрачной оболочки путем пипетирования эмбриона Пастеровской пипеткой, внутренний диаметр которой немного меньше размера объекта [1]. Второй способ денудации осуществляется с помощью протеолитического фермента проназы, в растворе которой прозрачные оболочки сильно истончаются и после отмывания объектов в чистой культуральной среде легко разрушаются препаровальными иглами. Это более легкая и удобная методика освобождения клеточной массы яйцеклеток и эмбрионов из прозрачных оболочек. Она была предложена Б.Минтц в 1964 году [4] и является наиболее распространенной и сейчас [5]. Существенным преимуществом этих двух способов денудации является то, что их можно выполнять вручную без применения сложного и дорогостоящего микроманипуляционного оборудования. Поэтому они являются наиболее простыми и доступными, но вместе с тем имеют и не менее существенные недостатки. Первый способ денудации достаточно грубый. Он связан со значительными и частыми периодическими деформациями зародыша, которые не только разрушают его прозрачную оболочку, но также могут причинить повреждения и самой клеточной массе. Использование для денудации проназы, по свидетельству результатов некоторых работ, также снижает процент успешного развития зародышей [6]. Более щадящие условия

денудации позволяет обеспечить использование микроманипуляционного оборудования и соответствующих микроинструментов. Наиболее распространенный способ микрохирургического освобождения яйцеклеток или эмбрионов из прозрачных оболочек состоит в разрезании оболочки объекта до половины микроиглой или микроножом и извлечении клеточной массы из оболочки через полученный разрез инъекционной микропипеткой (путем инъекции в перивителлиновое пространство небольшого объема среды и выталкивания за счет этого клеток наружу [2] или путем засасывания клеток в полость инструмента и выведения их оттуда за пределами оболочки [3]). Для фиксации объекта во время этих манипуляций используют удерживающую микропипетку (микроприсоску). “Узким местом” этого способа денудации является то, что степень деформации клеточной массы микроинструментами при манипуляциях по ее извлечению из прозрачной оболочки обуславливает все же достаточно высокую вероятность ее механического повреждения. Также при денудации объекта этим способом после разрезания прозрачной оболочки необходимо производить замену режущего инструмента на инъекционную микропипетку, что приводит к увеличению общей продолжительности манипуляций.

Поэтому целью представленных в данной статье исследований было усовершенствование способа микрохирургической денудации яйцеклеток и эмбрионов млекопитающих. Суть усовершенствования состояла в разработке техники и определении наиболее благоприятных условий механического освобождения клеточной массы из прозрачной оболочки, которые в дальнейшем могли бы найти применение в различных микрохирургических методах, используемых в эмбриоинженерии и в экспериментах с яйцеклетками и эмбрионами. Исходя из вышеизложенного, к разрабатываемой технике денудации были выдвинуты следующие требования и поставлены соответствующие исследовательские задачи для их достижения:

- Во-первых, и сама техника и условия проведения манипуляций по денудации яйцеклеток и эмбрионов должны быть щадящими для объекта и позволять свести к минимуму деформации его клеточной массы и вероятность ее механического повреждения. Для этого в план исследований была включена проверка технологических возможностей новой техники денудации при работе с объектами в обычных для них изотонических (0,29 Осм) условиях, а также в условиях гипертонии, которая обуславливает выход воды из клеток, уменьшение за счет этого объема клеточной массы и, как следствие, увеличение размеров оперативного пространства в перивителлиновой области. Это значительно облегчает и делает более безопасным для клеток проведение манипуляций внутри прозрачной оболочки [3, 7]. Экспериментально установлено, что оптимальной для проведения подобного рода операций с яйцеклетками и эмбрионами млекопитающих является гипертоническая 1,5 Осм среда [7]. Помещение этих объектов в физиологическую среду с такой концентрацией непроникающих веществ не оказывает на них ощутимого отрицательного воздействия, однако в 2,8 раза позволяет уменьшить объем их клеток [7].

- Во-вторых, новая техника денудации должна быть технологически более удобной, чем ее аналоги, для использования в составе различных микрохирургических методов. Достичь этого представляется возможным, разработав технические приемы, которые бы позволяли денудировать яйцеклетку или эмбрион при помощи только двух инструментов – микроприсоски и микроиглы - без использования третьего инструмента – инъекционной

микропипетки, которой, по наиболее распространенной технике микрохирургической денудации, клеточная масса извлекается из прозрачной оболочки через предварительно сделанный разрез. Кроме упрощения самого этапа денудации, это в ряде случаев позволяло бы также избегать лишней процедуры замены микроинструментов при переходе к следующему технологическому этапу и сократить общую продолжительность манипуляций в некоторых микрохирургических методах.

Материалы и методы исследований. Для отработки новой техники денудации использовали свежеполученные и деконсервированные эмбрионы крупного рогатого скота, а также свежеполученные яйцеклетки и эмбрионы мыши.

Микроманипуляции с этими объектами проводили при помощи электромеханического микроманипулятора (производства фирмы “Opton”, Германия), механического микроманипулятора и насоса (производства НПО “Биоприбор”, г.Пушино, Россия) под визуальным контролем посредством инвертированного микроскопа “Axiovert-35” (производства фирмы “Opton”, Германия).

В качестве фиксирующего инструмента при проведении манипуляций использовали удерживающие микропипетки (микроприсоски), а в качестве режущего – стеклянные микроиглы с уплощенной (мечевидной) формой рабочей части, которые имеют улучшенные режущие свойства. Эти микроинструменты изготавливали из стандартных стеклянных капилляров (стекло - “Пирекс”; длина - 180 мм; наружный диаметр - 1,5 мм; внутренний диаметр - 1,0 мм) при помощи микрокузницы МК-2 (производства НПО “Биоприбор”, г.Пушино, Россия).

При разработке техники денудации определяли оптимальное местоположение друг относительно друга и количество последовательных разрезов прозрачной оболочки, необходимых для полного освобождения из нее клеточной массы яйцеклетки или эмбриона. Также определяли условия, которые бы обеспечивали и удобство проведения манипуляций и, вместе с тем, максимальную сохранность клеточной массы во время денудации объектов. Микроманипуляции с яйцеклетками и эмбрионами проводили в изотонической (0,29 Осм) и гипертонической (дополненной NaCl до осмолярности 1,35-1,5 Осм) среде Дюльбекко с 10 % фетальной телячьей сыворотки при температуре 20-25 °C. При сравнении результатов денудации в изотонии и в гипертонии учитывали длительность и удобство проведения манипуляций, а также их влияние на клеточную массу объектов.

Результаты исследований. Разработанная техника денудации заключается в разрушении прозрачной оболочки яйцеклетки или эмбриона разрезанием и представляет собой выполнение в определенной последовательности трех разрезов этой структурной части объекта (рис.). Эту операцию выполняют при помощи микроприсоски и микроиглы и ее условно можно разделить на **4 этапа**:

I этап: получение первого разреза прозрачной оболочки (см. рис.(I)). Объект фиксируют в нужном положении за прозрачную оболочку микроприсоской (1), вводят в перивителлиновое пространство микроиглу (2) и, поджимая клеточную массу в сторону, прокалывают прозрачную оболочку насквозь и вводят кончик микроиглы в полость микроприсоски, минуя клетки (3-4). Потом сбрасывают отрицательное давление в присоске и отводят ее назад до полного освобождения кончика микроиглы из ее полости (5). Прижимают

пронизанную микроиглой прозрачную оболочку к поверхности предметного стекла (6) и разрезают ее до половины (7).

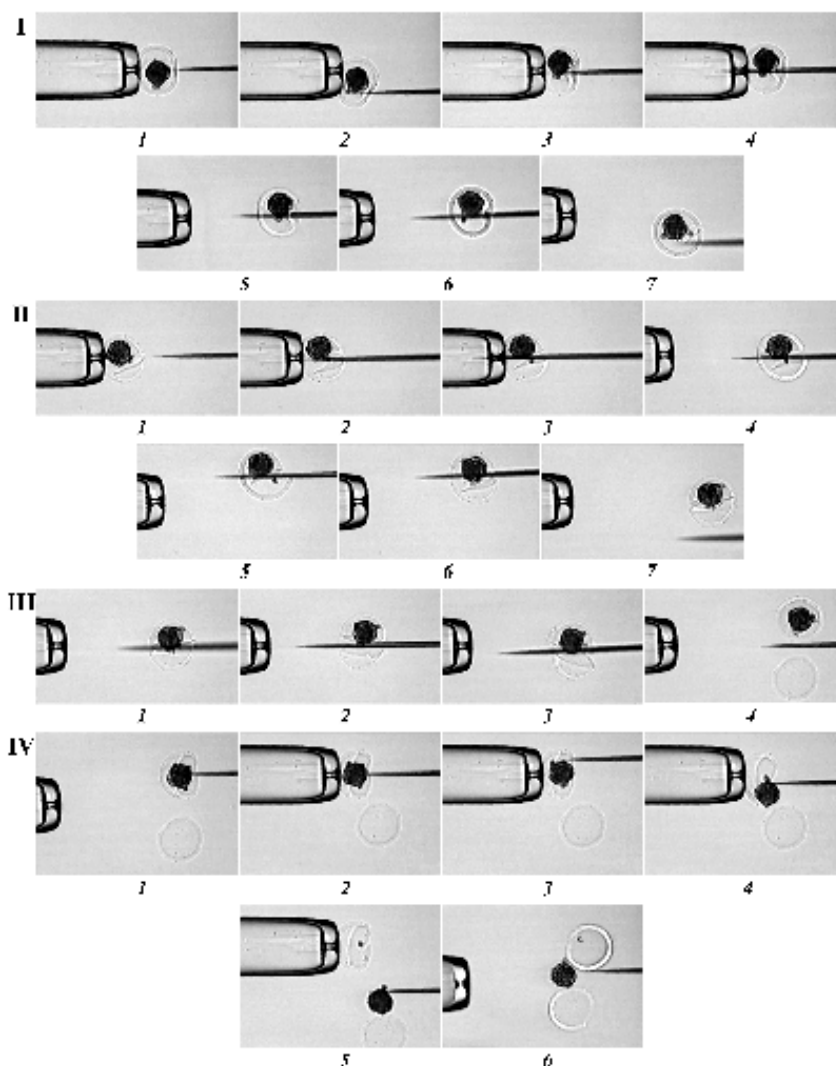


Рис. Разрушение прозрачной оболочки разрезанием в гипертонической среде для денудации эмбриона крупного рогатого скота:

I- получение первого разреза прозрачной оболочки; II- получение второго разреза прозрачной оболочки, продолжающего первый; III- получение третьего разреза, который окончательно разделяет прозрачную оболочку на две части; IV- извлечение клеточной массы эмбриона из половинки прозрачной оболочки.

II этап: получение второго разреза прозрачной оболочки, продолжающего первый (см. рис.(II)). После разрезания прозрачной оболочки до половины объект снова фиксируют микроприсоской вблизи от края разреза так, чтобы разрез был в верхнем или в верхнем боковом положении относительно центральной оси этого инструмента (1). Вводят микроиглу в перивителлиновое пространство через первый разрез и прокалывают прозрачную оболочку в месте фиксации, вводя кончик микроиглы в полость присоски и поджимая находящуюся в оболочке клеточную массу в сторону (2-3). Сбрасывают отрицательное давление в присоске и отводят ее назад от объекта до полного освобождения кончика микроиглы из ее полости (4). Прижимая микроиглу к поверхности предметного стекла (5-6), получают второй разрез прозрачной оболочки, соединяющийся с первым (7). В результате оболочка почти перерезана на две части, которые остаются соединенными лишь узким участком.

III этап: получение третьего разреза, который окончательно разделяет прозрачную оболочку на две части (см. рис.(III)). Окончательное разрезание прозрачной оболочки производят уже без фиксации микроприсоской. Микроиглу медленно опускают на объект, сориентированный разрезом прозрачной оболочки кверху (1). Вводят инструмент между кромками разреза в перивителлиновое пространство и, обходя клеточную массу, пережимают (разрезают) прозрачную оболочку на две части (2-4). Во время этих манипуляций клеточная масса может полностью выйти из прозрачной оболочки и уже не контактировать с ней. Тогда на этом этапе денудация объекта завершается.

IV этап: извлечение клеточной массы из половинки прозрачной оболочки (см. рис.(IV)). Если после полного разрезания прозрачной оболочки на две части клеточная масса остается в одной из половинок, то ее для полного освобождения извлекают оттуда. Для этого надавливают микроиглой на кромку горизонтально лежащей половинки прозрачной оболочки с клеточной массой и переводят ее в вертикальное положение (1). Подводят к половинке оболочки микроприсоску и фиксируют ею половинку с выпуклой стороны (2). Боковым движением кончика микроиглы извлекают клеточную массу из вертикально удерживаемой половинки (3-5). После этого денудация объекта является полностью завершенной (6).

Для отработки и испытания разработанной техники денудации было прооперировано 99 яйцеклеток и эмбрионов мыши и 20 эмбрионов крупного рогатого скота разных стадий развития и разного качества. Было установлено, что описанная техника позволяет производить денудацию яйцеклеток и эмбрионов всех стадий развития от ооцита 2-го порядка до полностью расширенной бластоцисты как в изотонических, так и в гипертонических условиях. Однако следует отметить, что манипуляции, связанные с разрезанием прозрачной оболочки, гораздо удобнее проводить в гипертонических условиях (см. рис.). Уменьшение объема клеточной массы внутри прозрачной оболочки и увеличение за счет этого размера оперативного пространства в перивителлиновой области позволяют выполнять эти операции быстрее и с более высокой сохранностью эмбрионального материала, чем в изотонии. По результатам хронометрии денудация одной яйцеклетки или эмбриона этим способом в изотонии длилась от почти 6 до 20 минут, а средняя продолжительность операции составила около 11 минут. При этом у 7 эмбрионов (20 %) из 35, использованных для этого яйцеклеток и эмбрионов мыши, было отмечено повреждение отдельных клеток, а клеточная масса 3 объектов (8,6 %) была разрушена полностью. Денудация одного объекта в гипертонической среде длилась примерно от 3 до 15 минут и в среднем составила около 7,5 минут. Из 64 прооперированных в гипертонии мышинных яйцеклеток и эмбрионов 6 объектов (9,4 %) получили частичные повреждения клеточной массы и 3 объекта (4,6 %) были повреждены глобально. Основные затраты времени при проведении денудации по разработанной методике приходятся на ориентирование и фиксацию объекта в нужном положении. При проведении денудации в изотонии значительное количество времени также занимает аккуратный обход и поджимание клеточной массы микроиглой в сторону при каждом введении этого инструмента в перивителлиновое пространство и прокалывании прозрачной оболочки насквозь.

Следует также отметить, что кроме условий проведения манипуляций на продолжительность и качество денудации влияют также такие факторы как стадия развития объекта, его качество и видовая принадлежность. Было установлено, что по разработанной методике наиболее легко денудировать яйцеклетки, ранние и поздние морулы, а также ранние бластоцисты. С

эмбрионами ранних докомпактизационных стадий развития, а также с расширяющимися и расширенными бластоцистами эту операцию нужно проводить аккуратнее, осторожнее, а значит и медленнее, чтобы избежать разрушения и отторжения от клеточной массы отдельных клеток (у эмбрионов докомпактизационных стадий развития), а также нарушения целостности трофобласта (у бластоцист). При денудации эмбрионов, имеющих повреждения разного характера и степени, манипуляции следует стараться выполнять так, чтобы избегать лишних контактов микроиглы с поврежденными клетками и цитоплазмой для сведения к минимуму загрязнений инструмента, делающих его липким, что усложняет и замедляет проведение операции и создает риск новых повреждений клеточной массы объекта. Что касается опыта использования разработанной техники денудации на эмбриональном материале разных видов животных, то можно отметить, что проще производить денудацию яйцеклеток и эмбрионов тех видов животных, которые имеют более толстую и жесткую прозрачную оболочку. В сравнительном аспекте сложность денудации яйцеклеток и эмбрионов тех видов животных, с которыми нам приходилось работать, нарастает в следующей последовательности: свиные → коровьи и овечьи → мышинные.

Описанную технику денудации мы успешно применяем в нашей лаборатории в экспериментах по получению агрегационных химерных эмбрионов и частей зародышей (половинок и четвертинок), а также в опытах по изучению осмотического поведения яйцеклеток и эмбрионов некоторых видов млекопитающих.

Выводы:

1. Разработанная техника денудации и выбранные условия проведения операции (гипертоническая (1,35-1,5 Осм) среда) являются щадящими для объекта, поскольку позволяют свести к минимуму связанные с этим процессом деформации клеточной массы, что способствует повышению ее сохранности на данном технологическом этапе.

2. Эта операция проста в исполнении и является удобной для использования в некоторых микрохирургических методах. Она выполняется при помощи микроприсоски и микроиглы и не требует использования третьего инструмента - инъекционной микропипетки — для извлечения объекта из прозрачной оболочки, что позволяет избежать процедуры замены микроинструментов и сократить время денудации. К тому же данная техника денудации очень хорошо технологически стыкуется с операцией разделения клеточной массы эмбриона на части, которой она предшествует в некоторых методах микрохирургического получения частей эмбрионов и химерных зародышей. Поскольку обе эти операции выполняются микроиглой, то опять же устраняется необходимость замены микроинструментов, что улучшает технологичность указанных методов.

3. Фактором, который ограничивает использование представленной техники денудации в работе с эмбриональным материалом, является то, что разрушение прозрачной оболочки разрезанием можно использовать для освобождения из нее клеточной массы яйцеклеток или эмбрионов только в тех случаях, когда не ставится задача сохранения прозрачной оболочки объекта.

Библиографический список

1. Tarkowski A.K. Mouse developed from fused eggs //Nature, Lond.– 1961.- Vol.190.- P.857-860.

2. Кузнецов В.Е. Методические рекомендации по микрохирургическому делению эмбрионов крупного рогатого скота.- К., 1991.- 24 с.

3. Пат. 17876А України, МКИ6 А61D 19/04. Спосіб отримання химерних ембріонів/ Безуглий М.Д., Гордієнко Н.О., Лісін В.І. (Україна).- №96083085; Заявл. 01.08.1996; Опубл. 31.10.1997; Бюл.№5.- 4 с.

4. Mintz B. Formation of genetically mosaic mouse embryos, and early development of "lethal (t^{12}/t^{12})-normal" mosaics //J. Exp. Zool.- 1964.- V.157.- P.85-100.

5. Биология развития млекопитающих. Методы: Пер. с англ./ Под ред. М. Манк.- Москва: Мир, 1990.- С.40-43.

6. Mullen R.J., Carter S.C. Efficiency of transplanting normal zona-free and chimeric embryos to one and both uterine horns of inbred and hybrid mice// Biol. Reprod.- 1973.- Vol.9.- P.111-115.

7. А.с.1727822 1А СССР, МКИ А61D 19/04, С12Q 1/24. Способ проведения микрохирургических операций с яйцеклетками и эмбрионами /Осташко Ф.И., Безуглый Н.Д., Гордиенко Н.А. (СССР).- №4832540/15; Заявл. 12.04.1992; Опубл. 23.04.1992; Бюл.№ 15.- 3 с.

ТЕХНІКА МІКРОХІРУРГІЧНОЇ ДЕНУДАЦІЇ ЯЙЦЕКЛІТИН ТА ЕМБРІОНІВ ССАВЦІВ

В.І. Лісін, Інститут тваринництва УААН

У статті представлено техніку денудації яйцеклітин та ембріонів ссавців шляхом руйнування їх прозорої оболонки розрізуванням. Розроблена техніка денудації проста у виконанні і технологічно зручна для використання в різних мікрохірургічних методах. Вона є неруйнівною для об'єкта і забезпечує мінімальний ступінь ризику механічного пошкодження клітинної маси при вивільненні її з прозорої оболонки.

THE MICROSURGICAL TECHNIQUE OF MAMMALIAN OOCYTES AND EMBRYOS DENUDATION

V. I. Lisin, Institute of animal science of the UAAS

The technique of mammalian oocytes and embryos denudation by zona pellucida cutting is presented in this article. The elaborated technique of denudation is a simple in execution and technologically convenient for using in different microsurgical methods. It is also spared for object and provides minimal risk degree of cell mass mechanical injuring during it recovering from zona pellucida.

УДК 631.333

НАУКОВІ ПІДХОДИ ДО ВДОСКОНАЛЕННЯ ТЕХНОЛОГІЇ ПРИСКОРЕНОГО БІОТЕРМІЧНОГО КОМПОСТУВАННЯ ОРГАНІЧНИХ ВІДХОДІВ

О.О. Ляшенко

Інститут механізації тваринництва

Розглянуті особливості вдосконалення технологічного процесу прискореного компостування гною з рослинними органічними відходами. Наведено математичну модель розрахунку компонентного складу збалансованих компостних сумішей, а також режимні параметри процесу.

гній, органічні відходи, компост, прискорене компостування, математична модель, режимні параметри

Одним із важливих аспектів створення технологій прискореного компостування відходів є зростаючі вимоги до охорони довкілля. Наступний, не менш важливий аспект, це використання відходів тваринництва, як вторинних