

ПОРІВНЯЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РІЗНИХ МЕТОДІВ ПОСЛАБЛЕННЯ ЕМБРІОНІВ-РЕЦИПІЄНТІВ У КУРЕЙ

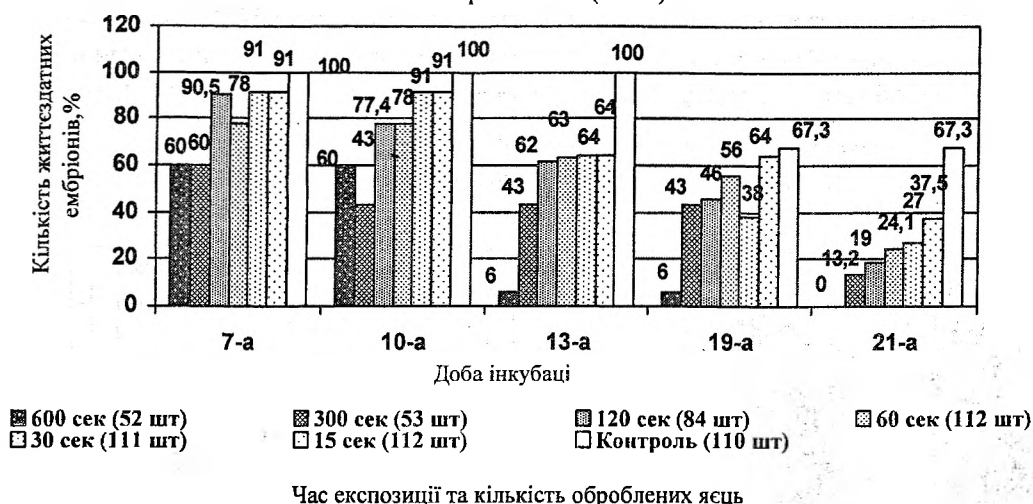
Ембріони стадії розвитку Х (Eyal-Giladi & Kochav, 1976) були частково стерилізовані по лінії первинних статевих клітин (ПСК) ультразвуковим, ультрафіолетовим та рентгенівським опроміненням. Для цієї мети також використовували фізичне руйнування центральної області бластодерми випалюванням. Ультразвукове опромінювання (44 кГц) дозволяло отримувати ембріони з показником заселеності гонад первинними статевими клітинами близько 47% зі зниженням виводимості яєць до 62,7%. При рентгенівському опромінюванні дозою у 400 рад, отримували ембріони, частково стерильні по лінії ПСК до 49% при виводимості понад 53%. Показана неможливість використання фізичного руйнування центральної області бластодерми та ультрафіолетового опромінювання для обробки майбутніх реципієнтів ПСК при створенні гермінативних химер.

Вступ

Відомо кілька способів послаблення або часткової стерилізації гонад ранніх ембріонів птиці. Вони спрямовані на штучну елімінацію власної лінії статевих клітин майбутнього реципієнта. Подалі, такі підготовлені “господарі” можуть бути використані як “мішені” при трансплантації первинних статевих клітин (ПСК) від ембріонів-донорів. В залежності від руйнівного фактору, способи підготовки реципієнта можна класифікувати на фізичні, хімічні та променеві. Час застосування руйнівного пресингу повинен відповідати тому часу ембріонального розвитку, коли відбувається концентрування ПСК у тканинах зародку. Так, ПСК ідентифікуються у зоні зародкового півмісяця ембріону на стадіях розвитку 2-11 [Hamburger and Hamilton, 1951], у крові між стадіями 7-17 та у гонадних пагорбах від стадії

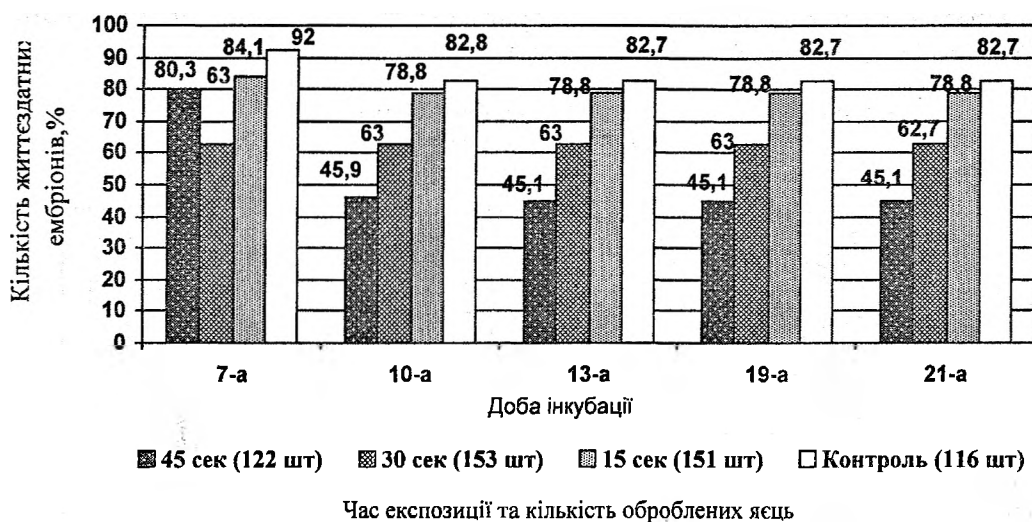
розвитку 16 і до 5-ти діб інкубації. Фізичне вилучення зони зародкового півмісяця на 7-й стадії розвитку призводило до смертності 97% ембріонів на 14-ту добу інкубації [6]. Використання ультрафіолетового опромінення для знешкодження ПСК описана як ефективна процедура [8].

Схема 1. Життєздатність ембріонів по добах інкубації після обробки ультрафіоле опроміненням (120Вт)



Порушення внутрішньогонадних ПСК ранніх ембріонів ультрафіолетовим опромінюванням веде до розвитку деяких з них зі стерильними гонадами. Ультрафіолет блокує міграцію

Схема 2. Життєздатність ембріонів по добах інкубації після опромінення ультразвуком (44кГц)

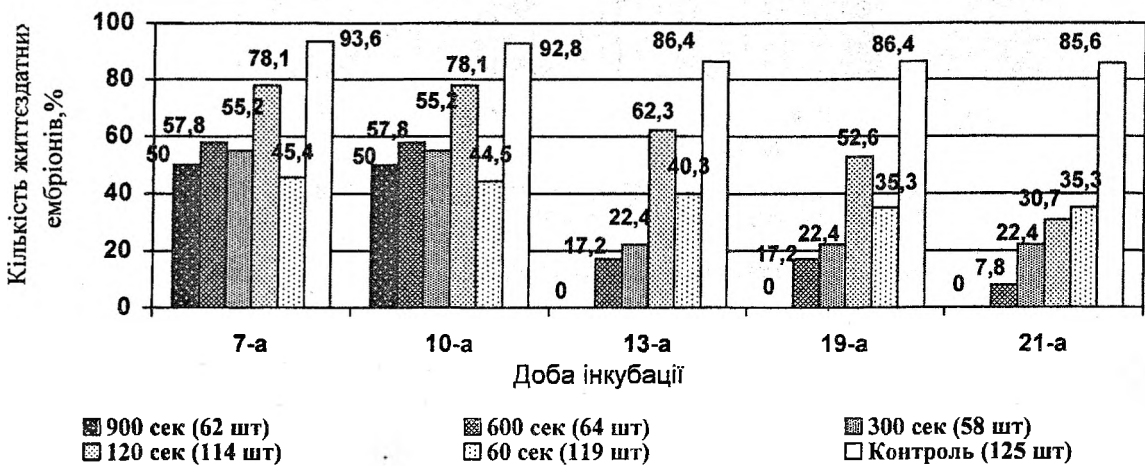


гоноцитів у залози завдяки втраті ними псевдоподіального руху [11]. Використання лазера для випалювання зародкового півмісяця призводило до великої ембріональної смертності (30%) при низьких показниках стерильності - 35% [7]. Хемостерилізація препаратами "Бусулфан" і "Мілеран" дає змогу отримувати частково стерильних ембріонів з показником стерильності 62-75% [2]. Після проведення ін'єкції у таким чином оброблені ембріони, близько 64% донорських перенесених клітин розміщувалися у області гонади у межах 24 годин розвитку [10]. Поява

значних тератогенних ефектів при використанні цих ембріотоксичних препаратів знижує життєздатність ембріонів під час інкубації, хоча і спостерігається досить ефективно заселення гонадної стромы клітинами донорського походження. Доведена доцільність використання різних видів іонізуючого опромінення для отримання послаблених або частково стерильних господарів: γ -променів (ізотопи ^{60}Co) та рентгену [3;9;8]. За такими методиками стає можливим опромінювання інтактного яйця без порушення цілісності шкаралупи, яке значно знижує життєздатність ембріонів на інкубації. Після ін'єкції суспензії ПСК у такі ембріони, клітини донора ефективно колонізували тканини, що приводило до створення гермінативних химер [9].

У наших дослідженнях було проведено порівняння ефективності впливу фізичного випалювання центральної області бластодерми, іонізуючого та ультрафіолетового опромінення,

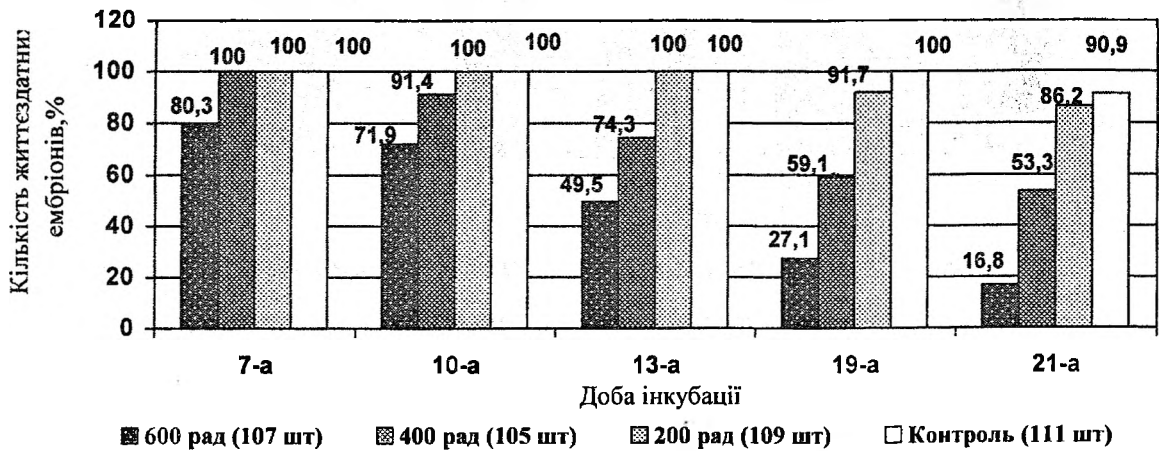
Схема 3. Життєздатність ембріонів по добах інкубації після обробки ультразвуковим опроміненням (44кГц)



Час експозиції та кількість оброблених яєць

а також розробленого нами ультразвукового методу [1] на стерилізацію гонад, життєздатність послаблених ембріонів під час інкубації та їх виводимість.

Схема 4. Життєздатність ембріонів по добах інкубації після обробки рентгенівським опроміненням



Доза опромінення та кількість оброблених яєць

Умови та методика проведення досліджень

Дослідження проводили на ембріонах, які одержували з свіжознесених яєць курей порід род-айланд та білий легорн. Ембріони знаходились на X-й стадії розвитку [Eyal-Giladi, Kochav, 1976]. Для прорізання покривів яйця, користувалися колесом з абразивного покриття. Шкаралупа з підшкаралупною мембраною, або тільки шкаралупа зточувалися до утворення вікна \varnothing 5-7мм. Усі маніпуляції з ембріонами проводили в стерильних умовах. Для цього використовували установки місцевого обезпилювання УО-БВ та УМО-1.

При фізичному знешкодженні частини бластодерми, стрижень мікронагрівача (\varnothing 300мкм) вводили через вікно у шкаралупі, прокалюючи бластодерму. Прогрів проводили протягом 2-3 секунд, після чого виймали мікронагрівач, доливали 1,5-3мл рідинного білку та закривали отвір поліетиленовою плівкою та 2-ма шарами синтетичного лейкопластира. Яйця інкубували до вилуплення курчат (120 шт.). Для опромінення ультрафіолетом ($\lambda=300-420\text{nm}$) використовували освітлювач люмінесцентний ОІ-19 з лампою ДРК-120; світлофільтри УФС6-3 та УФС6, теплозахисний світлофільтр СЗС7. Світло фокусували на бластодерму яйця через прорізаний отвір та закріплену на ньому поліетиленову плівку. Яйця експонували 15; 30; 60; 120; 300 та 600 секунд. У контрольній групі використовували неопромінені яйця з прорізаним вікном. Для ультразвукового впливу на ембріони використовували диспергатор ультразвуковий УЗДН-2Т вихідної потуги 400Вт з конічною насадкою (\varnothing поверхні - 15мм). Шкаралупу яєць зточували до підшкаралупної мембрани. Яйце занурювали у ємність з водою та опромінювали частотою 44 кГц протягом 15; 30; 45; 60; 120; 300; 600 та 900 секунд. У контрольній групі використовували яйця, шкаралупа яких зточувалася до підшкаралупної мембрани. Після обробки яєць ультрафіолетом та ультразвуком, прорізаний отвір закривали 2-ма шарами лейкопластира. Обробку яєць опроміненням рентгеном проводили через шкаралупу за допомогою установки РУМ-17 (44 кеВ; фільтр поглинання - 3,0Al). У цих дослідках, інтактні яйця опромінювали дозами у 200; 400; 600 та 800 рад ($\pm 10\%$). У якості контролю використовували неопромінені інтактні яйця.

Після обробки, яйця інкубували до вилуплення курчат (група 1), до 48-ї години інкубації (група 2) та 6-ї доби інкубації (група 3). Ембріони, інкубовані 48 годин вилучали з яйця за допомогою кілець фільтрувального паперу та фарбували борним карміном для отримання їх тотальних препаратів. Стадія розвитку ембріона визначалася за таблицями Hamburger & Hamilton (1951). На 6-у добу інкубації проводився гістологічний контроль заселеності гонад ПСК підраховуючи їх після фарбування гематоксиліном та еозином.

Результати експериментів та їх обговорення

При випалюванні центральної області бластодерми мікронагрівачем (300мкм) відбувалися значні ушкодження ембріону та жовткової мембрани. У результаті цього, спостерігали виткання жовтку під час інкубації (70% ембріонів на 2 гу добу) та відбувалася затримка у розвитку зародків. Виводимість таких яєць не перевищувала 5%.

Ембріони, на які діяли ультрафіолетовим, ультразвуковим та рентгенівським опроміненням мали більш високі показники життєздатності під час інкубації (Схеми 1; 2; 3; 4). Однак, процедура розкривання покривів яйця, яка відбувалася при опроміненні ультрафіолетом, значно зменшувала життєздатність ембріонів під час інкубації. Це призводило до зниження кількості курчат, які вилупилися з таким чином оброблених яєць. Відмічалось гальмування у розвитку всіх ембріонів, починаючи з 2-ї доби інкубації, та не відбувалося закриття алантоїсу на 11 добу після опромінення ультрафіолетом, ультразвуком та рентгенівським опроміненням (крім зародків, опромінених $R=200$ рад). Ембріони, оброблені ультрафіолетом та ультразвуком показували значне відставання у розвитку вже на 7-у добу інкубації. Зародки, опромінені УФ протягом 600 секунд, УЗ 900 секунд та R 800 рад, зовсім не доживали до виводу. Час вилуплення курчат відтягувався на 24-48 годин після обробки УФ, пропорційно тривалості попереднього опромінення. Курчата, які виводилися з яєць, опромінених УЗ 120, 300 та 600 секунд затримувалися на виводі до 23-23,5 доби. Ембріони, оброблені рентгенівським опроміненням гинули головним чином протягом 13-19 доби і також спостерігалася затримка у виводі курчат. Так, вивід курчат з яєць, опромінених попередньо 200, 400, 600 рад затримувався на 24,

39 і 46 годин, відповідно. Зниження виводимості яєць до 53,3; 86,2; 78,8; та 62,7% спостерігали після опромінення, відносно, R-400, 200 рад; УЗ-15, 30 секунд. Такі показники вважали потенційними для вибору дози обробки. Низька виводимість після фізичного руйнування центральної частини бластодебри випалюванням та після застосування ультрафіолету не надавали змогу вважати ці методики ефективними при підготовці преін'єкційних реципієнтів.

Аналіз тотальних препаратів опромінених ембріонів, інкубованих 48 годин показав відставання у їх розвитку. Результати приведені у таблиці 1.

Таблиця 1

Розвиток ембріонів (48 год) після обробки ультразвуковим, ультрафіолетовим та рентгенівським опроміненням

Ультразвук Експозиція опромінення (сек)	Кількість пар сомітів, шт	Ультрафіолет Експозиція опромінення (сек)	Кількість пар сомітів	Рентген доза опро- мінення (рад)	Кількість пар сомітів
15	17,3±0,42	15	14,8±0,65	200	12,8±0,32**
30	16,3±0,56	30	13,3±0,68	400	12,6±0,6**
45	15,5±0,58*	60	6,7±1,2**	600	10±0,8**
60	14,4±0,4**	--	--	800	9,6±0,7**
Без опромінення	17,3±0,37	Без опромінення	14,7±0,22	Без опромінення	17,5±0,61

* - при $P \leq 0,05$; ** - при $P \leq 0,001$

Стадія розвитку ембріонів визначалася по кількості осьових сегментів за таблицями Hamburger & Hamilton (1951). Так, після опромінення рентгеном дозою у 800; 600; 400 та 200 рад ембріони мали стадії розвитку 10-; 10; 11-; 11-, відносно, та 13- у контрольній групі (Фото 1, 2). Після опромінення ультрафіолетом, стадія розвитку 48 годинних ембріонів визначалася така: 9-; 11+; 12- за експозиціями 60; 30; 15 секунд, та 12- у ембріонів з контрольної групи. Оброблені ультразвуком ембріони демонстрували стадії розвитку 12-; 12-; 12+; 12+ при експозиціях 60; 45; 30; 15 секунд, у контролі - 12+ (Фото 3).

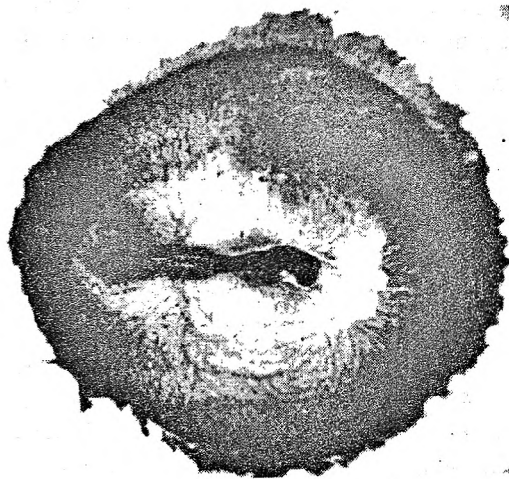


Фото 1. Розвиток курячого зародку (48 годин інкубації). Інтактне яйце – (контроль). Стадія розвитку 13-. Фарбування: борний кармін. 4,2^x

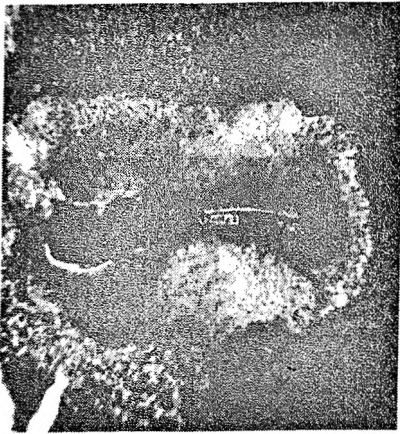


Фото 2. Розвиток ембріону (48год) після обробки рентгенівським опроміненням (400рад). Стадія розвитку 11-. 7,2^x

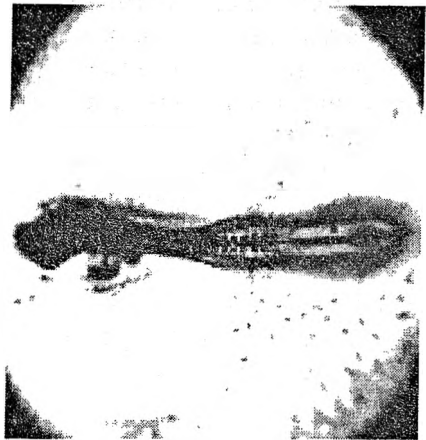


Фото 3. Розвиток ембріону (48год) після обробки ультразвуковим опроміненням (30 секунд). Стадія розвитку 12+. 7,2^x

Підрахування кількості ПСК, які заселили гонади, проводили для 5 ембріонів за 10-ма поперечними зрізами на 6-ту добу інкубації. Також визначалася кількість дегенеруючих ПСК та визначався відсоток дегенерації для кожного з видів попередньої обробки. Загальні результати представлені у таблиці 2.

Таблиця 2

Контроль стерильності гонад після обробки ембріонів ультрафіолетовим, ультразвуковим та рентгенівським опроміненням

(УФ) Експозиція опромінення (сек)	Ліва гонада			Права гонада		
	ПСК	дПСК	% дегенерації	ПСК	дПСК	% дегенерації
15	136,6±5	70,6±7	33,9±2,4**	87,2±2	62,6±5	41,5±2,3**
30	168±17	128,3±5	43,6±2,8**	99,3±6	87±4	46,7±1,3**
60	107±5	148±19	57,3±4,2**	88,3±5	126±17	58,4±3**
120	110±11	135,8±5	55,4±2**	84±4	110±1	56,8±1**
(УЗ) Експозиція опромінення (сек)	Ліва гонада			Права гонада		
	ПСК	дПСК	% дегенерації	ПСК	дПСК	% дегенерації
15	200±5,8	131±4,4	39,5±1,3**	91,4±3,57	60±4,72	39,4±1,29**
30	186±10,3	144±9,52	46,8±1,2**	93,4±6,65	70,2±4,24	43±2,77**
45	184,4±5,32	164,6±4,35	47,1±0,6**	104,6±1,6	88±5,96	45,6±1,72**
60	151,2±6,06	212,6±2,58	58,4±1,2**	84,6±3,75	106,8±3,9	55,8±0,9**
(Рентген) Доза, рад	Ліва гонада			Права гонада		
	ПСК	дПСК	% дегенерації	ПСК	дПСК	% дегенерації
200	227,8±7,45	83,8±1,39	26,9±3,44*	142,4±4,5	72,4±3,88	33,6±0,85**
400	158,4±2,8	151±2,86	48,8±0,5**	104,6±9,9	108,4±2,4	51,3±2,25**
600	104±3,39	170±15,5	61,1±2,1**	56,4±2,84	108±12,9	65±2,6**
Без опромінення	305,8±11,8	44,2±9,84	12,78±2,08	86,8±8,97	21,4±4,2	19,6±1,3

* - при $P \leq 0,01$; ** - при $P \leq 0,001$

Вибір засобу часткової стерилізації раннього ембріону не повинен базуватися виключно на показнику стерильності гонад за відсотком дегенерації ПСК. Ці чинники лише відображають заселеність гонадних пагорбів гоноцитами. Інтегрований аналіз даних повинен включати високу ембріональну життєздатність та максимальний відсоток отримання живих особин на виводі. Тільки такий підхід може бути використаний при розробці програм по трансплантації клітин донора.

Так, випалювання частини бластодерми веде до значних ушкоджень ембріональних тканин, які призводять до великої ембріональної смертності під час інкубації. Отримати частково стерильних по лінії статевих клітин реципієнтів після опромінення ультрафіолетом (до 58%) можливо, але висока смертність ембріонів не надає можливості використовувати такі ембріони у якості "мішеней" ПСК. Адже, сама техніка оперування яйця знижує виводимість до 67%. Використання ультразвукового опромінення дає змогу отримувати ембріони, стерильних за власною лінею ПСК у межах 39,5%; 46,8%; 47,1%; 58,4% для лівої гонади та 39,4%; 43%; 45,6%; 55,8% для правої гонади при експозиціях 15; 30; 45; 60сек. Виводимість курчат при цьому була на рівні 78,8; 62,7; 45,1; 35,3%%, відповідно. При рентгенівському опромінюванні дозою у 200; 400; та 600 рад, отримані ембріони, послаблені по лінії ПСК до 26,9%; 48,8; 61,1% для лівої гонади, та 33,6%; 51,3; 65% для правої гонади. Виводимість курчат при цьому складає 86,2; 53,3; 16,8%%, відповідно.

Висновок

Проведений аналіз методик часткової стерилізації ранніх ембріонів показав неможливість застосування фізичного руйнування центральної ділянки бластодерми та опромінення ультрафіолетом для обробки майбутніх реципієнтів ПСК. Не виключається потенційна можливість заселення гонад клітинами донора після трансплантації клітин у гонади, стерилізовані до 58% після обробки ультрафіолетовим опроміненням. Прийом ультразвукової обробки ранніх ембріонів дозволяє ефективно обробляти напівінтактний ембріон (через підшкаралупну мембрану) і отримувати 46-47% стерильності по лінії ПСК з виводимістю 62,7-45,1% при експозиціях 30 та 45 секунд. Обробляючи інтактні яйця рентгенівським опроміненням, можливо отримати стерильні ембріони на рівні 49% при зниженні виводимості до 53,3%

Література:

1. Краснощѣк Б.Н. Тагиров М.Т. Влияние ультразвука на частичную стерилизацию гонад эмбрионов кур // Вісник ДААУ (спец. випуск).- жовтень 2000.-с.161-162.
2. Bresler M., Behnam J., Luke G. and Simkiss K. Manipulations of germ cell populations in the gonad of the fowl // British Poultry Sci.- 1994.- v.35.-p.241-247.
3. Carsience R.S., Clark M.E., Verrinder Gibbins A.M. and Etches R.J. Germline chimeric chickens from dispersed donor blastodermal cells and compromised recipient embryos // Development.-1993.- v.117.- p.669-675.
4. Eyal-Giladi H. and S. Kochav. From cleavage to primitive streak formation: a complementary normal table and new look at the first stage of the development of the chick. I. General morphology // Dev. Biol.- 1976.- v.49.- p.321-337.
5. Hamburger V. and Hamilton H. A series of normal stages in the development of the chick embryo. // J.Morphol.-1951.- v.88.-p.49-92.
6. McCarrey J. and U.K. Abbot. Chick gonad differentiation following excision of primordial germ cells // Dev. Biol.- 1978.-v. 66.-p.256-265.
7. Mims M.F. and R.G. McKinnel. Lazer irradiation of chick embryo germinal crescent //J.Embryol. Exp. Morphol.- 1971.- v.26.-p.31-36.
8. Reynaud G. Etude de la localisation des cellules germinales primordiales chez de l'embryon de caille japonaise au moyen d'une technique d'irradiation aux rayons ultraviolets // C.R. Acad. Sci. Paris.-v.-282.-1976.-p.1195.
9. Thoraval P., Lasserre F., Coudert Fand Dambrine F. Production of germline chimeric obtained from Brown and White Leghorns by transfer of early blastodermal cells // Poult. Sci.-1994.- v.73.- p.1897-1905.
10. Watt J.M., Petite J.N. and Etches R.J. Early development of the chick embryo // J.Morphol.- v.214.-1993.-p1-18.
11. Wentworth B.C., H. Tsai et. al. Manipulation of avian primordial cells and gonadae differentiation // Poul.Sci.- 1989.-v.68.-p.999-1010.