



УКРАЇНА

(19) UA (11) 30271 (13) U
(51) МПК
A61D 19/04 (2006.01)МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту(54) СПОСІБ ВИВІЛЬНЕННЯ КЛІТИННОЇ МАСИ ЯЙЦЕКЛІТИН І ЕМБРІОНІВ ССАВЦІВ ІЗ ПРОЗОРОЇ
ОБОЛОНКИ

1

(21) u200708959

(22) 03.08.2007

(24) 25.02.2008

(72) ЛІСІН ВАДИМ ІВАНОВИЧ, UA

(73) ІНСТИТУТ ТВАРИННИЦТВА УКРАЇНСЬКОЇ
АКАДЕМІЇ АГРАРНИХ НАУК, UA

(56)

(57) Спосіб вивільнення клітинної маси яйцеклітин і ембріонів ссавців із прозорої оболонки, що включає фіксацію об'єкта за прозору оболонку мікроприсосом і розрізування його прозорої оболонки по півколу мікроголкою, який відрізняється тим, що об'єкт з розрізаною прозорою оболонкою знову фіксують мікроприсосом за прозору оболонку поблизу розрізу так, щоб розріз був у верхньому або у верхньому боковому положенні відносно центральної осі мікроприсоса, вводять через розріз всередину прозорої оболонки мікроголку,

2

підтискують нею клітинну масу убік і прокалюють прозору оболонку в місці фіксації, вводячи кінчик мікроголки в порожнину мікроприсоса, потім відводять мікроприсос назад від об'єкта до повного звільнення кінчика мікроголки з її порожнини, притискають мікроголку до предметного скла і одержують другий розріз прозорої оболонки, що з'єднується з першим, після цього об'єкт орієнтують так, щоб він лежав на предметному склі розрізом прозорої оболонки вгору і паралельно подовжній осі мікроголки, потім опускають мікроголку на об'єкт і вводять її всередину прозорої оболонки між окрайками розрізу в обхід клітинної маси, притискаючи мікроголку до предметного скла, одержують третій розріз прозорої оболонки, який остаточно розділяє прозору оболонку на дві окремі частини і вивільняють із неї клітинну масу.

Корисна модель належить до репродуктивної біотехнології, зокрема до мікрохірургії яйцеклітин і ембріонів ссавців, і може бути використана в експериментальній ембріології та ембріональних технологіях.

Відомий спосіб вивільнення клітинної маси яйцеклітин і ембріонів із прозорої оболонки (Биология развития млекопитающих. Методы: Пер. с англ. /Под ред. М. Манк. - Москва: Мир, 1990. - С.40-43), який передбачає хімічну (у т.ч. і ферментативну) обробку об'єкта, що дозволяє стоншити його прозору оболонку, в поєднанні з піпетуванням об'єкта пастерівською піпеткою для остаточного механічного руйнування прозорої оболонки, що вже потоншала, і вивільнення з неї клітинної маси.

Однак цей спосіб видалення прозорої оболонки у яйцеклітини чи ембріона чинить хімічну дію і на клітинну масу об'єкта, що негативно впливає на її життєздатність.

Відомий також спосіб механічного вивільнення клітинної маси яйцеклітин і ембріонів із прозорої оболонки за допомогою мікроманіпуляційного

устаткування і мікроінструментів, який прийнятий як прототип (Пат. 17876А України, МКИ6 А61D 19/04. Спосіб отримання химерних ембріонів /Безуглий М.Д., Гордієнко І.О., Лісін В.І. (Україна).- №96083085; За-явл. 01.08.1996; Опубл. 31.10.1997; Бюл. №5. - 4с.). Цей спосіб включає фіксацію об'єкта за прозору оболонку мікроприсосом і розрізування його прозорої оболонки по півколу колюче-різальним інструментом (мікроскальпелем, мікроножем або мікроголкою) (див. фіг. 1(І) 1-4). Після чого через одержаний розріз із прозорої оболонки вилучають клітинну масу об'єкта ін'єкційною мікропіпеткою. Причому, всі мікроманіпуляції по вивільненню клітинної маси об'єкта із прозорої оболонки цим способом виконують в гіпертонічному (1500мОсм) середовищі, що дозволяє внаслідок часткового виходу з клітин води зменшити об'єм клітинної маси об'єкта і збільшити розмір вільного простору усередині його прозорої оболонки, а за рахунок цього зменшити ступінь деформування клітинної маси і ризик її механічного пошкодження під час маніпуляцій.

(13) U

(11) 30271

(19) UA

Однак і при такому способі вивільнення із прозорої оболонки все ж таки має місце деформування клітинної маси яйцеклітини або ембріона, ступінь якого хоча і зменшується за рахунок використання гіпертонії, проте все ж таки обумовлює ризик механічного пошкодження клітин. Також при вивільненні клітинної маси об'єкта із прозорої оболонки цим способом після розрізування прозорої оболонки необхідно робити заміну мікроголки на ін'єкційну мікропіпетку, що приводить до збільшення трудомісткості і загальної тривалості даної операції. А якщо після вилучення із прозорої оболонки ставиться задача розділення клітинної маси ембріона на частини, то виникає необхідність заміни ін'єкційної мікропіпетки на мікроголку, що також збільшує витрати праці і часу на проведення маніпуляцій.

В основу корисної моделі поставлено завдання удосконалити спосіб вивільнення клітинної маси яйцеклітин і ембріонів із прозорої оболонки шляхом зміни техніки проведення мікроманіпуляцій з об'єктом так, щоб забезпечити зменшення ступеня деформування його клітинної маси і можливість виконання даної операції за допомогою тільки двох інструментів - мікроприсоса і мікроголки - без використання третього інструменту - ін'єкційної мікропіпетки, що приведе до зменшення ризику механічного пошкодження клітинної маси об'єкта і дозволить уникнути витрат праці і часу на заміну інструментів.

Поставлене завдання вирішується тим, що в спосіб вивільнення клітинної маси яйцеклітин і ембріонів із прозорої оболонки, що включає фіксацію об'єкта за прозору оболонку мікроприсосом і розрізування його прозорої оболонки по півколу мікроголкою (фіг. (I) 1-7), згідно корисної моделі, об'єкт з розрізаною прозорою оболонкою знову фіксують мікроприсосом за прозору оболонку поблизу розрізу так, щоб розріз був у верхньому або у верхньому-боковому положенні щодо центральної вісі мікроприсоса (фіг. (II) 1), вводять через розріз всередину прозорої оболонки мікроголку, підтискують нею клітинну масу убік і прокалюють прозору оболонку в місці фіксації, вводячи кінчик мікроголки в порожнину мікроприсоски (фіг. (II) 2-3), потім відводять мікроприсоску назад від об'єкта до повного звільнення кінчика мікроголки з її порожнини (фіг. (II) 4), притискають мікроголку до предметного скла (фіг. (II) 5-6) і одержують другий розріз прозорої оболонки, що з'єднується з першим (фіг. (II) 7), після цього об'єкт орієнтують так, щоб він лежав на предметному склі розрізом прозорої оболонки вгору і паралельно подовжній вісі мікроголки (фіг. (III) 1), потім опускають мікроголку на об'єкт і вводять її всередину прозорої оболонки між крайками розрізу в обхід клітинної маси (фіг. (III) 2), притискаючи мікроголку до предметного скла (фіг. (III) 3), одержують третій розріз прозорої оболонки, який остаточно розділяє прозору оболонку на дві окремі частини (фіг. (III) 4), і вивільняють із неї клітинну масу (фіг. (IV) 1-4).

Послідовне виконання кожного з трьох розрізів прозорої оболонки яйцеклітини або ембріона мікроголкою: перших двох - шляхом прокалювання

прозорої оболонки наскрізь в обхід клітинної маси і притиснення пронизаної мікроголкою прозорої оболонки до предметного скла до отримання розрізу (див. фіг. (I і II)), а третього - шляхом введення мікроголки всередину прозорої оболонки зверху між крайками розрізу також в обхід клітинної маси і притиснення прозорої оболонки до предметного скла до остаточного розділення її на дві частини (див. фіг. (III)) дозволяє звести до мінімуму деформування клітинної маси об'єкта під час маніпуляцій по її вивільненню із прозорої оболонки, зменшити за рахунок цього ризик механічного пошкодження клітин і таким чином підвищити збереженість клітинної маси при виконанні цієї операції.

Крім того, виконання мікроголкою двох послідовних розрізів вже розрізаної по півколу прозорої оболонки так, щоб кожний з цих розрізів продовжував і подовжував попередній, дозволяє повністю розділити прозору оболонку на дві частини і вивільнити із неї клітинну масу за допомогою тільки двох інструментів - мікроприсоса і мікроголки - без використання третього інструменту - ін'єкційної мікропіпетки (Див.фіг.). Це дозволяє уникнути процедури заміни мікроголки на ін'єкційну мікропіпетку після виконання першого розрізу прозорої оболонки для вилучення через нього клітинної маси назовні. А в тих випадках, коли після вилучення із прозорої оболонки ставиться задача розділення клітинної маси ембріона на частини, це дозволяє уникнути вже другої заміни мікроінструментів - ін'єкційної мікропіпетки на мікроголку. Таким чином досягається скорочення витрат праці і часу на виконання проміжних процедур по заміні інструментів, що робить модифіковану техніку проведення мікроманіпуляцій по вивільненню клітинної маси об'єкта із прозорої оболонки технологічно більш зручною для використання в різних мікрохірургічних методах.

Пропонований спосіб здійснюється таким чином. Яйцеклітину чи ембріон для проведення операції по звільненню клітинної маси із прозорої оболонки поміщують в чашку Петрі або на предметне скло із крапллю ізотонічного ((295±5)мОсм) або гіпертонічного (доповненого NaCl до осмолярності (1420±80)мОсм) середовища Дюльбекко з 20% фетальної сироватки крові теляти. Для отримання першого розрізу прозорої оболонки (див. фіг. (I)) об'єкт фіксують за прозору оболонку мікроприсосом (1), вводять всередину прозорої оболонки мікроголку (2) і, підтискуючи клітинну масу убік, прокалюють прозору оболонку далі наскрізь, вводячи кінчик мікроголки в порожнину мікроприсоса, обминувши саму клітинну масу (3-4). Потім скидають негативний тиск в мікроприсосці і відводять її назад до повного звільнення кінчика мікроголки з її порожнини (5). Притискають пронизану мікроголкою прозору оболонку до поверхні предметного скла (6) і розрізають її по півколу (7).

Для отримання другого розрізу прозорої оболонки, що продовжує перший (див. фіг. 2 (II)) об'єкт знову фіксують за прозору оболонку поблизу від краю розрізу так, щоб розріз був у

верхньому або у верхньому-боковому положенні щодо центральної осі мікроприсоска (1). Вводять мікроголку всередину прозорої оболонки через перший розріз і, підтискаючи клітинну масу, що знаходиться усередині прозорої оболонки, убік (2), проколюють прозору оболонку в місці фіксації, вводячи кінчик мікроголки в порожнину мікроприсоса (3). Скидають негативний тиск в мікроприсосі і відводять її назад від об'єкта до повного звільнення кінчика мікроголки з її порожнини (4). Притискають мікроголку до поверхні предметного скла (5-6) і одержують другий розріз прозорої оболонки, що з'єднується з першим (7). В результаті прозора оболонка майже перерізана на дві частини, які лишаються з'єднаними лише вузькою ділянкою.

Для отримання третього розрізу, який остаточно розділяє прозору оболонку на дві частини (див. фіг. (III)) об'єкт вже не фіксують мікроприсосом, а орієнтують на предметному склі так, щоб він лежав розрізом прозорої оболонки вгору і паралельно подовжній вісі мікроголки (1), потім повільно опускають мікроголку на об'єкт і вводять її всередину прозорої оболонки між крайками розрізу, обережно обходячи клітинну масу (2), притискають мікроголку до предметного скла (3) і розрізають прозору оболонку на дві частини (4). Під час цих маніпуляцій клітинна маса може повністю вийти із прозорої оболонки і вже не контактувати з нею. Тоді на цьому етапі операцію завершують.

Якщо після повного розрізання прозорої оболонки на дві частини клітинна маса лишається в одній із половинок прозорої оболонки, то її для повного вивільнення вилучають звідти (див. фіг. (IV)). Для цього натискають мікроголкою на крайок горизонтально лежачої половинки прозорої оболонки з клітинною масою і переводять її у вертикальне положення (1). Підводять до половинки прозорої оболонки мікроприсос і фіксують ним половинку з випуклої сторони (2). Боковим рухом кінчика мікроголки вилучають клітинну масу із вертикально утримуваної половинки (3-4). Після цього операція по вивільненню клітинної маси об'єкта із прозорої оболонки є повністю завершеною.

Таким чином, пропонований спосіб дозволяє за рахунок виконання кожного з трьох розрізів прозорої оболонки яйцеклітини чи ембріона мікроголкою в обхід клітинної маси так, щоб кожен подальший розріз продовжував і продовжував попередній підвищити збереженість клітинної маси об'єкта при її вивільненні із прозорої оболонки, уникнути витрат часу і праці на проміжні процедури по заміні мікроінструментів і зробити цю операцію технологічно більш зручною для використання в різних мікрохірургічних методах.

Можливість здійснення пропонованого способу вивільнення клітинної маси яйцеклітин і ембріонів із прозорої оболонки підтверджена прикладом і відеозаписом проведення операції, по якому зроблена докладна ілюстрація техніки її виконання (див. фіг.).

Приклад. Модифікована техніка проведення мікроманіпуляцій по вивільненню клітинної маси із

прозорої оболонки відпрацьована і випробувана на 99 яйцеклітинах і ембріонах миші і 20 ембріонах великої рогатої худоби різних стадій розвитку і різної якості. Встановлено, що дана техніка прийнятна для роботи з яйцеклітинами і ембріонами всіх стадій розвитку від ооцита другого порядку до повністю розширеної бластоцисти як в ізотонічних, так і в гіпертонічних умовах. Проте слід зазначити, що мікроманіпуляції по вивільненню клітинної маси із прозорої оболонки, набагато зручніше проводити в гіпертонії.

За результатами хронометрії середня тривалість операції по вивільненню із прозорої оболонки клітинної маси одного об'єкта пропонованим способом в ізотонії складала близько 11 хвилин. При цьому у 7 ембріонів (20%) із 35, використаних для цього яйцеклітин і ембріонів миші, було відмічено пошкодження та/або відторгнення окремих клітин, а клітинна маса 3 об'єктів (8,6%) була зруйнована повністю. Середня тривалість цієї ж операції з одним об'єктом в гіпертонічному середовищі складала близько 7,5 хвилин. Із 64 прооперованих в гіпертонії яйцеклітин і ембріонів миші 6 об'єктів (9,4%) одержали часткові пошкодження клітинної маси і 3 об'єкти (4,6%) були пошкоджені глобально.

Вивільнення із прозорої оболонки клітинної маси одного об'єкта традиційним способом в ізотонії складало в середньому близько 15 хвилин. При цьому у 3 (30%) із 10, використаних для цього ембріонів великої рогатої худоби, було відмічено пошкодження та/або відторгнення окремих клітин, а клітинну масу 3 об'єктів (30%) було пошкоджено глобально. Середня тривалість цієї ж операції з одним об'єктом в гіпертонії складала близько 10 хвилин. Із 10 прооперованих в гіпертонії ембріонів великої рогатої худоби 2 об'єкти (20%) одержали часткові пошкодження клітинної маси і 1 об'єкт (10%) було пошкоджено глобально.

Приведені експериментальні дані показують, що удосконалена техніка проведення мікроманіпуляцій дозволяє підвищити збереженість клітинної маси яйцеклітин і ембріонів при вивільненні із прозорої оболонки і скоротити витрати часу і праці на виконання цієї операції.

Пропонований спосіб вивільнення клітинної маси із прозорої оболонки успішно застосовується в лабораторії клітинної і молекулярної біології ІТ УААН в експериментах по отриманню агрегаційних химерних ембріонів і частин ембріонів (половинок і четвертинок), а також в дослідях по вивченню осмотичної поведінки яйцеклітин і ембріонів деяких видів ссавців.

