УДК 616.831:612.014:616-018.82:612.017.1

ВИКОРИСТАННЯ ФІДЕРНИХ КЛІТИН ДЛЯ ДОВГОСТРОКОВОГО ЗБЕРЕЖЕННЯ ЕМБРІОНІВ БЕЗ ЗНИЖЕННЯ ЇХ ЖИТТЄЗДАТНОСТІ

А .В. Мадіч [1], С. В. Федорова[2]

Університет м. Дарем, Великобританія[1]
Інститут біології тварин УААН, Львів, Україна[2]

У статті описано раніше невідомий феномен виживання ембріонів in vitro впродовж тривалого періоду часу без зниження їх життєздатності. Через 6 діб культивування поза організмом на підтримуючому фідерному моношарі бластоцисти мишей зберігали свою життєздатність з відмінною морфологічною якістю і були здатні для використання в подальших дослідженнях, що свідчить про високу регуляторну здатність епітеліальних клітин маткового походження в системі in vitro. Через 9 днів культивування клітини епітелію продовжували утворювати фідерний моношар з високим проліферативним ростом.

Ключові слова*:* ДОІМПЛАНТАЦІЙНІ ЕМБРІОНИ, ФІДЕРНИЙ МОНОШАР ЕПІТЕЛІАЛЬНИХ КЛІТИН РЕПРОДУКТИВНИХ ОРГАНІВ, КУЛЬТИВУВАННЯ IN VITRO.

Застосування методів репродуктивної біотехнології у фундаментальних і прикладних дослідженнях пов’язано з пошуком нових та вдосконаленням існуючих методик, які об’єднані в окрему групу, яка одержала назву допоміжних репродуктивних технологій. Створення клітинних фідерних культур — одна з цих допоміжних технологій, яка використовується в різних напрямках репродуктивної біотехнології, зокрема одержання ембріонів in vitro, дослідження методів сигнальної трансдукції між організмом матері і доімплантаційним ембріоном.

Більшість методів молекулярної, клітинної і репродуктивної біотехнології передбачають збереження ембріонів короткий час в синтетичних середовищах перед трансплантацією в репродуктивні органи матері [7]. Окремі середовища для культивування ембріонів долають цю проблему, але всі вони потребують додавання сироватки [1–3]. Сироватка містить біологічно активні речовини, а саме: гормони і ростові фактори, які забезпечують ембріональний ріст, але створюють умови, непередбачені для подальшого розвитку [5]. Відомо, що сироватка зменшує потенціал ранніх ембріонів до розвитку [1], викликає порушення метаболізму і мікроструктури зародка [8, 9], що знижує їх життєздатність і проявляється у зниженні рівня імплантації [6]. Середовище, яке створює фідерний моношар, одержаний з епітеліального покриття репродуктивних органів самки, максимально відтворює природне середовище, в якому розвиваються зародки [4]. Результати культивування ембріонів різних тварин in vitro показали, що жодне синтетичне середовище не може повністю замінити маткове клітинне середовище.

Метою нашої роботи було обгрунтувати можливість використання моношару епітеліальних клітин матки для довготривалого збереження ембріонів мишей у безсироватковому середовищі без зниження їх життєздатності.

Матеріали і методи

У дослідженнях використані самки білих кросбредних мишей лінії CD-1, у яких у віці 5 тижнів викликали суперовуляцію і стимуляцію еструсу. Для цього їм інтраперитоніально вводили 5 ІО гонадотропіну сироватки жеребних кобил, а через 48 годин — 5 ІО хоріонічного гонадотропіну людини. Ввечері того ж дня їх пересаджували у клітку до самця ідентичного генотипу. На ранок перевіряли наявність у них копулятивних (вагінальних) корків. Через 3,5 дні проводили забій мишей розривом довгастого та спинного мозку шляхом зміщення шийних хребців.

Зовнішній вид рогів матки і яєчників дозволяв попередньо передбачити результати вимивання: червона сітка дрібних капілярів і збільшення рогів в об'ємі — ознака присутності ембріонів. Звільнені від внутрішнього жиру яєчники, яйцепроводи і матку розташовували на зволоженій середовищем М2 поверхні чашки Петрі. Для збирання вимивного середовища та ефективного пошуку ембріонів використовували малу чашку Петрі.

Для введення вимивної рідини використовували ін'єкційний інсуліновий шприц на 1 мл з тонкою голкою, яку вводили у порожнину рога, перевіряючи її положення під мікроскопом при малому збільшенні. Під контролем бінокулярної лупу Nikon при збільшенні 2х10 спостерігали проходження рідини і вимивання ембріонів з верхівки рога. Ембріони вимивалися разом з першими порціями середовища. Для вимивання ембріонів використання 0,2 мл середовища М2. Переносили ріг матки у другу лунку предметного скла або в іншу чашку і знову проводили промивання маткових рогів новою порцією середовища. Для цього кожний раз використовували іншу чашку Петрі. Для остаточного контролю втретє промивали ріг матки свіжою порцією, середовища, витискаючи його залишки з маткового рога гострим пінцетом. Процедуру повторювали з іншим рогом матки. Після виявлення ембріонів їх переносили в краплю чистого середовища М16 для морфологічної оцінки. Краплі вимивного середовища розташовували в CO_2-інкубаторі. Одержані ембріони розподіляли на 2 групи. Ембріони дослідної групи культивували на фідерному моношарі без зміни середовища, ембріони контрольної групи — без фідерного моношару. Оцінювали ембріони за морфологією. Результати фіксували фотокамерою.

Результати й обговорення

Гормональна обробка самок мишей лінії CD-1 показала нестабільність їх реакції. Зокрема, серед шести донорів ембріони вимили з чотирьох (табл. 1). Всього було одержано 96 ембріонів різної морфологічної якості і стадій розвитку, в середньому 16 ембріонів на 1 самку. Проведені дослідження показали, що обробку мишей ГСЖК найкраще починати у вівторок о 14.00. Через 48 годин, у четвер о 14.00 слід проводити обробку мишей ХГл і під кінець робочого дня підсаджувати самок до самців. На ранок наступного дня у п'ятницю, в 8.00, необхідно перевіряти наявність копулятивних корків. Якщо був вагінальний корок, донора скеровували на евтаназію через 2,5 дні (ранок наступного понеділка) для одержання 4–8 бластомерних морул, або через 3,5 дні (ранок вівторка) для вимивання експандованих бластоцист. Слід зазначити, що 3,5 день, фактично є четвертим днем після запліднення, тому друга половина четвертого дня є критичною, оскільки в цей термін відбувається вихід бластоцист з прозорої оболонки (вилуплення), після якого будь-які маніпуляції з ембріонами неможливі.

У вимивній рідині виявлені морули і бластоцисти. Морули різної морфологічної якості (рис. 1), а серед бластоцист всі ембріони були відмінної морфологічної якості і однорідної стадії розвитку (рис. 2). Очевидно, що ембріони, які відзначаються інтенсивним поділом, є морфологічно і генетично якісними та досягають стадії бластоцист, а ембріони, які відстають в розвитку є неповноцінними, нежиттєздатними і в кінцевому стані проявляють ознаки дегенерації. Внаслідок цього на пізніх доімплантаційних стадіях розвитку серед популяції вимитих з матки бластоцист практично неможливо знайти ембріони з ознаками будь-якого відхилення у морфології.

Таблиця 1

Результати гормональної обробки і вимивання самок мишей-донорів ембріонів

n/n	Характеристика тварин, день вимивання ембріонів*	Кількість тварин	Результати вимивання, ембріони	Стадія ембріонального розвитку
1	Самки CD-1 (2,5-й день)	2	38 і 22, всього 60	Ранні ембріони і морули, з них: двобластомерних — 1, шести-восьмибластомерні морули (Мо I) — 58
2	Самки CD-1 (3,5-й день)	2	0	Ооцити з лійки яйцепровода
3	Самки CD-1 (3,5-й день)	2	6 і 30,	Від 1-ї самки Бл II —2,

			всього 36	пусті зони пелюцида (ZP) — 3, ооцит — 1; Від 2-ї самки Мо II — 2, Бл II — 28

Примітка: *— день вимивання ембріонів відповідає їх віку.

Після виявлення ембріонів проводили оцінку вимивної рідини та наявність в ній клітин епітелію. Перша порція середовища, яку одержали разом з ембріонами, була чиста і прозора, друга містила однорідну суспензію епітеліальних клітин, і третя, остання, характеризувалася значною кількістю лушпиння, яке було кластерами слизової оболонки маткових рогів.

Таблиця 2

Результати культивування ембріонів без зміни середовища впродовж 6-ти днів

n/n	Групи ембріонів	Характеристика середовища культивування	Кількість ембріонів у групі	Характеристика ембріонів після 6-ти діб культивування
1	Дослідна	На фідерному моношарі у М16	15	13 Бл II морфологічно якісних, 2 Бл II реекспандовані
2	Контрольна	М16	15	Всі дегенеровані

Чашки з середовищем були марковані згідно з етапами їх одержання і інкубувалися до тих пір, поки проводилася морфологічна оцінка і фотографування ембріонів. За цей час, близько години, частина соматичних клітин або їх кластерів у всіх порціях середовища частково осіла на дно або знаходилася у вигляді суспензії. Візуально виглядало, що середня порція була найбільш однорідна і без кластерів та лушпиння. На неї, як на своєрідний матрац, були посаджені 15 ембріонів на стадії бластоцисти. Ембріони культивували у середовищі М16 під мінеральною олією без додавання сироватки в загальному об’ємі краплі 200 мл. Вони склали дослідну групу. Контрольну групу бластоцист розмістили у середовищі М16 також без додавання сироватки і підтримуючого фідерного шару. Ембріони дослідної і контрольної груп культивували без зміни середовища в CO_2-інкубаторі впродовж 6-и днів.

Дослідження проліферативного росту клітин яйцепровідного епітелію, отриманого при промиванні репродуктивних органів самок, через шість діб виявило, що перша і остання порції середовища містили значну кількість мертвих клітин, які внаслідок клітинної адгезії утворили агрегати і плавали в товщі рідини. Тільки у середній порції вимивного середовища спостерігали відмінної якості шар живої монокультури з чітко контурованими клітинами, які сформували своєрідний матрац (рис. 1), який повністю вкривав бластоцисти, оскільки моношар не є об’ємною культурою (рис. 2).

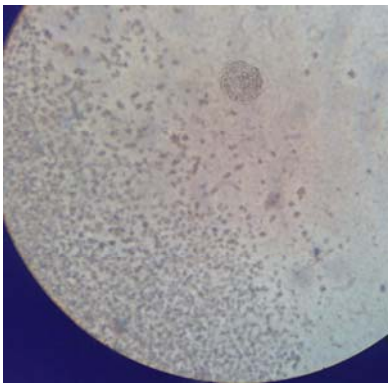

Рис. 1. Фідерний моношар і бластоцисти 3,5-денного віку після 6 днів культивування.

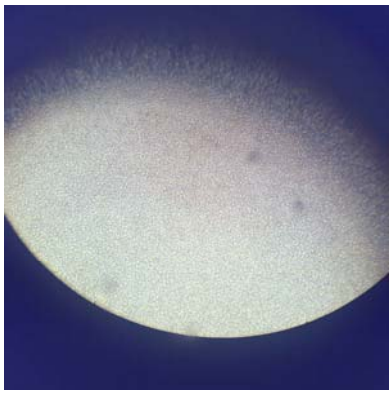

Рис. 2. Бластоцисти в товщі фідерного моношару.

Після відмивання від клітин епітелію проводили оцінку бластоцист. Встановлено, що бластоцисти дослідної групи виявилися відмінної морфології, з яскравою бластопорожниною, чіткою диференціацією на ембріо- і трофобласт, грануляцією бластомерів (рис. 3). Тільки два ембріони дослідної групи не виявляли ознак експандованих бластоцист. Їх клітинна маса була компактизована і, очевидно, що їх розвиток припинився.

Всі ембріони контрольної групи були мертві:мали ознаки повного некрозу, деякі вийшли з прозорих оболонок, інші — дегенерували.

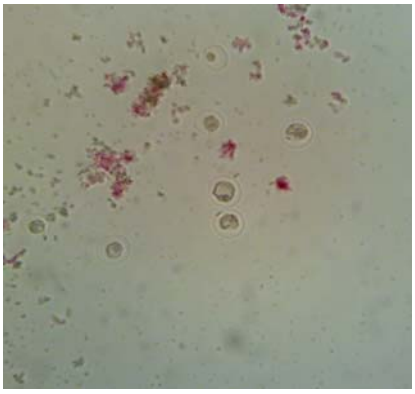

Рис. 3. Популяція мишачих бластоцист дослідної групи з візуальним розділенням на ембріобласт і трофобласт, які культивувались 6 днів на фідерному моношарі

Рис. 4. Щільний моношар фідерних клітин епітелію матки миші після 72-х год культивування

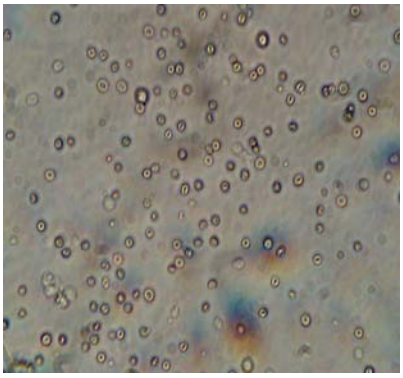

Рис. 5. Первинна культура епітеліальних клітин репродуктивних органів миші (поодинокі клітини)

Культуру клітин фідерного шару відмивали фосфатно-сольовим буфером без порушення його цілісності шляхом нашаровування середовища зверху і поміщали в CO_2 інкубатор для подальшого культивування впродовж 72 годин для виявлення здатності епітеліальних клітин до проліферативного росту. Аналіз культури клітин через 72 години виявив їх значний проліферативний ріст з утворенням однорідного моношару. Клітини, які були оцінені як найкращі за попередньою оцінкою, і надалі показували значний проліферативний ріст. Фідерні клітини в інших зразках росли повільніше, оскільки їх посівна концентрація була менша (рис. 4).

Нами виявлено невідомий раніше феномен виживання ембріонів in vitro впродовж тривалого періоду часу без зниження їх життєздатності. За літературними даними ембріони мишей здатні зберігати свою життєздатність без зниження потенції до подальшого розвитку поза організмом 4 і 5 діб у спеціальному середовищі в присутності 10 % фетальної сироватки. У наших дослідженнях через 6 діб культивування поза організмом на підтримуючому фідерному моношарі без додавання сироватки бластоцисти мишей дослідної групи зберігали свою життєздатність з відмінною морфологічною якістю і були здатні для використання в подальших дослідженнях, що свідчить про високу живильну і регуляторну здатність епітеліальних клітин маткового походження в системі мати—плід in vitro.

Цінним є також те, що бластоцисти зберігали свою морфологію і не перейшли до наступної стадії розвитку — бластули, яка відбувається в присутності сироватки — джерела ростових факторів. Культивування на фідерного моношарі дозволила їм лишатися життєздатними, але інтенсивність процесів клітинних поділів була уповільненою, що свідчить про необхідність проведення подальших досліджень у цьому напрямку.

Висновки

1. Використання фідерних моношарів з епітеліальних клітин репродуктивних органів самок доцільно застосовувати для підтримки ембріональної життєздатності in vitro. Вони дозволять забезпечити збереження відмінної морфологічної якості і життєздатності ембріонів впродовж 6 днів культивуваня.

2. Первину культуру епітеліальних клітин матки миши можна одержати промиванням репродуктивних органів самок мишей під час одержання ембріонів. Культивування клітин епітелію матки впродовж тривалого періоду часу без зміни середовища дозволяє одержати щільний моношар клітин, який має значний проліферативний ріст і функціональність щодо стимуляції раннього ембріонального розвитку in vitro.

A. V. Madich[1], S. V. Fyodorova[2]

LONG-TIME MAINTENANCE OF EMBRYOS WITHOUT DECREASING THEIR VIABILITY

S u m m a r y

The earlier unknown phenomenon of embryo viability in vitro during long-time cultivation without decreasing their ability was described in article. The mice blastocysts screen own viability after 6 days cultivation on feeder monolayer. They had good morphological characteristics and were used in other experiments. This shown, that epithelial cells of uterus have a high regulatory function in vitro.

The epithelial cells continued the creating of feeder monolayer with high proliferative growth after 9 days of cultivation.

[1] Durham University, Biological and Biomedical Sciences Department
[2] The Institute of Animal Biology of the Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, Lviv

1. Bavister B. D. Interaction between embryos and the culture milieu // Theriogenology. — 2000. — V. 53. — P. 619-626.

2. Bendells J., Jobb D. K., Chuma A. Bovine theca cells secrete factor(s) that promote granulose cell proliferation // Biology of reproduction. —1988. — № 38.— P. 790-794.

3. Buyalos R. P., Cai X. Preimplantation embryo development enhanced by epidermal growth factor // Journal of Assisted Reproduction and Genetic. — 1994. — V. 11.— № 1.— P. 33-37.

4. Carlos G. Gutierrez, John H. Ralph, Evelyn E. Telfer. Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture in vitro // Biology of Reproduction. — 2000. — V. 62. — P. 1322-1328.

5. Demeestere I., Delbaere A., Gervy C. Effect of preantral follicle isolation technique on in-vitro follicular growth, oocyte maturation and embryo development in mice // Human Reproduction. — 2002. —V. 17. —№ 8. — P. 2152 – 2159.

6. Paloma Duque, Enrique Gómez, Elena Díaz. Use of two replacements of serum during bovine embryo culture in vitro // Theriogenology. — V. 59.—№ 3-4.— P. 889-899.

7. Sirisathein S., Hernandes-Fonseca H. J. Influences of epidermal growth factor and insulin growth factor-I on bovine blastocyst development in vitro // Animal Reproduction Science. — 2003. — V. 77. —№ 1-2. — P. 21-32.

8. Smith F. T., McCauley C., Cantley T. C. Effects of culture medium, serum type, and various concentrations of follicle-stimulating hormone on porcine preantral follicular development and antrum formation in vitro // Biology of Reproduction. — 2002. — V. 67. — № 4. —P. 1197 - 1203.

9. Wandij S. A., Eppig J. J. FSH and growth factors affect the growth and endocrine function in vitro of granulosa cells of bovine prenatal follicles // Theriogenology. — 1996. — V. 45. —№ 4. — P. 817-832.