

ОТРИМАННЯ РАННІХ ЕМБРІОНІВ ЛАБОРАТОРНИХ ТВАРИН ТА ЇХ ВИКОРИСТАННЯ У ЕМБРІОТЕХНОЛОГІЯХ

С. В. Федорова¹, І. І. Гевкан¹, О. В. Штапенко¹, Ю. І. Сливчук¹, А. І. Дедова¹, А. В. Мадіч²

¹Інститут біології тварин УААН, Україна

²Університет м. Дарем, Великобританія

Отримання достатньої кількості якісних раних доімплантаційних ембріонів — одне з перших завдань у дослідженнях з ембріональної біотехнології та клітинної інженерії. Існують різноманітні методики, якими користуються фахівці у даній галузі [1]. У нашому дослідженні ми узагальнили і опрацювали методику, яка дозволяє отримати велику кількість якісних доімплантаційних ембріонів у двох видів лабораторних тварин — мишей та щурів.

Мишки традиційно використовуються у різноманітних біотехнологіях, даних же про використання у цій галузі щурів у літературі дуже мало. Саме тому метою нашої роботи було вивчення можливості отримання раних ембріонів обох видів тварин — мишей і щурів.

Методи і матеріали. В експериментах використовували білі мишки лінії CD-1 та білі щурі лінії Вістар. Всі тварини були гормонально оброблені різними препаратами для викликання суперовуляції і стимуляції еструсу: мишки — у віці 5, щурі — 8 тижнів [2, 3]. У мишок через 2,5/3,5 доби після запліднення проводили евтаназію розтягуванням шийних хребців. Щурів забивали після передозування ефірного наркозу шляхом декапітації на 5/6 добу після запліднення. За узагальненою в нашій лабораторії методикою проводили трьохкратне вимивання кожного рогу малою (0,2 мл) кількістю середовища TCM-199. Для введення вимивної рідини використовували ін'єкційний інсуліновий шприц на 1 мл з тонкою голкою, після пошуку ембріонів їх переносили в краплю чистого середовища M16 для морфологічної оцінки. Краплі вимивного середовища розташовували в CO₂-інкубаторі. Гормональну обробку тварин проводили за зведеною схемою.

Мишки:

1. Середа, 14.00. Ін'єкція ГСЖК (5 ІО на одну самку).
2. П'ятниця, 12.00–14.00. Ін'єкція ХГл (5 ІО на одну самку).
3. П'ятниця, 16.00–17.00. Підсадка самців (1 самець на 3 самки). Самці залишаються із самкам на всю ніч.
4. Субота, 10.00–11.00. Перевірка наявності копулятивних корків. При наявності корків самиць відсаджують в окрему клітку.
5. Понеділок. Запліднені самиці продукували ембріони на стадії морули. Забій тварин.
6. Вівторок. Запліднені самиці продукували ембріони на стадії бластоцисти. Забій тварин

Щурі:

1. Вівторок, 14.00. Ін'єкція ПГ-600 (20 МО на одну самку).
2. Четвер, 12.00–14.00. Ін'єкція ХГл (20 МО на одну самку).
3. Четвер, 16.00–17.00. Підсадка самців (1 самець на 3 самки). Самці залишалися з самками цілу ніч.
4. П'ятниця, 10.00–11.00. Перевірка наявності у самиць копулятивних корків. При наявності копулятивних корків самиць відсаджували в окрему клітку.
5. Вівторок. Забій (стадія морули).
6. Середа. Проводили забій тварин (ембріони на стадії бластоцисти).

При гормональній обробці використовували препарати Фолімаг (Мосагrogen) і Прегніл (Словакофарм).

Результати та обговорення. У результаті гормональної обробки від 6 самок мишей загалом було отримано 96 ембріонів різних стадій розвитку, які використовували для подальших досліджень (табл. 1).

Таблиця 1

Результати гормональної обробки і вимивання самок мишок — донорів ембріонів

п/п	Характеристика тварин, день вимивання ембріонів*	Кількість тварин	Результати вимивання, ембріони	Стадія ембріонального розвитку отриманих ембріонів
1	Самки CD-1 (2,5-й день)	2	38 і 22, всього 60	Ранні ембріони і морули, з них: двобластомерних — 1, шести-восьмибластомерні (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, всього 36	Від 1-ї самки Бл II — 2, порожні зони пелюцида (ЗР) — 3, ооцит — 1; Від 2-ї самки Мо II — 2, Бл II — 28.

Щурів забивали на 5-й та 6-й день після запліднення. За аналогією ці дні мали відповідати стадії пізньої морули і бластоцисти. Всього в експериментах було використано 15 самок щурів лінії Вістар (табл. 2). На відміну від мишок, у щурів у більшості випадків була відсутня реакція поліовуляції. З 10 самок було отримано всього 29 ембріонів різних стадій розвитку, що узгоджується з літературними даними [4, 5].

Таблиця 2

Результати гормональної обробки і вимивання самок щурів — донорів ембріонів

п/п	Характеристика тварин, день вимивання ембріонів*	Кількість тварин	Результати вимивання, ембріони	Стадія ембріонального розвитку отриманих ембріонів
1	Самки щурів Вістар (5-й день)	5	всього 10	Ранні ембріони і морули, з них: двобластомерних — 1, шести-восьмибластомерні (Мо I) — 9
2	Самки щурів Вістар (6-й день)	5	всього 19	Пізні морули і бластоцисти: Мо II — 2, Бл II — 17.

ВИСНОВКИ

1. Відсутність у більшості випадків реакції поліовуляції самок лабораторних щурів на гормональну обробку робить дослідження з ембріональної біотехнології цього виду утрудненими.

2. Щурі, які широко використовуються в інших дослідженнях, як донори ембріонів маловідомі. Дані з видових характеристик доімплантаційного розвитку щурів практично відсутні, тому будь-які відомості вносять елементи новизни в розуміння основних біологічних законів формування сигнальних механізмів між маткою і плодом на самих ранніх стадіях.

OBTAINING EARLY EMBRYOS OF LABORATORY ANIMALS AND APPLYING THEM IN EMBRYOBIOTECHNOLOGY

S.V.Fyodorova, I.I.Hevkan, O.V.Shtapenko, Y.I.Slyvchuk, A.I.Diedova, A.V.Madich

SUMMARY

Obtaining enough high-quality early preimplantation embryos - one of the first tasks in embryobiotechnology and cellular engineering researches. There are various techniques used by experts in this area. In this research we summarized and processed a technique which allows to obtain a lot of high-quality preimplantation embryos of two laboratory animals kinds — mice and rats.

Mice are traditionally used in various biotechnologies, but the data about use of rats in this branch of science are very few in the literature. For this reason, the purpose of our work was to study the opportunities of obtaining early embryos of both kinds of animals.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. [Akira S](#), [Sanbuissho A](#), [Lin YC](#), [Araki T](#). Acceleration of embryo transport in superovulated adult rats // [Life Science](#) — 1993 — V.53, № 15 — P.1243–1251.
2. [Nagwa El-Nefaiwy](#), [Khaled Abdel-Hakim](#), [Naohiro Kanayama](#). The selective prostaglandin EP4 agonist, APS-999 Na, induced follicular growth and maturation in the rat ovary // [European Journal of Endocrinology](#). — Vol. 152. — № 2. — P. 315–323.
3. [W. A. van Cappellen](#), [P. Kramer](#), [E. C. M. van Leeuwen](#). Induction of superovulation in cyclic rats by administration of decreasing doses of recombinant follicle stimulating hormone (Prg32489) // [Human Reproduction](#). — 1997. — Vol. 12. — № 2. — P. 224–230.
4. Rat embryo quality and production efficiency are dependent on gonadotrophin dose in superovulatory treatments / [Cornejo-Cortés MA](#), [Sánchez-Torres C](#), [Vázquez-Chagoyán JC](#), [Suárez-Gómez HM](#), [Garrido-Fariña G](#), [Meraz-Ríos MA](#). // [Laboratory Animals](#). — 2006. — V. 40, № 1 — P. 87–95.
5. [Ian J. Jackson](#), [Catherin M. Abbot](#). Mouse genetics and transgenics // A practical approach. —Oxford University press. — 2000. — P. 300.