



УКРАЇНА

(19) UA (11) 21434 (13) A

(51)5 A 61 D 19/04

ДЕРЖАВНЕ
ПАТЕНТНЕ
ВІДОМСТВООПИС ДО ПАТЕНТУ
НА ВІНАХІДбез проведення експертизи по суті
на підставі Постанови Верховної Ради України
№ 3769-XII від 23.XII 1993 рПублікується
в редакції заявника

(54) СПОСІБ РОЗДІЛЕННЯ ЕМБРІОНІВ ССАВЦІВ

1

(21) 94053195
(22) 11.05.94
(24) 02.12.97
(46) 30.04.98. Бюл. № 2
(47) 02.12.97
(72) Безуглий Микола Дмитрович, Гордієнко Ніна Олександрівна
(73) Інститут тваринництва Української академії аграрних наук

2

(57) Способ разделения эмбрионов млекопитающих, включающий помещение эмбриона в изотонический раствор и микрохирургические операции с ним, отличающийся тем, что эмбрион извлекают из изотонического раствора питательной среды, помещают на время проведения операции в гипотонический раствор питательной среды осмолярностью 190 – 200 мосм и возвращают в изотонический раствор.

Изобретение относится к области биотехнологии, в частности, к микрохирургическому разделению эмбрионов и может быть использовано для трансплантации эмбрионов млекопитающих.

Известен способ проведения микрохирургического разделения эмбрионов, при котором эмбрионы, пригодные к делению, помещают в изотонический физиологический раствор, фиксируют его микроприсоской и производят делению скальпелем. Полученные части культивируют или пересаживают животным-реципиентам [Ozili J.F. Production of identical twins by bisection of blastocysts in the cow. – J. Reprod. Fert., 1983, 69, p. 463 – 468].

Однако при таком способе разделения эмбрионов часть бластомеров разрушается чисто механически, в результате чего половинки эмбрионов могут быть нежизнеспособны.

Известен способ микрохирургических операций, который принят в качестве прототипа. Способ заключается в следующем, эмбрион помещают в изотонический раствор и микроножом проводят деление на части. [Baker R.D., Shea B.F. Commercial splitting of bovine embryos. – Theriogenology, 1985, v. 23, N1, p. 3 – 7]. При этом объем и размеры бластомеров, а также связь между ними остаются неизменными.

В нативном эмбрионе связи между бластомерами почв. Разделение эмбриона достигается непосредственно разделением бластомеров эмбриона так, чтобы получилось две или несколько разобренных частей. Недостатком известного способа разделения эмбрионов на части является большая вероятность механических повреждений бластомеров вследствие чего снижается его жизнеспособность.

Задача изобретения – повышение сохранности бластомеров эмбриона при про-

(19) UA (11) 21434 (13) A

ведении микрохирургических операций и улучшение технологичности проведения операций.

Поставленная задача решается благодаря тому, что в известном способе разделения эмбриона на части, заключающемся в помещении объекта в изотонический раствор и проведение микрохирургических манипуляций, согласно изобретению, биологический объект на время операции помещают в гипотонический раствор питательной среды осмолярностью 190 – 200 мосм, проводят разделение эмбриона на части и, после проведения операции, снова возвращают объект в изотоническую среду.

Анализ известных решений по источникам научно-технической информации не выявил признаков, сходных с отличительными признаками заявляемого технического решения, что подтверждает новизну и изобретательский уровень предлагаемого решения.

Проведенный способ разделения на части основан на том, что при помощи в гипотонические условия бластомеры эмбриона, увеличиваясь в объеме, изменяют свою геометрическую форму, становясь сферическими, в то время как бластомеры нативного эмбриона в изотонических условиях имеют форму эллипсоида вращения. Упомянутое увеличение объема происходит в результате входа воды внутрь бластомеров для выравнивания вне – и внутриклеточной концентрации растворенных веществ. При помещении эмбриона в раствор осмолярностью 190 – 200 мосм его объем увеличивается в 1,4 раза. Изменение формы приводит к уменьшению площади контактов между соседними бластомерами, а, значит, и к ослаблению этих контактов.

Осмолярность раствора 300 мосм является изотонической, изменения клеточного объема не происходит.

Выбор концентрации 190 – 200 мосм обусловлен тем, что при более высоких концентрациях увеличение объема невелико и не дает ожидаемого эффекта в ослаблении межбластомерных связей; а более низкие концентрации вызывают фатальное увели-

чение объема. Увеличение объема эмбриона в растворе осмолярностью 190 – 200 мосм вполне достаточно для достижения преследуемой цели. В опыте эмбрион помещали в гипотонический раствор, выдерживали в течение 10 минут, возвращали физиологические условия и культивировали вне организма (табл. 1).

Сущность предложенного способа состоит в следующем. Эмбрион, находящийся в изотоническом физиологическом растворе, переносят в гипотонический раствор осмолярностью 190 – 200 мосм. Выдерживают в растворе в течение минуты и проводят разделение эмбриона на части. При этом разделение происходит за счет разрывания связей между бластомерами. После этого часть эмбриона вновь переносят в изотонический раствор.

Предложенный способ иллюстрируется следующим примером его осуществления.

Пример. Эмбрионы коровы на стадии морулы получали нехирургическим путем на 7 день после осеменения. Пригодные к разделению эмбрионы отмывали два раза в изотоническом физиологическом растворе. Переносили эмбрионы по одному в каплю раствора NaCl осмолярностью 200 мосм на предметное стекло и стеклянной иглой проводили разделение эмбриона на две части. Последние переносили в фосфатно-солевой буфер осмолярностью 300 мосм и помещали в термостат при 37°C на 3 часа. Если половинка эмбриона была жизнеспособна, то есть в процессе деления бластомеры не были разрушены, часть эмбриона формировала морулу меньшего размера. В качестве контроля проводили разделение эмбриона таким же способом, но в изотоническом растворе.

Результаты эксперимента представлены в табл. 2.

Результаты эксперимента показывают, что использование гипотонического раствора при разделении эмбрионов млекопитающих позволяет повысить сохранность бластомеров эмбриона и улучшить технологию проведения операции.

Таблица 1

Изменение объема эмбрионов и их жизнеспособность после выдержки в растворах различной осмолярности

Осмолярность раствора, мосм	Кратность увеличения объема клеточной массы	Жизнеспособность биологических объектов (% развившихся эмбрионов в культуре)
300 (контроль)	1	88
200	1,4	87
150	2,1	75
100	2,6	67

Таблица 2

Разделение эмбрионов на части в изотоническом и гипертоническом растворах

	Количество использованных эмбрионов, шт.	Количество половинок, поставленных на культивирование, шт.	Количество половинок, развившихся, шт.	Жизнеспособность половинок, %
Опыт	17	32	19	61
Контроль	18	31	16	50

Упорядник

Техред М.Келемеш

Корректор М.Куль

Замовлення 4436

Тираж

Підписне

Державне патентне відомство України,
254655, ГСП, Київ-53, Львівська пл., 8

Відкрите акціонерне товариство "Патент", м. Ужгород, вул.Гагаріна, 101

