Simulacija i postav umjetnog jajeta kao pribora za ispitivanje toksičnosti pesticida i nanočestica

Bjedov, Dora

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of biology / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:181:209804

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

ODJEL ZA BIOLOGIJU
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Repository / Repozitorij:

Repository of Department of biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

zir.nsk.hr

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

ODJEL ZA BIOLOGIJU

Preddiplomski studij biologije

Dora Bjedov

SIMULACIJA I POSTAV UMJETNOG JAJETA KAO PRIBORA ZA ISPITIVANJE TOKSIČNOSTI PESTICIDA I NANOČESTICA

Završni rad

Mentor: izv. prof. dr. sc. Branimir K. Hackenberger

Osijek, 2017.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za biologiju

Završni rad

Preddiplomski sveučilišni studij Biologije

Znanstveno područje : Prirodne znanosti

Znansteno polje: Biologija

SIMULACIJA I POSTAV UMJETNOG JAJETA KAO PRIBORA ZA ISPITIVANJE TOKSIČNOSTI PESTICIDA I NANOČESTICA

Dora Bjedov

Rad je izrađen na Zavodu za kvantitativnu ekologiju, Odjel za biologiju

Mentor: izv. prof. dr. sc. Branimir K. Hackenberger

Kratak sažetak završnog rada

Razvoj umjetnog jajeta je koristan kako za primjenjena tako i za temeljna istraživanja u područjima embriologije, animalne fiziologije i histologije. U ovom radu su isprobavani razni uvjeti kondicioniranja umjetnog jajeta (vrijeme preinkubacije, metoda razbijanja ljuske, prijanjajuća folija) kako bi se utvrdili optimalni.

Broj stranica: 15

Broj slika: 20

Broj tablica: -

Broj literaturnih navoda: 1

Web izvor: 3

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: simulacija umjetnog jajeta, uvjeti izljeganja, kultura embrija

Rad je pohranjen u knjižnici Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku i u Nacionalnoj sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu u elektroničkom obliku te je objavljen na web stranici Odjela za biologiju.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

Department od Biology

Bachelor's thesis

Undergraduate university study programme in Biology

Scientific Area: Natural science

Scientific Field: Biology

SIMULATION AND SETUP OD THE ARTIFICIAL EGG FOR TOXICITY TESTING OF PESTICIDES AND NANOPARTICLES

Dora Bjedov

Thesis performed at the Subdepartment of Quantitative Ecology

Supervisor: Branimir K. Hackenberger, **PhD Associate Professor**

Short abstract:

The development of artificial egg would be useful in the applied as well as in the fundamental research in the fields of embriology, animal physiology and histology. In this thesis various parameters of artificial egg conditioning (preincubation periods, eggshell cracking, transparent plastic film,) were examined with purpose to establish optimal conditions.

Number of pages: 15

Number of figures: 20

Number of tables: -

Number of references: 1

Web source: 3

Original in: Croatian

Key words: artificial egg simulation, hatching conditions, chicken embryo culture

Thesis deposited in the Library of Department of Biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek and in the National university library in Zagreb in electronic form. It is also disposable on the web site of Department of Biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek.

SADRŽAJ:

1. UVOD 1

2. MATERIJALI I METODE 3

2.1. Jaja 3

2.2. Kultura u plastičnim čašama 3

2.3. Kultura embrija 4

3. RAZRADA 7

3.1. Preinkubacijski period 7

3.2. Ljuska 7

3.3. Razvoj embrija 10

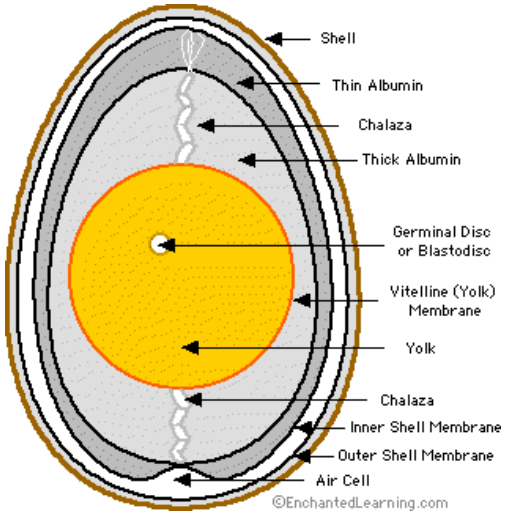
4. RASPRAVA 12

5. ZAKLJUČAK 14

6. LITERATURA 15

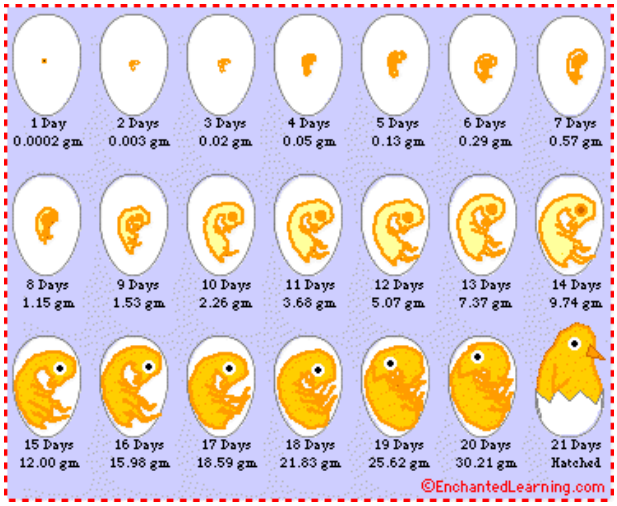
1. UVOD

Razvoj ptičjeg embrija odvija se u amniotičkom jajetu – ključna prilagodba za život na kopnu. Embriološki razvoj jajeta domaće kokoši (*Gallus gallus domesticus*) započinje kao žumanjak, oocita, u jajovodu procesom ovulacije. Kod ptica je karakteristično da imaju samo lijevi jajnik i jajovod kao anatomska prilagodba za let. Oplodnja je unutrašnja i odvija se u jajovodu. Oocita prolazi kroz jajovod i obložena je vitelarnom membranom, strukturnim vlaknima i slojevima albumina. Prolaskom kroz jajovod oocita se rotira i strukturna se vlakna pretvaraju u halaze koje stabiliziraju žumanjak unutar albumina. Na kraju jajovoda stvara se ljuska koja se sastoji od 95 do 97 % kristala kalcijevog karbonata koji su stabilizirani proteinskim matriksom. Cijeli put nastanka jajeta traje oko 20 sati. Ako je blastodisk oplođen, naziva se blastoderm te započinje razvoj embrija. Primarni izvor hrane je žumanjak. Ekskreti se izlučuju kroz membranu alantois, a izmjena plinova, kisika i ugljikovog dioksida odvija se kroz korion koji je povezana s krvnim žilama i porama ljuske (Slika 1.)



Slika 1. Anatomija jajeta: ljuska (shell), albumin (thin albumin), halaze (chalaza), blastodisk ili blastoderm (germinal disc or blastodisc), vitelarna membrana (vitelline (yolk) membrane), žumanjak (yolk), unutrašnja membrana (inner shell membrane), vanjska membrana (outer shell membrane), mjehurić zraka (air cell)

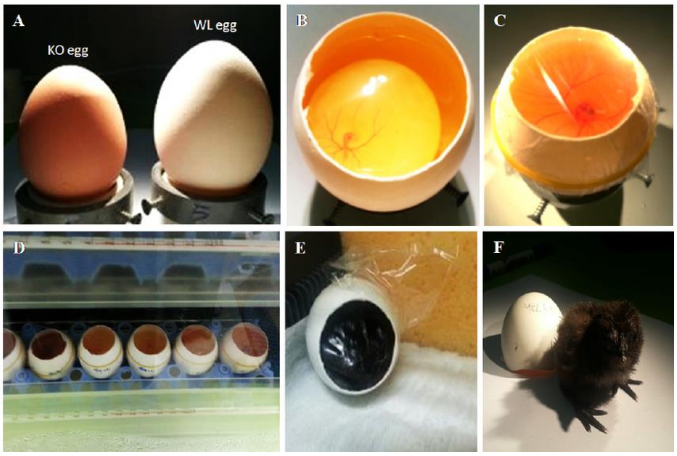
Period inkubacije jaja različit je kod svake vrste. Većina malih pjevica (Passeriformes), crnokljuna kukavica (*Coccyzus erythropthalmus*) i žutokljuna kukavica (*Coccyzus americanus*) inkubiraju jaja 11 dana, a lutajući albatros (*Diomedea exulans*) i smeđi kivi (*Apteryx mantelli*) imaju period inkubacije od 85 dana. Razvoj jaja domaće kokoši traje 21 dan. (Slika 2.)



Slika 2. Razvoj kokošjeg embrija unutar ljuske koji traje 21 dan

Razvoj embrija izvan ljuske jajeta prvi je korak u postavljanju i simulaciji umjetnoga jajeta kao eksperimentalna metoda. Ova metoda bit će korisna za ispitivanje u područjima genetike, animalne fiziologije, histologije i regenerativne medicine, fokusirajući se na transgene ptice, manipulacije embrijem te modifikacija tkiva. Uz to, ova tehnika omogućit će zaštitu rijetkih i ugroženih ptica na način da će se moći spasiti njihova oštećena oplođena jaja. Postav umjetnog jajeta omogućit će direktno učenje o embriologiji i fiziologiji te svakodnevno promatranje rasta i razvoja od malih nakupina stanica do odraslog organizma.

Ideja o umjetnom jajetu proizišla je na temelju metode sa surogat ljuskama (Slika 3.). Nakon tri dana embriji iz kokošjih jaja prebačeni su u ljuske jajeta domaćeg purana (*Meleagris gallopavo domestica*), prekriveni su folijom te inkubirani do izlijeganja. Ova metoda bila je uspješna za 7 % embrija. Različitim poboljšanjima uspješnost izlijeganja povećala se na 50 %, no mnogi su nedostatci ove metode – kao što je pripremanje surogat ljuski, nemogućnost recikliranja i nedovoljna manipulacija embrijem tijekom inkubacije.



Slika 3. Primjer metode sa surogat ljuskama

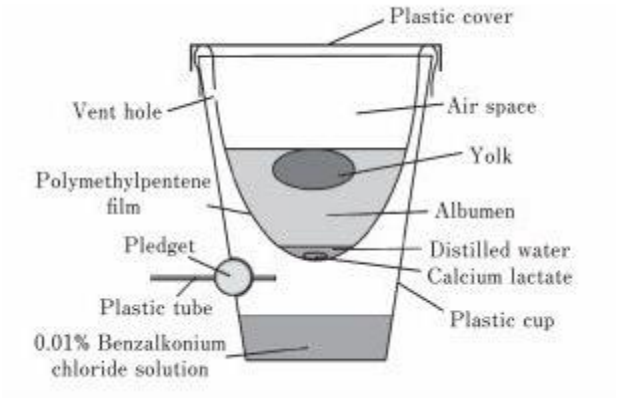
2. MATERIJALI I METODE

2.1. Jaja

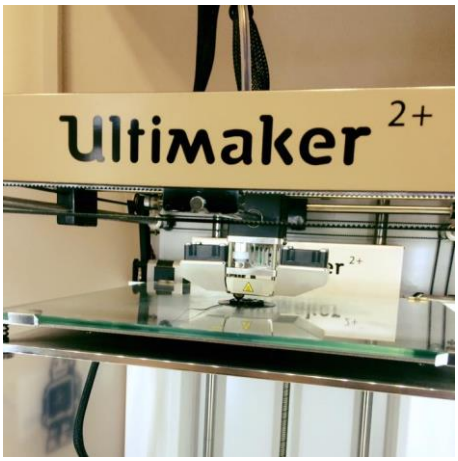
Oplođena kokošja jaja korištena u ovom radu kupljena su na osječkoj tržnici u Donjem gradu, u Ledeniku, Petrijevcima i Karancu.

2.2. Kultura u plastičnim čašama

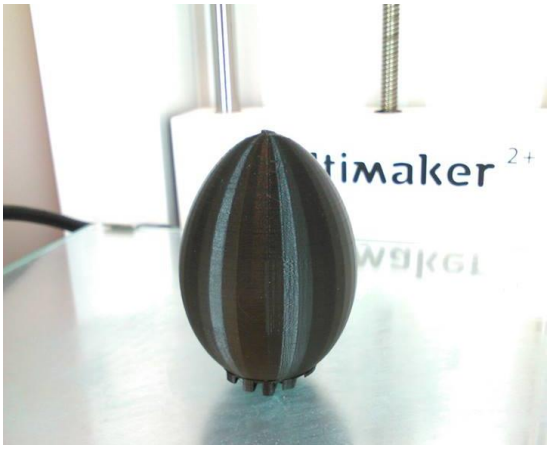
Korištene su plastične čaše od 500 ml za kulturu jaja na kojima se izrezala rupa promjera 1,5-2 cm na 3-5 cm od kraja čaše. Rupa se začepila pamučnom vatom koja ima funkciju filtriranja zraka. Plastična cijev promjera 2 mm, dužine oko 4 cm stavila se između plastike i pamučne vate zbog aeracije, odnosno dovoda optimalne količine kisika. Zatim se u čašu ulila 0,01 %-tna otopina benzalkonijevog klorida. Benzalkonijev klorid sterilizira okolinu za razvoj jajeta, ima ulogu baktericida i inihibira razvoj gljivica. Kuhinjsku se prijanjajuću foliju oblikovalo konkavno, u oblik jajeta, bez nabora i stavilo se u čašu. Na kraju se embrij prekrio plastičnim poklopcem ili prozirnom prijanjajućom folijom (Slika 4.). Kako bi se dobio što vjerniji oblik jajeta, 3D se isprintalo jaje na koje se rastegnula folija (slika 5. i 6.).



Slika 4. Shematski crtež kulture u plastičnoj čaši: plastični poklopac (plastic cover), zrak (air space), žumanjak (yolk), albumin (albumen), sterilna destilirana voda (distilled water), kalcijev laktat pentahidrat (calcium lactate), plastična čaša (plastic cup), 0,01 %-tna otopina benzalkonijevog klorida (0,01 % benzalkonium chloride solution), plastična cijev (plastic tube), pamučna vatica (pledget), kuhinjska prozirna prijanjajuća folija (polymethylpentene film), ventilacijske rupe (vent hole)



Slika 5. Prikaz 3D printera i printanje plastičnog jajeta

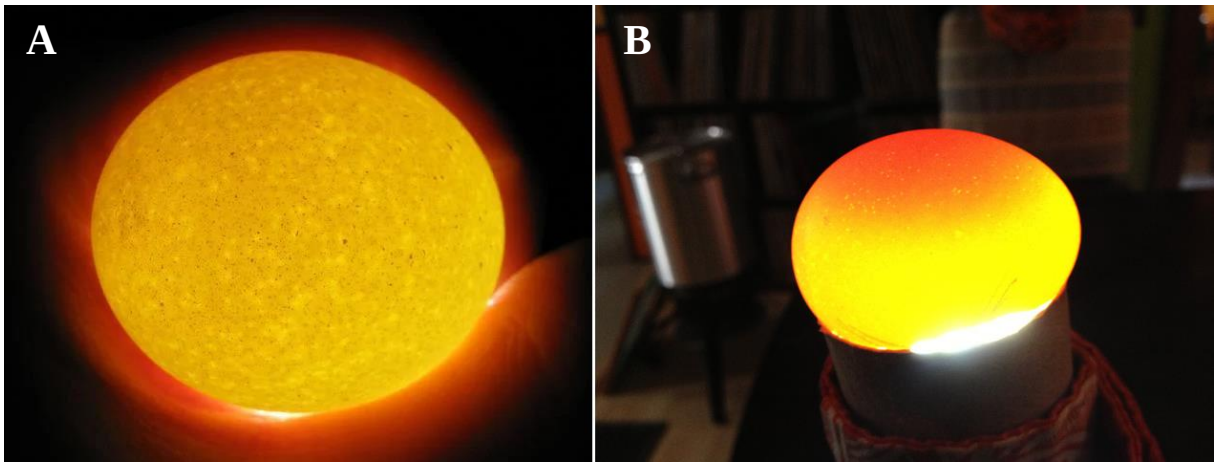


Slika 6. Prikaz plastičnog jajeta iz 3D printera

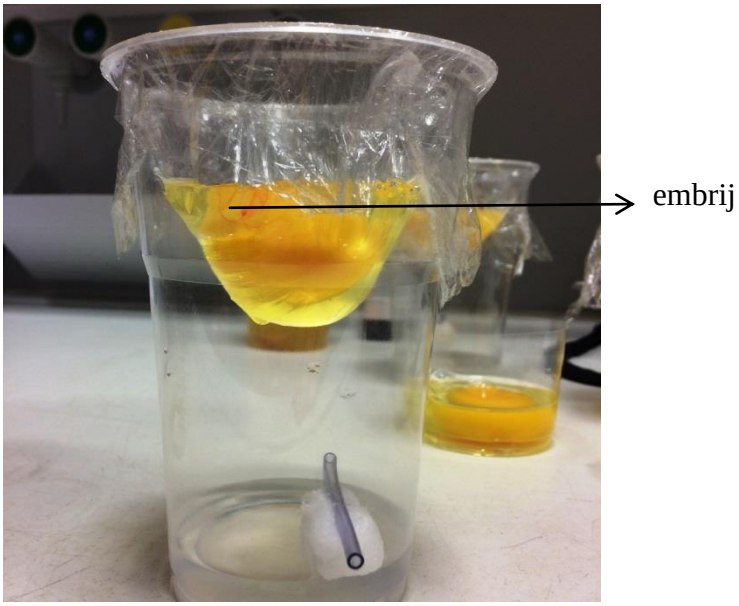
2.3. Kultura embrija

Kupljena kokošja jaja isti su dan stavljena u inkubator na 37° C i 60 % vlažnosti. Inkubirala su se 72 sata. Za pripremu kulture potrebno je odvagati 250-300 mg kalcijevog laktata pentahidrata. Zatim se dodaje 2,5-3 ml sterilizirane destilirane vode. Za svako inkubirano jaje nužno je odrediti je li oplođeno ili nije. U mračnoj prostoji potrebno je imati lampu na koju će se staviti jaje kako bi se dobila sjena. Ako je jaje oplođeno, na jednoj strani bit će tamnije, a na drugoj svjetlije. Ako jaje nije oplođeno, bit će iste svjetline cijelom dužinom. (Slika 7. A, B.)

Ljusku svakog oplođenog jajeta potrebno je obrisati sa 70 % etanolom, oprezno razbiti ljusku i jaje s albuminom lagano premjestiti u čašu (Slika 8.). Ako dio ljuske upadne u čašu, lagano ga treba izvaditi sa steriliziranom pincetom.



Slika 7. A, B. Razlike u neoplođenom (A) i u oplođenom (B) kokošjem jajetu. Neoplođeno jaje iste je svjetline cijelom svojom veličinom, a oplođeno jaje je tamnije na strani gdje se razvija zametak



Slika 8. Prikaz embrija u plastičnoj čaši

Zatim se probuši oko deset ventilacijskih rupa na prozirnoj foliji, visoko, kako ih embriji ne bi dodirivali. Kultura se pokriva plastičnom folijom ili poklopcem kako bi vlažnost unutar čaše bila oko 100 %. Embriji se drže u inkubatoru na 38° C i 80 % vlažnosti (Slika 9.). Čašu se treba postaviti pod kutem od 8° i rotirati u smjeru kazaljke na satu, dva puta dnevno.

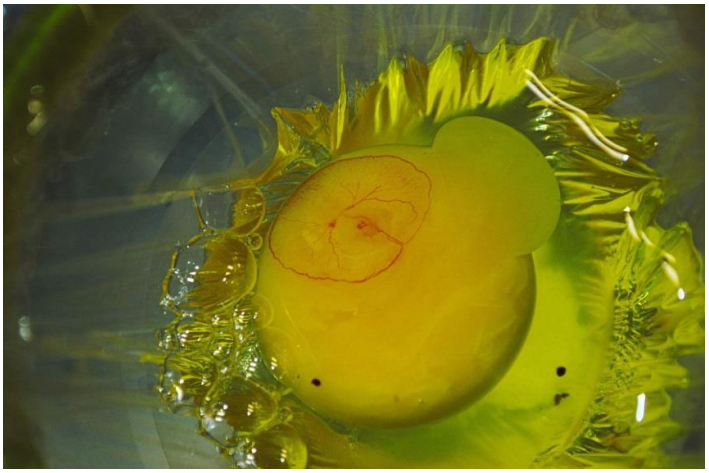


Slika 9. Prikaz oplođenih jaja u čašama, u inkubatoru

3. RAZRADA

3.1. Preinkubacijski period

Embriji koji su inkubirani više od tri dana aktivnije započinju svoj razvoj u odnosu na prva tri dana te prilikom razbijanja ljuske i prijenosa u plastičnu čašu razlije se žumanjak zbog puknuća vitelarne membrane (slika 10.). Što je embrij stariji, više tvari crpi iz žumanjka i vitelarna je membrana osjetljivija. Iako je za razvoj embrija do 21. dana potrebna nepuknuta vitelarna membrana i čitav žumanjak, embrij može preživjeti još nekoliko dana s razlivenim žumanjkom. (slika 11.).



Slika 10. Prikaz puknuća vitelarne membrane i razlijevanje žumanjka



Slika 11. Prikaz razvoja embrija s razlivenim žumanjkom

3.2. Ljuska

Vitelarna membrana puca kada se jaje nepravilno razbije i žumanjak zapinje za oštre dijelove ljuske. Kako bi se to smanjilo, ljuska se jajeta otopi u vodenoj otopini klorovodične kiseline (slika 12.).

Kalcijev karbonat reagirao je s klorovodičnom kiselinom. U ovoj egzotermnoj reakciji produkti su sol kalcijev klorid te ugljikov dioksid.

$$2\ HCl_{(aq)} + CaCO_{3\,(s)} \rightarrow CaCl_2 + H_2O + CO_{2\,(g)}$$



Slika 12. Prikaz otapanja ljuske jajeta u razrijeđenoj klorovodičnoj kiselini

Klorovodična kiselina nejednako je otopila ljusku u roku od deset minuta i kroz pore membrana ušla u jaje, u albuminski dio (slika 13.).

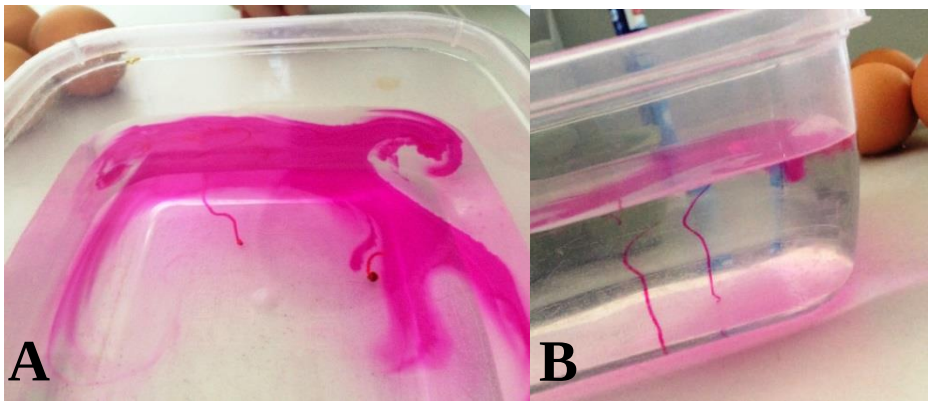


Slika 13. Prikaz oplođenog jajeta čija je ljuska nejednako otopljena u vodenoj otopini klorovodične kiseline

Sljedeća zamisao bila je koristiti slabiju organsku kiselinu te je jaje uronjeno u vodenu otopinu octene kiseline i ostavljeno u inkubatoru 24 sata. U ovoj reakciji, vodena otopina octene kiseline reagira s kalcijevim karbonatom i produkti su sol kalcijev acetat, voda i ugljikov dioksid.

$$CaCO_3 + 2\ CH_3COOH_{(aq)} \rightarrow Ca(CH_3COO)_2 + H_2O + CO_{2\ (g)}$$

Nekoliko jaja obojena su rodaminom kako bi bilo utvrđeno ulazi li octena kiselina kroz pore membrana. U reakciji rodamina i vodete otopine octene kiseline uočeno je nasumično gibanje čestica – Brownovo gibanje (Slika 14. A, B.) To je nasumično gibanje čestica koje su veće od atoma i molekula, ali premale za vidljivost golim okom. Karakteristično se u tekućini gibaju nasumično, udaraju u mikroskopske čestice, dokaz molekularno-kinetičke teorije.

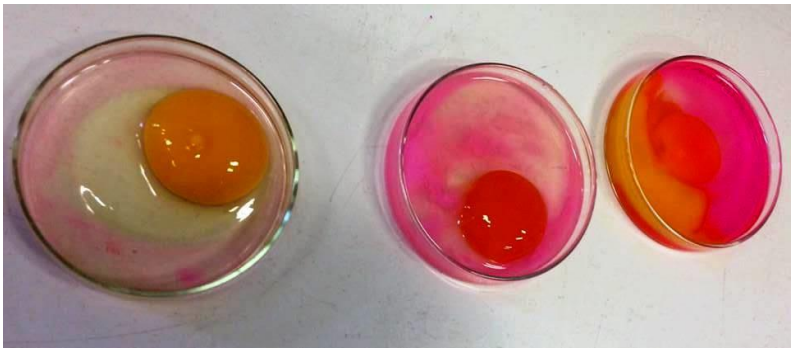


Slika 14. A, B. Prikaz Brownovog gibanja: pogled od gore (A), pogled sa strane (B)

Nakon 24 sata jaja su izvađena iz vodene otopine octene kiseline (slike 15. i 16.). Ni sa slabom octenom kiselinom ljuska se nije homogeno otopila i kiselina je uspjela prodrijeti kroz vanjsku i unutrašnju membranu jajeta.



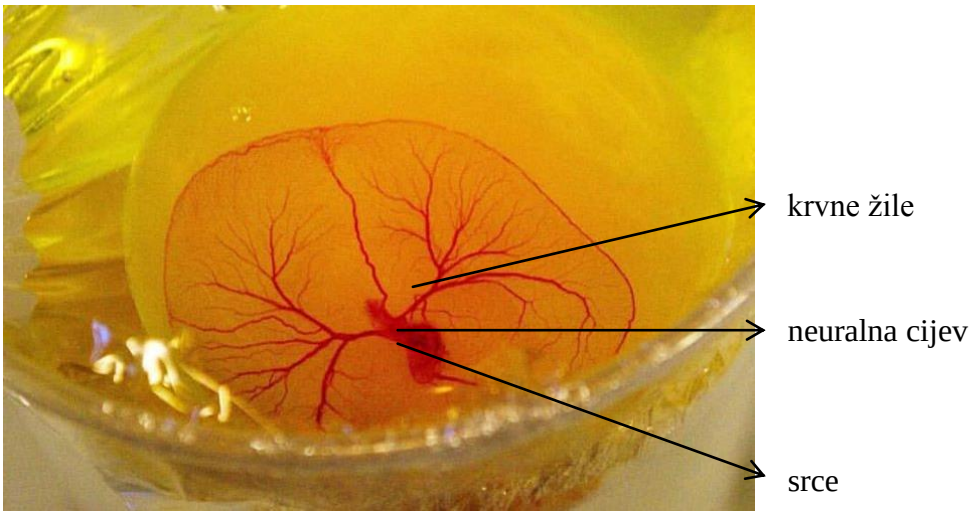
Slika 15. Prikaz jajeta bez ljuske, otopljena u vodenoj otopini octene kiseline



Slika 16. Prikaz unutrašnjeg dijela jajeta, rodamin je uspio prodrijeti kroz pore membrana

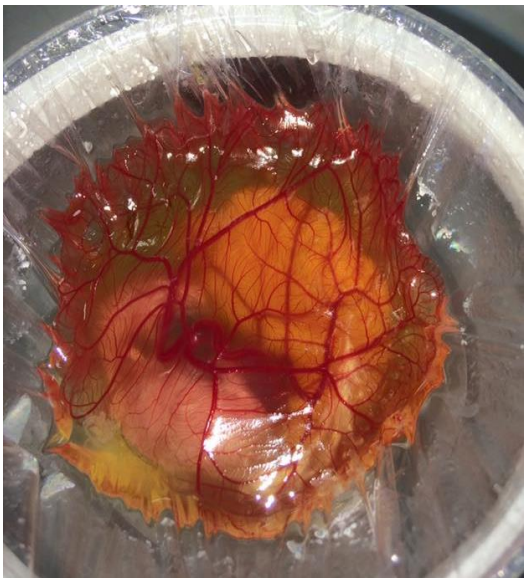
3.3. Razvoj embrija

Uspješno prebačeni embriji u čašu nakon trećeg dana nastavili su svoj razvoj u inkubatoru. Embriju se treći i četvrti dan jasno vide krvne žile, srce koje kuca i neuralna cijev (slika 17.).



Slika 17. Prikaz embrija četvrti dan na kojemu se vide krvne žile, neuralna cijev i srce

Embrij je razvijen do šesnaestog dana. Jasno su vidljive oči, ostatak žumanjčane vreće, krve žile, folikuli i perje (slika 18.). Nakon toga pile je umrlo zbog nedostatka kisika.

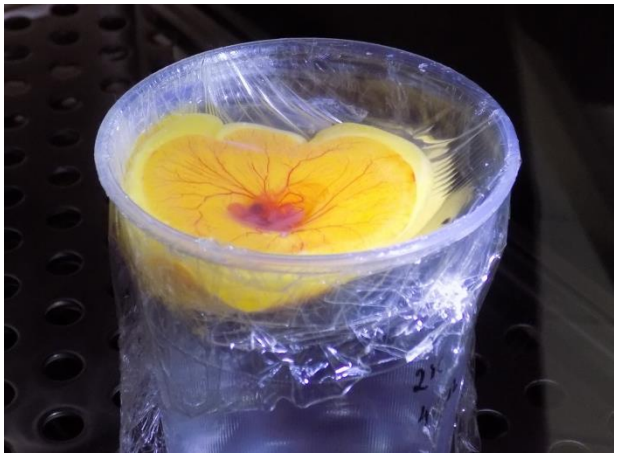


Slika 18. Prikaz razvoja embrija 16. dan

4. RASPRAVA

U ovom eksperimentu pokušana je metoda pomoću koje bi se razvoj kokoši odvijao izvan jajeta u plastičnoj čaši te uvjete koji su potrebni za pozitivne rezultate. Jedan od ključnih čimbenika bio je odabrati prozirnu kuhinjsku prijanjajuću foliju koja pri rastezanju neće pukniti. Bitno je da nakon rastezanja nema nabore, a premještanjem embrija u foliju ne smije početi propuštati kapljice kroz pore. Najbolja folija za korištenje u radu bila je prozirna prijanjajuća folija Badis od 30 metara.

Postavljanje čaše pod određenim kutem bitno je zbog embrija kako bi razvoj simulirali u jajetu. U jajetu se embrij formira i postavlja bočno kako bi mogao što lakše koristiti hranjive tvari iz žumanjka. Ako čaša stoji uspravno, embrij se ne može postaviti sa strane te nakon nekoliko dana umire (slika 19.). Dnevna rotacija embrija bitna je kako se žumanjčana vrećica i korion sa žilama ne bi zalijepili za čašu i onemogućili daljni razvoj, no u ovoj metodi to nije bilo nužno.



Slika 19. Prikaz embrija u središtu simuliranog jajeta

Preinkubacijski period embrija za prijenos iz jajeta u plastičnu čašu varirao je od dva do četiri dana. Prijenosom nakon dva dana, u većini slučajeva, embrij nije nastavio razvoj. Prijenosom nakon četiri ili više dana, u 100 % slučajeva, došlo je do puknuća vitelarne membrane i razvoj je stao. Razlijevanjem žumanjčane vrećice embrij više ne može uzimati hranjive tvari potrebne za rast i razvoj. Hranjive tvari u žumanjku su masti (32,5 %), proteini (17,5 %), ugljikohidrati (1,0 %), voda (48,0 %) i ostalo (1,0 %).

Potrebnu količinu kalcija za rast i razvoj embrij u jajetu uzima iz ljuske. Dodatak kalcija otopljenog u sterilnoj destiliranoj vodi doveo je do zaustavljana razvoja embrija što ukazuje na poremećaj elektrolita ili hiperkalcemiju. Zbog toga se prvo dodaje kalcijev laktat pentahidrat, a zatim sterilna destilirana voda bez miješanja kako bi većina ostala neotopljena u početku razvoja. Razvitkom i rotacijom postupno bi se kalcijev laktat trebao otapati i embrij bi dobivao zalihu

kalcija koja mu je potrebna, no optimalna količina kalcija morala bi se točno odrediti daljnim istraživanjima.

U budućim eksperimentima treba zamijeniti prijanjajuću foliju plastičnim poklopcem. Iako je jedna od funkcija albumina mehanička zaštita, postavljanje i učvršćivanje plastične folije kao poklopca u nekoliko je slučajeva dovelo do puknuća krvnih žila embrija (slika 20.).



Slika 20. Prikaz puknuća krvnih žila kod embrija i razljevanje krvi

5. ZAKLJUČAK

Uspješan razvoj metoda s upotrebom umjetnih jaja kakva su upotrijebljena u ovom radu omogućit će nova i korisna istraživanja na poljima embriologije, fiziologije i regenerativne medicine te ubrzati i smanjiti cijenu postojećih metoda. Upotreba umjetnog jaja je jednostavna, ne zahtijeva kompliciranе radove i operacije, specijalne materijale, a nabava oplođenih jaja nije složena. Prozirnost plastičnih materijala od kojih se mogu izraditi umjetna jaja omogućavaju jednostavno praćenje razvoja embrija gotovo od stadija zigote sve do odraslog pilića. Uspješnim razvojem primjene umjetnog jaja omogučit će se praćenje utjecaja kemikalija, pesticida i nanočestica koje se koriste danas u poljoprivredi, na razvoj domaćih kokoši koje se koriste u prehrani te utjecaj kemikalija na druge domaće životinje.

Pri razvoju umjetnog jajeta postoji niz čimbenika čije minimalne promjene mogu imati presudnu ulogu u uspješnosti razvoja embrija. Jednako tako i kombinacije pojedinih parametara bitno mogu mijenjati kako brzinu razvoja embrija tako i pravilnost njegova razvoja. Buduća istraživanja su nužna kako bi se upotreba umjetnog jajeta mogla standardizirati i postati nova stavka u istraživanjima u okvirima dobre laboratorijske prakse.

6. LITERATURA

1. Yutaka Tahara, Katsuya Obara (2014.): A Novel Shell-less Culture System for Chick Embryos Using a Plastic Film as Culture Vessels

Web Izvori:

1. http://www.enchantedlearning.com/subjects/birds/info/chicken/egg.shtml

2. http://www.thepoultrysite.com/articles/1459/embryonic-development-day-by-day/

3. http://www.poultryhub.org/physiology/body-systems/reproductive-system/