

## АНАЛИЗ СПОСОБОВ ЗАКРЫТИЯ ДЕФЕКТОВ СКОРЛУПЫ ОПЛОДОТВОРЕННОГО ЯЙЦА ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Пахомова Н.Ю.<sup>1</sup>, Строкова Е.Л.<sup>1</sup>, Корель А.В.<sup>1</sup>, Гусев А.Ф.<sup>1</sup>, Мелешко Е.М.<sup>2</sup>,  
Зайдман А.М.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна»  
Минздрава России, Новосибирск, e-mail: agusev@niito.ru;

<sup>2</sup>МУП «Новосибирский Зоопарк имени Р.А. Шило», Новосибирск

---

**Цель исследования:** разработать способ закрытия дефекта скорлупы оплодотворенного яйца для проведения экспериментальных исследований на основании анализа анатомо-физиологических параметров завершающегося эмбриогенеза. Проведен анализ способов закрытия дефектов скорлупы оплодотворенного яйца и особенностей развития куриного эмбриона после закрытия дефекта скорлупы. Разработан оригинальный способ закрытия дефекта скорлупы оплодотворенного яйца для проведения экспериментальных исследований (получен патент). Проведена оценка жизнеспособности куриного эмбриона после закрытия дефекта скорлупы разработанным способом с использованием классификации Гамбургера–Гамильтона. Проводилось анатомо-физиологическое сравнение эмбрионов экспериментальной группы с параметрами развития при нормальном эмбриогенезе на 7-е, 13-е и 17-е сутки инкубации. В результате проведенного исследования апробирован разработанный авторами способ закрытия дефекта скорлупы оплодотворенного куриного яйца (силиконовой крышечкой). Полученные данные свидетельствуют о физиологическом развитии цыплят экспериментальной группы, что позволяет осуществлять наблюдение за развивающимся птенцом в течение не менее 17 суток. Проведена сравнительная характеристика анатомо-физиологических параметров эмбрионов экспериментальной группы и группы сравнения на основе классификации Гамбургера–Гамильтона, которая не выявила различий в развитии куриных эмбрионов в указанные сроки эксперимента.

---

**Ключевые слова:** способ закрытия дефекта скорлупы яйца, жизнеспособность куриного эмбриона после закрытия дефекта скорлупы яйца, развитие куриного эмбриона, дефект скорлупы яйца, эмбриогенез.

## ANALYSIS OF METHODS FOR CLOSING DEFECTS IN THE SHELL OF A FERTILIZED EGG FOR EXPERIMENTAL RESEARCH

Pahomova N.Y.<sup>1</sup>, Stroikova E.L.<sup>1</sup>, Korel A.V.<sup>1</sup>, Gusev A.F.<sup>1</sup>, Meleshko E.M.<sup>2</sup>,  
Zaydman A.V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopedics n.a. Ya.L. Tsiyvan, Novosibirsk, e-mail:  
agusev@niito.ru;

<sup>2</sup>Rostislav Shilo Novosibirsk Zoo, Novosibirsk

---

**The purpose of the study:** to develop a method for closing a defect in the shell of a fertilized egg for conducting experimental studies based on the analysis of anatomical and physiological parameters of the completed embryogenesis. The analysis of the methods of closing the shell defects of the fertilized egg and the peculiarities of the development of the chicken embryo after the closure of the shell defect has been carried out. An original method for closing the shell defect of a fertilized egg has been developed for experimental research (a patent has been received). The viability of the chicken embryo after the closure of the shell defect by the developed method was assessed using the Hamburger–Hamilton classification. Anatomical and physiological comparison of the embryos of the experimental group with the parameters of development during normal embryogenesis was carried out on the 7th, 13th and 17th days of incubation. As a result of the study, the authors have tested a method for closing the shell defect of a fertilized chicken egg (silicone cap). The data obtained indicate the physiological development of the chickens in the experimental group, which allows observation of the developing chick for at least 17 days. A comparative characteristic of the anatomical and physiological parameters of the embryos of the experimental group and the comparison group was carried out on the basis of the Hamburger–Hamilton classification, which did not reveal any differences in the development of chicken embryos in the indicated periods of the experiment.

---

**Keywords:** method for closing an eggshell defect, viability of a chicken embryo after closing an eggshell defect, development of a chicken embryo, eggshell defect, embryogenesis.

Изучение патологических процессов различных заболеваний часто требует проведения медицинских экспериментов с манипуляциями на курином эмбрионе. Создание экспериментальной модели для изучения морфологических, биохимических, гистологических показателей на животном организме предполагает исходный объект с физиологическими параметрами. Куриный эмбрион является универсальным живым объектом для экспериментальных исследований. Известковая скорлупа имеет, по меньшей мере, двойное значение: она представляет прочную стенку камеры, в которой развивается цыпленок, и вместе с тем она служит запасом извести, необходимой для образования костной ткани. Воссоздание целостности скорлупы и устранение дефектов скорлупы после проведения экспериментальных манипуляций являются, по сути, основополагающей проблемой для продолжения нормального эмбриогенеза. Восстановление механической целостности скорлупы не является конечной точкой решения этой проблемы. Необходимо восстановление физиологических параметров скорлупы – проницаемости, плотности, устойчивости к механическим повреждениям, прочности. При проведении эксперимента возникает необходимость использования открытого доступа к эмбриону. Отверстие доступа может достигать размера более 1,5х2,5 см. Для получения положительного результата при завершении эмбриогенеза и вылуплении птенца необходимо сохранение гомеостаза яйца, как элемент – воссоздание целостности скорлупы [1].

Существующие способы закрытия дефектов скорлупы во многом решают обозначенные проблемы, однако остаются нерешенными некоторые аспекты.

1. «Способ анализа и/или обработки оплодотворенного яйца и система для выполнения указанного способа» [2]. В данном способе выполняют маленькое отверстие, не задевая внезародышевые органы с эмбриональными жидкостями, жизненно важными для развития. Поэтому для сохранения гомеостаза яйца не возникает необходимость воссоздания целостности скорлупы. Способ включает в себя этап выполнения пункции и/или инъекции вещества в белковый мешок яйца. При данном способе не планируется вылупление птенца в физиологические сроки. Для экспериментов, требующих больших размеров отверстия доступа и получения жизнеспособного птенца, данный способ неприменим.

2. Способ «Методы экспериментального заражения куриных эмбрионов» [3]. В скорлупе делают два отверстия: одно небольшое над центром воздушной камеры, а другое диаметром 0,2–0,5 см сбоку, со стороны зародыша. Через боковое отверстие на поверхность хорионаллантоисной оболочки наносят инфекционную жидкость и закрывают отверстие кусочком лейкопластыря. При таком способе закрытия дефекта скорлупы возникает проблема вынужденного положения яйца, так как при физиологической ротации яйца лейкопластырь промокает и возникает риск бактериальной обсемененности закрывающего материала,

поскольку пропитывание происходит белком, который является хорошим субстратом для роста бактериальной флоры. Также вынужденное положение яйца (преимущественно вертикально) отрицательно влияет на развитие зародыша – способствует формированию уродств. Большую часть эмбриогенеза органом внешнего дыхания у птиц служит самый наружный внезародышевый листок – хориоаллантаисная оболочка. У кур она образуется на 4-е сутки инкубации за счет срастания хориона и растущего аллантаиса с разветвлением в мезодермальном слое двух хориоаллантаисных артерий и одной вены. С 5-х по 6-е сутки площадь хориоаллантаисной оболочки увеличивается в 10–20 раз [4]. Потеря хориоаллантаисной жидкости вследствие пропитывания «укрывного» материала оказывает отрицательное воздействие на сохранение гомеостаза яйца. Невозможность стерилизации «укрывного» материала значительно повышает риск присоединения бактериальной флоры через «окно» доступа. Вследствие наличия клейкого содержимого на поверхности лейкопластыря при контакте с белковой частью яйца возникает риск отклеивания «укрывного» материала.

Однако представленные выше способы закрытия дефекта скорлупы оплодотворенного яйца при проведении экспериментальных исследований не позволяют осуществлять наблюдение за процессом окончания эмбриогенеза.

#### Цель исследования

Разработать способ закрытия дефекта скорлупы оплодотворенного яйца для проведения экспериментальных исследований на основании анализа анатомо-физиологических параметров завершающегося эмбриогенеза.

#### Материалы и методы исследования

Исследование проводилось в ФГБУ «ННИИТО им. Я.Л. Цивьяна» Минздрава России совместно с Новосибирским Зоопарком имени Р.А. Шило. Работа была одобрена локальным этическим комитетом ФГБУ «ННИИТО им. Я.Л. Цивьяна» Минздрава России (протокол № 006/20 от 10.02.2020).

Эксперимент проводили на фертильных яйцах породы кур – мясная порода бройлеров Росс-308 (ROSS-308), ЗАО Птицефабрика «Ново-Барышевская». В эксперименте было использовано 90 оплодотворенных яиц. Яйца массой 50–70 г инкубировали при температуре 37,5–38<sup>0</sup>С и 50–55% влажности. Вскрывали яйца на 7-й, 13-й и 17-й день инкубации. В экспериментальной группе дефект скорлупы закрывали стерильной силиконовой крышечкой. В группе сравнения были также использованы яйца породы кур – мясная порода бройлеров Росс-308 (ROSS-308), ЗАО Птицефабрика «Ново-Барышевская», но без дефекта скорлупы. Инкубирование эмбрионов проводилось при тех же параметрах. В группе сравнения было 5 яиц.

Применяемый нами способ закрытия дефекта скорлупы оплодотворенного яйца практически восстанавливал физиологические параметры, необходимые для завершения нормального эмбриогенеза зародыша. Поставленная задача решалась тем, что оплодотворенное яйцо размещалось горизонтально зародышем вверх, выполнялось отверстие в скорлупе сбоку со стороны зародыша, проводились анализ и/или обработка зародыша и закрывался дефект скорлупы. Предварительно по изобразительной информации с использованием методов компьютерной графики формировалась трехмерная модель фрагмента скорлупы на 8–15% больше размера будущего отверстия. Моделирование осуществлялось методом послойного наплавления (англ. Fused deposition modeling (FDM)) – использовалась технология аддитивного производства, широко применяемая при создании трехмерных моделей, при прототипировании. Технология FDM подразумевает создание трехмерных объектов за счет нанесения последовательных слоев материала, повторяющих контуры цифровой модели. Производственный цикл начинается с обработки трехмерной цифровой модели. Модель в формате STL делится на слои и ориентируется наиболее подходящим образом для печати. По трехмерной модели изготавливалась форма, в которой отливалась крышка для закрытия дефекта скорлупы из двухкомпонентного силикона для литьевых форм. При изготовлении силиконовой крышечки использовался принтер Picaso 3D Builder.

После выполнения отверстия – создания дефекта в скорлупе – и проведения анализа и/или обработки зародыша закрывали дефект в скорлупе путем наложения на отверстие силиконовой крышки.

В качестве двухкомпонентного силикона может быть использовано высокомолекулярное кремнийорганическое соединение с химической формулой  $[R_2SiO]_n$ , где R = органическая этильная группа  $CH_2-CH_3$ . Органическая этильная группа ( $CH_2-CH_3$ ) в составе данного соединения – двухкомпонентный силикон – обладает нетоксичностью по отношению к биологическим средам с сохранением свойств силикона (инертность), тем самым создавались условия для длительного наблюдения за куриным эмбрионом без нарушения физиологических свойств хориоаллантоисной жидкости.

Для удобства проведения манипуляций целесообразно по изобразительной информации с использованием методов компьютерной графики дополнительно формировать трехмерную модель фрагмента скорлупы с противоположной от будущего отверстия стороны. По трехмерной модели в этом случае изготавливали форму, в которой отливали подложку для яйца из полилактида, яйцо устанавливали на подложке, а затем выполняли отверстие в скорлупе сбоку со стороны зародыша, проводили обработку и/или анализ зародыша и закрывали созданный в скорлупе дефект.

Для реализации поставленной задачи при выполнении эксперимента фертильное куриное яйцо обрабатывали 70%-ным спиртом, укладывали на подложку горизонтально, делали прокол стерильной иглой с вертикальной стороны, далее стерильными хирургическими ножницами делали отверстие размером 1,5x1,5 см, отрезанную скорлупу убирали. Так же удаляли подскорлуповую оболочку. Выполняли манипуляции на курином эмбрионе. После выполнения манипуляций накладывали стерильную силиконовую крышку на дефект в скорлупе и аккуратно разглаживали от отверстия к краям. Оставляли на сутки силиконовой крышкой вверх, после этого было можно ротировать яйцо в соответствии с физиологией развития куриного эмбриона.

Предлагаемая совокупность преимуществ применяемого способа обеспечивала сохранение гомеостаза, позволяла достичь физиологического завершения эмбриогенеза птенца. Используемый способ давал возможность осуществлять длительное наблюдение за развивающимся эмбрионом. Все это полностью исключало риск бактериальной обсемененности при закрытии дефекта доступа (имелись возможность стерилизации силиконовой крышки воздушным методом при 180°C, острым паром в автоклаве при 120–130°C, а также возможность длительного кипячения в воде). Сохранялась возможность переворачивания яйца, исключалась возможность потери хориоаллантаической жидкости (рис).

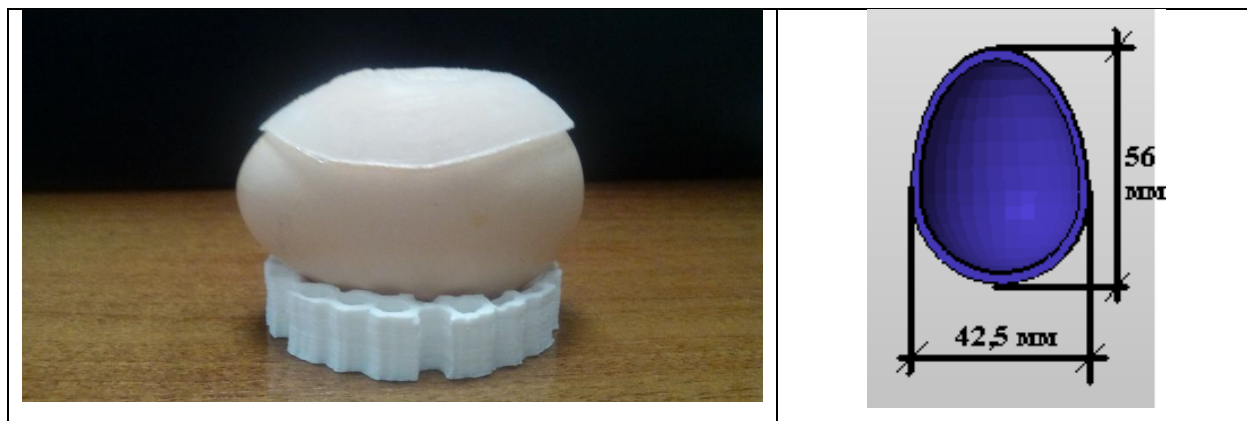
Применяемый способ закрытия дефекта скорлупы оплодотворенного яйца для проведения экспериментальных исследований подтвержден патентом (Патент на изобретение № 2665136 от 28.08.2018) [5].

**Методы статистического анализа.** Настоящее исследование по своему дизайну было спланировано как пилотное эксплораторное гипотезопорождающее исследование в параллельных группах. Учитывая поисковый гипотезопорождающий характер исследования, нулевую гипотезу исследования не формулировали. Для описания показателей, собранных в ходе исследования, была использована только описательная статистика. Для интервальных переменных были рассчитаны среднее значение, стандартное отклонение, минимумы и максимумы, мода, медиана и квартили. Меж- и внутригрупповых сравнений интервальных и номинальных переменных с учетом характера исследования не проводили. Обработку полученных данных осуществляли с использованием программного обеспечения IBM SPSS Statistics v25.0.

### **Результаты исследования и их обсуждение**

При проведении исследования в установленные сроки (7, 13, 17 дней) выполнен анализ анатомических и физиологических параметров эмбрионов экспериментальной группы и группы сравнения на основании классификации Гамбургера–Гамильтона [6].

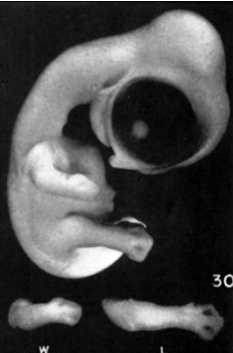


При сравнении анатомо-физиологических параметров (по классификации Гамбургера–Гамильтона) развивающихся эмбрионов экспериментальной группы и группы сравнения каких-либо принципиальных отличий выявлено не было. Для наглядности параметры сравнения представлены в табличном варианте (табл. 1–3).



*Фотография и схема силиконовой крышечки для закрытия дефекта скорлупы оплодотворенного куриного яйца для экспериментальных исследований*

Таблица 1

Сравнительная характеристика анатомо-физиологических параметров куриных эмбрионов на 7-е сутки эмбриогенеза

Анатомо-физиологические параметры	Классификация Гамбургера–Гамильтона (30-я стадия (НН30))	Группа сравнения	Экспериментальная группа
Изобразительная информация			
Вес зародыша	160–200 мг	160–200 мг	160–200 мг
Яичный клюв	Сформирован	Сформирован	Сформирован
Длина позвоночника	1,5–2,0 см	1,5–2,0 см	1,5–2,0 см
Верхние и нижние конечности	Появление различий между крылом и ногой	Появление различий между крылом и ногой	Появление различий между крылом и ногой
Кожный покров	Сформирован	Сформирован	Сформирован

Физиологические параметры (шевеление конечностями)	Спонтанные движения верхними и нижними конечностями	Спонтанные движения верхними и нижними конечностями	Спонтанные движения верхними и нижними конечностями
Имитация дыхательных движений	Самопроизвольные движения грудной клетки	Самопроизвольные движения грудной клетки	Самопроизвольные движения грудной клетки

Таблица 2

Сравнительная характеристика анатомо-физиологических параметров  
куриных эмбрионов на 13-е сутки эмбриогенеза


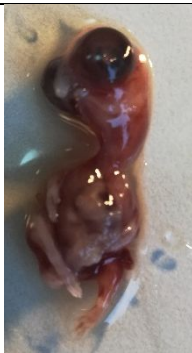



Анатомо-физиологические параметры	Классификация Гамбургера–Гамильтона (37-я стадии (НН37))	Группа сравнения	Экспериментальная группа
изобразительная информация			
Вес зародыша	1,5–2,5 г	1,5–2,5 г	1,5–2,5 г
Яичный клюв	Клюв сформирован полностью	Клюв сформирован полностью	Клюв сформирован полностью
Длина позвоночника	4,5–5,5 см	4,5–5,5 см	4,5–5,5 см
Верхние и нижние конечности	Полностью сформированы	Полностью сформированы	Полностью сформированы
Кожный покров	Отмечается появление зачатков пуха	Отмечается появление зачатков пуха	Отмечается появление зачатков пуха
Физиологические параметры (шевеление конечностями)	Активные движения нижними конечностями	Активные движения нижними конечностями	Активные движения нижними конечностями
Имитация дыхательных движений	Отмечается спонтанная экскурсия грудной клетки	Отмечается спонтанная экскурсия грудной клетки	Отмечается спонтанная экскурсия грудной клетки

Таблица 3

Сравнительная характеристика анатомо-физиологических параметров  
куриных эмбрионов на 17-е сутки эмбриогенеза

Анатомо-физиологические параметры	Классификация Гамбургера–Гамильтона (41-я стадии (НН41))	Группа сравнения	Экспериментальная группа

Изобразительная информация			
Вес зародыша	16–18,5 г	16–18,5 г	16–18,5 г
Яичный клюв	Клюв сформирован полностью	Клюв сформирован полностью	Клюв сформирован полностью
Длина позвоночника	6,5–7,5 см	6,5–7,5 см	6,5–7,5 см
Верхние и нижние конечности	Полностью сформированы	Полностью сформированы	Полностью сформированы
Кожный покров	Кожные покровы полностью покрыты пухом	Кожные покровы полностью покрыты пухом	Кожные покровы полностью покрыты пухом
Физиологические параметры (шевеление конечностями)	Активные движения верхними и нижними конечностями	Активные движения верхними и нижними конечностями	Активные движения верхними и нижними конечностями
Имитация дыхательных движений	Отмечается экскурсия грудной клетки	Отмечается экскурсия грудной клетки	Отмечается экскурсия грудной клетки

### Заключение

В результате проведенного исследования апробирован разработанный авторами способ закрытия дефекта скорлупы оплодотворенного куриного яйца (силиконовой крышечкой). Полученные данные свидетельствуют о физиологическом развитии цыплят экспериментальной группы, что позволяет осуществлять наблюдение за развивающимся птенцом в течение не менее 17 суток. Проведена сравнительная характеристика анатомо-физиологических параметров эмбрионов экспериментальной группы и группы сравнения на основе классификации Гамбургера–Гамильтона, которая не выявила различий в развитии куриных эмбрионов в указанные сроки эксперимента.

### Список литературы

1. Коростышевская И.М., Максимов В.Ф. Как выживает куриный эмбрион после закрытия половины скорлупы? // Онтогенез. 2009. Т. 40. № 2. С. 136-147.
2. Аджаноун Э. Способ анализа и/или обработки оплодотворенного яйца и система для выполнения указанного способа // Патент РФ № 2543263. Патентообладатель ЭГГ-ЧИК ОТОМЕЙТЕД ТЕКНОЛОДЖИЗ (FR); опубл. 27.02.2015, Бюл. № 28.



3. Методы экспериментального заражения куриных эмбрионов. [Электронный ресурс]. URL: [https://studopedia.ru/2\\_122933\\_metodi-eksperimentalnogo-zarazheniya-kurinih-embriionov.html](https://studopedia.ru/2_122933_metodi-eksperimentalnogo-zarazheniya-kurinih-embriionov.html) (дата обращения: 29.09.2020).
4. Dion Giovannone, Blanca Ortega, Michelle Reyes, Nancy El-Ghali, Maes Rabadi, Sothy Sao, Maria Elen, de Bellard. Chicken trunk neural crest migration visualized with HNK1. *Acta Histochemica*. 2015. vol. 117. no 3. P. 255-266. DOI: 10.1016/j.acthis.2015.03.002.
5. Зайдман А.М., Пахомова Н.Ю., Строкова Е.Л., Базлов В.А., Мамуладзе Т.З. Способ анализа и/или обработки оплодотворенного яйца // Патент РФ № 2665136. Патентообладатель ФГБУ «ННИИТО им. Я.Л. Цивьяна» Минздрава России; опубл. 2018.08.28, Бюл. № 25.
6. Hamburger V., Hamilton H.L. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Journal of Morphology*. 1951. vol. 88. no. 1. P. 49-92. DOI: 10.1002/jmor.1050880104.