



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 77745

(13) C2

(51) МПК (2006)
C12N 5/02МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СЕРЕДОВИЩЕ ДЛЯ КУЛЬТИВУВАННЯ ТА ЗБЕРЕЖЕННЯ ЕМБРІОНІВ ССАВЦІВ

1

(21) 20040806485

(22) 03.08.2004

(24) 15.01.2007

(46) 15.01.2007, Бюл. № 1, 2007 р.

(72) Дібіров Магомед Курамагомедович, Тихона
Галина Сергіївна, Хмельков Вячеслав Миколайо-
вич(73) ІНСТИТУТ ТВАРИННИЦТВА УКРАЇНСЬКОЇ
АКАДЕМІЇ АГРАРНИХ НАУК

(56) SU 1713529 A1, 23.02.1992

UA 30345 A, 15.11.2000

RU 2167662 C1, 27.05.2001

RU 2158759 C2, 10.11.2000

RU 2194753 C2, 20.12.2002

RU 2216592 C2, 20.11.2003

RU 2086257 C1, 10.08.1997

Сергеев В.А., Собко Ю.А. Культуры клеток в ветери-
нарии и биотехнологии.- 1970. - С. 67.

2

(57) Середовище для культивування та збережен-
ня ембріонів ссавців, що містить NaCl, Na₂HPO₄,
KH₂PO₄, антимікробний засіб та дистильовану во-
ду, яке відрізняється тим, що додатково містить
екстракт ембріонів жуйних тварин чи курей, а як
антимікробний засіб - сульфацил натрію, при на-
ступному співвідношенні компонентів, на 1 л:

NaCl	8,5-8,7 г
Na ₂ HPO ₄	2,1-2,8 г
KH ₂ PO ₄	0,2-0,4 г
сульфацил натрію	3-5 г
екстракт ембріонів жуйних тварин чи курей	100-200 мл
дистильована вода	до 1,0 л.

Винахід відноситься до області сільського гос-
подарства, зокрема до біотехнології відтворення
ссавців: короткочасне та тривале культивування і
збереження жіночих гамет і ембріонів, отриманих
in vivo та in vitro, що в подальшому можуть бути
використані для прискориення розмноження тва-
рин методом трансплантації.

Для маніпуляцій з ембріонами використовув-
ються середовища Ігла, Хема, TCM 199, а також
фізіологічні сольові розчини такі, як фосфатний
буфер Дюльбекко і розчин Кребса.

Відомі живильні середовища за кількістю ком-

понентів поділяються на прості та складні. Змен-
шення числа компонентів до мінімуму, необхідного
для забезпечення росту і розвитку клітин, привело
до створення так званих мінімальних середовищ,
до яких, насамперед, відноситься мінімальне се-
редовище (MEM), яке запропоновано Іглом. У його
склад входять 13 амінокислот, 8 вітамінів, глюкоза
і 6 неорганічних солей [Сергеев В.А., Собко Ю.А.
Культуры клеток в ветеринарии и биотехнологии. -
Киев: Урожай, 1970].

Склад середовища Ігла (MEM), мг/л:

NaCl	6800,0	L-метіонін	15,0
KCl	400,0	L-фенілаланін	32,0
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	140,0	L-треонін	48,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	200,0	L-триптофан	10,0
CaCl ₂ (безводний)	200,0	L-тирозин	36,0
NaHCO ₃	2200,0	Піридоксаль-HCl	1,0
D-глюкоза	1000,0	Рибофлавін	0,1
L- аргінін	105,0	Тіамін HCl	1,0
L-цистин	24,0	Холінхлорид	1,0
L-гістидин	31,0	Фолієва кислота	1,0
L-валін	46,0	i-інозитол	2,0

(13) C2

(11) 77745

(19) UA

L-глутамін	292,0
L-изолейцин	52,5
L-лейцин	52,4
L-лізін	58,0

Нікотинамід	1,0
D-пантотенат Са	1,0
Феноловий червоний	10,0

Основним призначенням середовища Ігла є використання його для вирощування культур кліток, що використовуються для різних цілей: культивування вірусів і мікроорганізмів, виготовлення вакцин, тривалого культивування культур кліток, що переживаються. У зв'язку з відсутністю спеціалізованих середовищ його також використовують для культивування ембріонів ссавців із внесенням додаткових компонентів, зокрема гонадотропних і гестагенних гормонів. Середовище Ігла дуже чутливе до змін зовнішнього середовища. При контакті з останнім воно утрачає свою первісну біологічну якість: концентрація водневих іонів зростає в кислу сторону. МЕМ є гарним живильним середовищем для розвитку банальної мікрофлори. Крім перерахованих недоліків - це середовище закордонного виробництва, багатокомпонентне і, відповідно, дороге.

Відоме середовище для культивування та короткочасного зберігання ембріонів крупного рогатого скота, основою якого являється буферний розчин Дюльбекко (Інструкція по трансплантации эмбрионов крупного рогатого скота. - Москва, 1987) з концентрацією водневих іонів (рН) 7,05-7,6 і осмотичним тиском - 290-300 МОсм, включає: NaCl; Na₂HPO₄; KH₂PO₄; дистильовану воду, фетальну сироватку й антимікробний засіб (пеніцилін 100000 Од/л).

Склад розчину Дюльбекко, мг/л:	
Натрій хлористий	8,0
Калій хлористий	0,20
Натрій фосфат двох заміщений безводний	1,15
Калій фосфат одно заміщений	0,20
Магній хлористий 6-водний	0,10
Кальцій хлористий безводний	0,10
Глюкоза	1,0
Натрій-піруват	0,036

Розчин Дюльбекко складається з достатнього числа компонентів. Готування цього розчину представляє деяку складність: перераховані компоненти повинні розчинятися тільки в зазначеній нижче послідовності, у противному випадку утворюється важко розчинні опади вуглекислих та фосфорних солей кальцію і магнію. Тому останні розчиняють окремо, а потім ці розчини додають до основної частини, що включає інші компоненти. При стерилізації приготовленого розчину Дюльбекко виникають труднощі з вищевказаної причини, зокрема його не можна стерилізувати будь-яким способом крім фільтрації. Стерилізація автоклавуванням чи радіаційним методом робить розчин непридатним до використання.

Таким чином, багатокомпонентність розчину Дюльбекко, позитивність і складність готування, зміна його якості при стерилізації автоклавуванням і іонізуючим випромінюванням - усе це ускладнює його застосування і відповідно підвищує вартість біоматеріалу.

В усі середовища безпосередньо перед культивуванням і збереженням ембріонів додають 10-

20% фетальної сироватки крові великої рогатої худоби.

Однак дотепер немає єдиної думки про роль сироватки при культивуванні клітинних культур. На думку одних дослідників наявність сироватки у культуральному середовищі служить джерелом не ідентифікованих факторів росту. Інші вчені говорять, що сироватка є джерелом незамінних низько- чи високомолекулярних з'єднань. На нашу думку роль сироватки при культивуванні ембріонів не стільки «трофічна», скільки «ріст стимулююча».

Готування сироваток крові, зокрема фетальної сироватки, є трудомістким і дорогим процесом. Для цього необхідно виконати ряд вимог: одержати кров від телят відразу ж після їхнього народження до прийому першої порції молозива і приготувати сироватку, яку необхідно піддати стерилізації й іспиту. Головним недоліком фетальної сироватки є варіабельність її складу, наявність антитіл, часта контамінація вірусами, мікоплазмами та іншими мікроорганізмами. Окремі серії сироватки мають токсичність.

Таким чином, висока вартість, періодичний дефіцит через труднощі одержання достатнього обсягу з постійним складом і якістю, зниження активності ростового фактору при тепловій інактивації, процес контролю і перевірки кожної серії - все це обмежує можливість використання сироватки для культивування і збереження ембріонів *in vitro*.

В основу винаходу поставлена задача - розробити вітчизняне малокомпонентне середовище для культивування та збереження ембріонів ссавців *in vitro* перед їх пересадкою.

Практика показує, що ряд речовин, що входять до складних середовищ може бути виключені або замінені без збитку для нормального розвитку жіночих гамет при культивуванні їх *in vitro*.

Поставлена задача вирішується тим, що середовище для культивування та збереження ембріонів ссавців, яке включає NaCl; Na₂HPO₄; KH₂PO₄; дистильовану воду, фетальну сироватку й антимікробний засіб (пеніцилін 100 од/мл) і відрізняється тим, що воно містить NaCl - 8,5-8,7; Na₂HPO₄ - 2,17-2,8; KH₂PO₄ - 0,2-0,4; дистильовану воду - 1,0л; замість фетальної сироватки 10-20% екстракту ембріона жуйних тварин чи курей та антимікробний засіб - 3-5г/л сульфатил-натрію.

При складанні рецептури середовища для культивування і збереження ембріонів ми виходили з того, щоб у його склад входила мінімальна кількість компонентів, необхідних для росту і розвитку клітин. За основу середовища для культивування і збереження ембріонів ссавців взяли розчин для вилучення ембріонів [Авторское свидетельство №1713529, 1989, Ф.И.Осташко, М.К.Дибиров, Н.Д.Безуглый], який у подальшому називаємо стабілізований фосфатно-сольовий буфер (СФСБ). Дорогу фетальну сироватку замінили на екстракт ембріона жуйних тварин або курей, тим самим замінили її компоненти («ріст

стимулюючі» фактори, гормони, енергетичні субстрати) на наявні у екстракті. При цьому імітували склад рідини, що оточує клітини *in vivo*, та дотримували принцип «кондиційного середовища».

Після приготування контрольного та розробленого середовищ визначали їх фізико-хімічні показники. Осмотичний тиск вимірювали за допомогою осмометра ОМК ІС-01, який у розробленому середовищі відповідає 328 МОсм та 318-у контрольному. Осмотичний тиск середовищ у досліді і контролі перебілишує припустиму межу (260-310). Однак існують дані, що він може коливатися у межах $\pm 10\%$ без шкоди для клітин. Іономером марки УЭВ-74 визначали рН середовищ, які були 7,7 у дослідного та 7,6 у контрольного. У процесі роботи показники рН коректували до норми (7,2-7,4).

Запропоноване середовище для культивування і збереження ембріонів ссавців складається з NaCl – 8500,0мг; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 2170,0мг; KH_2PO_4 – 200,0мг; екстракту ембріона великої рогатої худоби, вівці, кози або курки – 100,0мл; сульфацил-натрію – 50,0мг та бідистильованої води – 1,0л.

Для одержання екстракту ембріона у тварин після забою відбирали вагітну матку. Потім зовнішню поверхню матки ретельно промивали 0,85%-им розчином хлориду натрію, а місце ін'єкції обробляли 5%-им спиртовим розчином йоду. Після цього матку розташовували на стерильній кюветі та робили прокол голкою з канюлею для відбору амніотичної рідини, робили розріз, через який витягали ембріон.

Екстракт виготовляли з 30-35-ти денного ембріона великої рогатої худоби, 14-20-ти денного ембріона вівці чи кози, 8-10-ти денного курячого ембріона. Ембріон розрізали на маленькі шматочки і гомогенізували при 4-х тис.об./хв. протягом 15 хвилин. Отриману масу змішували порівну зі стерильним 0,85%-им розчином хлориду натрію чи стабілізованим фосфатно-сольовим буфером (СФСБ) і ставили на екстрагування в холодильник при температурі $+4^\circ\text{C}$ на 24-48 годин, а потім центрифугували при 4-х тис.об./хв. протягом 40 і хвилин. Надосадочну рідину відбирали у стерильний поліетиленовий пакет та заморожували при тем-

пературі -20°C протягом 48 годин. Потім екстракт знову відтавали та центрифугували. Відбирали надосадочну рідину і розфасовували її в поліетиленові капсули об'ємом 0,25мл для раціонального використання і виключення контакту з зовнішнім середовищем та зберігали у холодильнику при температурі -20°C . Усі описані вище процедури виконували з дотриманням асептичних вимог. Стерильність отриманого матеріалу визначали шляхом посіву 0,25мл екстракту ембріона на живильні середовища для культивування мікроорганізмів. Перед застосуванням необхідну кількість екстракту повільно розморожували і стерилізували через міліпорові фільтри діаметром 0,45 μm .

Приготовлений екстракт ембріону вносили у СФСБ від 10 до 20% до загального об'єму середовища. Для зручності при використанні та тривалого збереження екстракт ембріона можна ліофілізувати та розфасувати в ампули чи флакони.

У результаті пошукових досліджень підібрано антимікробний препарат -сульфацил-натрію, що володіє широким спектром антимікробної дії та як речовина найбільш прийнятна для роботи з яйцеклітинами й ембріонами. У досліді використовували сульфацил-натрію, що випускається вітчизняною фармацевтичною промисловістю. Були випробувані наростаючі концентрації сульфацил-натрію, що приготовлені на основі фізіологічного розчину, і встановлена його нешкідлива для біооб'єкту та бактерицидна для мікробів концентрація – 30-50мг/л, що була нами використана в подальшій роботі. Токсичність препарату визначали шляхом постановки біопроб на сперміях бугаїв і баранів. Бактерицидні властивості сульфацил-натрію перевіряли шляхом внесення його у контрольне та дослідне середовище з наступним посівом проб на живильні середовища для мікроорганізмів.

Для підтвердження робочої гіпотези, що запропонований екстракт ембріона не уступає за біологічно важливими показниками від фетальної сироватки великої рогатої худоби, були проведені біохімічні дослідження (таблиця 1).

Таблиця 1

Біохімічний склад фетальної сироватки та екстракту ембріона великої рогатої худоби

Імплементор	Білок заг., мг %	Глюкоза, мг %	Холестерин, мг %	Тригліцериди, Ммоль	Піровиноградна кислота	рН	Осмолярність, осм
Фетальна сироватка	4,7 \pm 0,2	185,0 \pm 3,0	43,5 \pm 2,4	сліди	1,6 \pm 0,1	7,3 \pm 0,1	300,2 \pm 5,07
Екстракт ембріона	5,3 \pm 0,1	132,2 \pm 1,2	59,0 \pm 0,1	0,58 \pm 0,01	1,2 \pm 0,4	7,2 \pm 0,1	306,0 \pm 5,08

Бактеріологічний контроль приготовлених середовищ проводили шляхом посіву їх на живильні середовища для мікроорганізмів (МПБ, МПА). Результати досліджень показали, що у контрольному та дослідному середовищі без додавання антисептиків спостерігався ріст мікроорганізмів. При

додаванні у контрольне середовище в якості антисептика пеніциліну у дозі 100000 Од/л, а у дослідне – сульфацил-натрію в концентрації 30-50 мг/л були отримані аналогічні результати (таблиця 2).

Таблиця 2

Бактеріологічний контроль середовищ

Середовище	Ріст мікроорганізмів на живильних середовищах	
	Без антисептиків	З антисептиками
ФБР+10% ЕЕ (дослід)	+	-
ФСБД +10% ФС (контроль)	+	-

*Примітка: ФБР - фізіологічний буферний розчин; ФСБД - фосфатно-сольовий буфер Дюльбекко; ЕЕ - екстракт ембріона; ФС - фетальна сироватка.

Відомо, що при тривалому використанні антибіотиків, зокрема пеніциліну, у мікроорганізмів виробляється стійкість до нього. Крім цього проведені нами дослідження з визначення токсичності антисептиків шляхом біопроб на сперміях бугаїв і

Таблиця 3

Вплив антибіотиків на
переживаність спермій при інкубуванні у
дослідному та контрольному середовищах

Склад середовища	Активність спермій за часом в балах, год. /бал.					
	0	2	4	6	24	48
Дослід						
ФБР+ЕЕ+5 мг/мл СН	7,5	7,0	6,5	6,0	3,0	0,5
Контроль						
ФСБД+ФС+100од/мл П	8,0	7,5	6,0	3,5	0,5	М

баранів показали, що вони у дослідному середовищі зберігали активний рух протягом 48 годин, а у контрольному - 24 годин (таблиця 3).

*Примітка : ФБР- фосфатно-буферний розчин; ЕЕ - екстракт ембріона; СН - сульфацил-натрія; ФСБД - фосфатно-сольовий буфер Дюльбекко; ФС - фетальна сироватка; П - пеніцилін.

У наступних дослідках визначали вплив екстракту ембріона, отриманого від різних видів жуйних тварин, при додаванні його у середовища для розбавлення сперми баранів-плідників у концентраціях від 10 до 20% (таблиця 4).

Таблиця 4

Вплив екстракту ембріонів різних видів тварин
у залежності від його концентрації на показники сперми баранів-плідників

Склад середовища	Якісні показники сперми при її розведенні		
	Рухливість спермій після розведення сперми, бал.	Переживаність спермій (t), год.	Абсолютна виживаність спермій (Sa), ум.од.
1. ФБР+20%ЕЕТ+СН	7,3±0,11	13,3±0,31	65,8±2,24
2. ФБР+10%ЕЕТ+СН	8,0±0	13,6±0,34	69,6±0,67
3. ФБР+20%ЕЕЯ+СН	8,0±0	14,0±0	70,0±2,97
4. ФБР+10%ЕЕЯ+СН	8,0±0	13,6±0,34	67,0±4,58
5. ФБР+20%ЕЕЦ+СН	8,0±0	13,6±0,34	68,3±2,19
6. ФБР+20%ЕЕЦ+СН	8,0±0	14,0±0	74,6±3,41
7. ФСБД+20%ФС+П	8,0±0	13,6±0,34	69,6±0,67

*Примітка: ФБР - фізіологічний буферний розчин; ЕЕТ - екстракт ембріона теляти; ЕЕЯ - екстракт ембріона ягняти; ЕЕЦ - екстракт ембріона цапеняти; ФСБД - фосфатно-сольовий буфер Дюльбекко; ФС - фетальна сироватка; СН -сульфацил-натрія; П - пеніцилін.

Результати досліджень показали, що спермії баранів не чутливі до зміни концентрації ЕЕ від 20 до 10% і виду жуйних тварин, від яких отримано екстракт ембріона. При цьому переживаність (t) і абсолютна виживаність (Sa) спермій у середовищах з додаванням 20; 10% ЕЕ будь-якого виду жуйних тварин змінювалася відповідно від 13,3±0,31; 13,6±0,34; 14,0±0; 13,6±0,34; 13,6±0,34; 14,0±0,0 і 13,6±0,34 год. та 65,8±2,24; 69,6±0,67; 70,0±2,97; 67,0±4,58; 68,3±2,19; 74,6±3,41 і 69,6±0,67 ум.од. й вірогідно не відрізнялася від значень цих показників у контролі.

Найбільш доступним у наших умовах є екстракт ембріона теляти, тому лабораторну перевірку придатності розробленого середовища для культивування та збереження ембріонів проводили з використанням саме цього екстракту у концентрації 10% до загального об'єму середовища. Ефективність запропонованого середовища оцінювали по здатності ембріонів розвиватися in vitro протягом 24-48 годин. Культивування ембріонів проводили за загальноприйнятою методикою. У контролі використовували розчин Дюльбекко з додаванням фабричної фетальної сироватки.

ватки й антибіотиків відповідно до інструкції (Інструкція по трансплантації ембріонів крупного рогатого скота, 1987). Для культивування використовували ембріони великої рогатої худоби та ла-

бораторних тварин (пацюків і мишей) на різних стадіях розвитку, задовільної, гарної і відмінної якості. Результати проведених досліджень наведено в таблиці 5.

Таблиця 5

Вплив імпланенту на розвиток ембріонів ссавців при культивуванні їх *in vitro*

Ембріони	Розвилося ембріонів до наступної стадії			
	ФБР+10%ЕЕТ+СН		ФСБД+10%ФС+П	
	шт.	%	шт.	%
Корів	9/10	90,0±5,21	9/10	90,0±5,21
Пацюків	17/16	98,3±3,12	9/10	90,0±5,21
Мишей	20/19	99,05±1,45	20/18	99,1±1,68

*Примітка: ФБР - фізіологічний буферний розчин; ЕЕТ- екстракт ембріона теляти; ФСБД - фосфатно-сольовий буфер Дюльбекко; ФС - фетальна сироватка; СН - сульфацил-натрію; П - пеніцилін.

Визначено, що як у контрольному, так і дослідному середовищі усі ембріони доімплантаційних стадій відмінної та гарної якості досягли наступної стадії розвитку. Ранні морули задовільної якості як у досліді, так і у контролі дегенерували.

Таким чином, лабораторна перевірка показала, що в якості імпланенту у середовище можна додавати екстракт ембріону в концентрації 10%, незалежно від якого виду жуйних тварин його отримали.

Створення мало компонентного вітчизняного середовища з доступного і більш дешевого ма-

теріалу забезпечує збереженість ембріонів від лабораторних (пацюки, миші) та сільськогосподарських тварин (велика рогата худоба) поза організмом після їх вилучення протягом декількох діб, підвищує санітарний рівень при їх збереженні, дозволяє проводити біотехнологічні роботи з досягненням аналогічного ефекту як при використанні інших середовищ. Має велике прикладне значення в рішенні проблем відтворення та прискореного розмноження сільськогосподарських тварин методом трансплантації ембріонів.