

УДК 591.463.1:57.043.083

Ф.И. Осташко<sup>1</sup>, В.Ф. Осташко<sup>2\*</sup>

## Пути совершенствования сред для культивирования и консервации половых клеток

UDC 591.463.1:57.043.083

F.I. OSTASHKO<sup>1</sup>, V.F. OSTASHKO<sup>2\*</sup>

## Ways To Improve Media for Culturing and Preservation of Sexual Cells

Важнейшая составляющая исследований в области биотехнологии репродукции млекопитающих – совершенствование технологий оплодотворения яйцеклеток *in vitro* и культивирования в лабораторных условиях полученных эмбрионов. Следует отметить, что процент получения полноценных эмбрионов очень низкий, особенно при использовании ооцит-кумулюсных комплексов, выделенных из анатомического материала. При этом установлено, что для более поздних стадий развития эмбрионов процент биологически полноценных клеток меньше. Однако при оплодотворении и созревании эмбрионов до этих стадий *in vivo* процент полноценных эмбрионов, как правило, достаточно высокий.

Можно сделать вывод, что при искусственном культивировании эмбрионы недостаточно обеспечены пластическими материалами, необходимыми для развития органоидов клеток. Это подтверждается тем, что при добавлении в культуральную среду клеток гранулёзы и эпителия яйцевода или эстральной сыворотки результаты улучшаются. В связи с этим целесообразно исследовать проблему с точки зрения особенностей развития эмбрионов на указанных стадиях.

Масса эмбриона в процессе дробления от зиготы до стадий морулы и ранней бластоцисты существенно не увеличивается. Так, геометрический размер эмбриона коровы при его развитии от зиготы до ранней бластоцисты (7–8-й день), когда количество клеток увеличивается от 2 до 130, изменяется от 0,14 до 0,17 мм. Размер экспандированной бластоцисты (приблизительно 130–200 клеток) колеблется в пределах 0,17–0,22 мм, а вытупившейся бластоцисты (200–800 клеток) – 0,2–0,8 мм. Можно ошибочно предположить, что дефицит пластических веществ не является причиной плохого качества эмбрионов. Однако несмотря на незначительный рост массы в процессе развития зиготы или морулы, суммарная площадь поверхности образующихся при дроблении клеток (бластомеров) растёт в арифметической, а затем и в геометрической прогрессии. Следует отметить, что вся поверхность возникших в процессе дробления бластомеров представляет собой вновь образованную цитоплазматическую мембрану. Кроме того, в протоплазме клеток образуются различные органеллы, которые являются мембранными структурами.

Большинство мембран состоит примерно из 40% липидов и 60% белков. По нашим данным [1] на построение липоидной компоненты этого мембранного аппарата

The most important component of research in biotechnology of mammal reproduction is the improvement of *in vitro* oocytes fertilization and embryo culturing in laboratory. It should be noted that the percentage of the derived valuable embryos is very low, especially when using the oocyte-cumulus complexes, derived from anatomic material. It has been established also that for the late stages of developed embryos the percentage of biologically valuable cells is lower. However during *in vivo* fertilization and maturation of embryos the percentage of valuable embryos is usually considerably high.

One may conclude that during artificial culturing the embryos are not essentially provided with plastic materials necessary for development of cell organelles. This is confirmed by the fact that the outcome is improved after adding into cultured medium the granulosa and ovarian tube epithelium cells or estral serum. Herewith it is reasonably to study the problem in terms of the features of embryo growth at these stages.

Embryo mass is not significantly increased during cleavage from zygote to morula stage and early blastocyst. Geometric dimensions of bovine embryo during its development from zygote to early blastocyst (7–8<sup>th</sup> day) when number of cells increases from 2 to 130 change from 0.14 to 0.17 mm. The size of expanded blastocyst (approximately 130–200 cells) ranges from 0.17 to 0.22 mm, and the hatched blastocyst (200–800 cells) is 0.2–0.8 mm. However it would be a mistake one to suppose that deficit of plastic properties is not the cause of poor quality of embryos. This could be explained that when their mass insignificantly increases during zygote or morula grows the total area of surface of formed cells (blastomeres) during fission growth in arithmetic progression and then in geometric one. It should be noted that the whole surface of blastomeres post cleavage is the *de novo* formed cytoplasmic membrane. Moreover in cell protoplasm the various organelles being membrane structures are formed.

The major part of membranes consists of 40% lipids and 60% proteins. Our data [1] show that formation of membrane lipid component requires mainly cholesterol (about 26%), choline plasmalogen (18%), phosphatidylcholine (12%), neutral lipids (15%), ethanolamine plasmalogen (about 10%) and other phosphoglycerides, sphingolipids, glycolipids, lipoproteins and unsaturated fatty acids, the stock of which in yolk layer of mammal zygote is very limited.

The culturing of embryos in artificial media deficient on phospholipids, lipoproteins and unsaturated fatty acids re-

<sup>1</sup>Институт животноводства УААН, г. Харьков<sup>2</sup>Национальный фармацевтический университет, г. Харьков

\* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: ул. Пушкинская, 53, г. Харьков, Украина 61002; тел.:(+380 57) 710-10-21, электронная почта:vasiliy\_ostashko@mail.ru

<sup>1</sup>Institute of Animal Breeding of Ukrainian Academy of Agricultural Sciences, Kharkov, Ukraine<sup>2</sup>National University of Pharmacy, Kharkov, Ukraine

\* To whom correspondence should be addressed: 53, Pushkinskaya str., Kharkov, Ukraine 61002; tel.: +380 57 710 1021, e-mail: vasiliy\_ostashko@mail.ru

затрачиваются главным образом холестерин (около 26%), холинплазмалоген (18%), фосфотидилхолин (12%), нейтральные липиды (15%), этаноламинплазмалоген (около 10%), а также другие фосфолипиды, сфинголипиды, гликолипиды, липопротеины и ненасыщенные жирные кислоты, запас которых в желточном слое зиготы млекопитающих ограничен.

Культивирование эмбрионов в бедных фосфолипидами, липопротеинами и ненасыщенными жирными кислотами искусственных средах приводит к развитию неполноценного мембранного аппарата. Таким образом, важно исследовать искусственные среды, обогащенные специфическими пластическими материалами, для построения мембранных структур клеток эмбрионов.

Предполагаем, что для этого наиболее подходят желток птичьих яиц, а также фрагменты живого трофобласта более поздних стадий развития эмбриона. Фрагменты трофобласта 18-дневных эмбрионов коровы и полученные из них трофобластические фолликулы мы добавляли в культуральную среду. При этом приживляемость эмбрионов значительно повышалась.

Однако при обогащении искусственных культуральных сред компонентами животного происхождения (желток птичьих яиц, различные кровяные сыворотки, фрагменты трофобласта, клетки гранулы и пр.) могут возникнуть нежелательные последствия, обусловленные с наличием в них инфекционных агентов, а также возможной неспецифической иммунной реакцией. Термическая стерилизация этого биологического материала приводит к коагуляции белков, а добавление в них различных антибиотиков не всегда эффективно из-за распространения в природе резистентных к антибиотикам штаммов микроорганизмов. В связи с чем целесообразно провести поиск более эффективных способов стерилизации продуктов животного и растительного происхождения, используемых при культивировании эмбрионов. При стерилизации сред интересно исследовать возможность использования олигодинамического действия ионов некоторых металлов. Например, для исключения антибиотиков и стерилизации разбавителей для спермы быков мы успешно использовали олигодинамическое свойство ионов серебра. При этом отмечено полное сохранение оплодотворяющей способности спермиев.

Кроме того, нам представляется интересным исследовать не только желток птичьих яиц как источник витаминно-микроэлементно-липоидных компонентов, но и сок плодов облепихи крушиновидной (*Hippophae rhamnoides*), который содержит витамины, каротиноиды, органические кислоты, липоиды, сахара, микроэлементы. При добавлении в разбавитель для спермы быка вместо желтка куриного яйца нейтрализованного облепихового сока отмечено положительное влияние на активность и выживаемость спермиев, что свидетельствует о перспективности исследований в этом направлении.

Не менее интересным растительным источником пластических материалов для развития мембранного аппарата клеток являются гидролизаты плодов бобовых (сои, чечевицы, гороха, арахиса), в которых содержится до 37% жировых соединений, богатых липопротеинами, фосфолипидами и ненасыщенными жирными кислотами. Применение экстрактов соевых бобов в качестве заменителя куриного желтка в искусственных средах для культивирования и криоконсервации спермы быков-

sults in development of inadequate membrane apparatus. Thus, it is important to study artificial media, enriched with specific plastic materials for the forming of membrane structures of embryo cells.

We suppose that the yolk of avian eggs and fragments of living trophoblast of late development stage embryos are the most suitable for this. We added into the culturing medium the fragments of trophoblast and its follicles of 18<sup>th</sup> day bovine embryos. In this case the grafting of embryos significantly increased.

However during the enrichment of artificial culturing media with components of animal origin (yolk of avian eggs, various blood serums, fragments of trophoblasts, cells of granulosis etc.) may arise undesirable outcomes caused by the presence of infection agents, as well as non-specific immunologic reactions. Thermal sterilization of this biological material results in protein coagulation, and adding of various antibiotics is not always effective due to natural occurrence of antibiotic resistant microorganism strains. Due to above mentioned we believe that it is reasonable to search the more effective methods of sterilization of animal and plant origin products used for embryo culturing. When studying the medium sterilization it is interesting to investigate the oligodynamic effect of some metal ions. For example, to exclude the antibiotics and sterilization of diluters for bovine sperm we successfully utilized oligodynamic properties of argentum ions. In this case we noted the complete preservation of sperm fertilizing ability.

It was also of interest to study not only yolk of avian eggs as the source of vitamin-microelement-lipoid components, but also the sap of common sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*), containing vitamins, carotenoids, organic acids, lipoids, sugars and microelements. During adding into a diluter of bovine sperm the neutralized sea-buckthorn sap instead of chicken egg yolk the positive effect on sperm activity and survival has been noted, that testifies to the exploitability of such research.

Not least interesting plant source of plastic materials for development of cell membrane apparatus are hydrolyzates of legumes (soya, lentil, pea, ground-pea), containing up to 37% fat compounds, abundant in lipoproteins, phospholipids and unsaturated fatty acids. Application of soya bean extracts as chicken yolk substitute in artificial media for culturing and cryopreservation of bovine sperm enabled to solve the problems of strengthening the membrane apparatus of cells to protect from temperature shock without application of products of animal origin, and enabling safe thermal sterilization and long-term storage of artificial media, being used in current biotechnology [2].

## References

1. Ostashko F.I. Biotechnology of cattle reproduction.— Kiev: Agrarnaya Nauka, 1995.— 183 p.
2. Pavlenko L.N., Pavlenko B.M., Pavlenko M.P. Study of anti-shock effect and sanitary properties of cytoplasmic membrane plant modifiers during bovine sperm preservation // Sci-Tech. Bull. Institute of Breeding of Ukrainian Academy of Agrarian Sciences.— 2008.— N96.— P. 315–323.

Accepted in 20.09.08

производителей позволило решить проблемы фортификации мембранного аппарата клеток для их защиты от температурного шока без применения продуктов животного происхождения, надежной термической стерилизации и длительного хранения искусственных сред, применяемых в современной биотехнологии [2].

### Литература

1. *Осташко Ф.И.* Биотехнология воспроизведения крупного рогатого скота.– Киев: Аграрная наука, 1995.– 183 с.
2. *Павленко Л. Н., Павленко Б.М., Павленко М.П.* Изучение антишокового действия и санитарных свойств растительных модификаторов цитоплазматических мембран при консервации спермы быков // Научно-техн. бюл. Институт животноводства УААН.– 2008.– №96.– С. 315–323.

*Поступила 20.09.08*