УДК 6362.082.453.5

ЗМІНА ОБ'ЄМУ СЕРЕДОВИЩА В КОНТЕЙНЕРАХ ДЛЯ РОЗМІЩЕННЯ СПЕРМІЇВ ТА ЕМБРІОНІВ ТВАРИН У ШИРОКОМУ ДІАПАЗОНІ ШВИДКОСТЕЙ ЗАМОРОЖУВАННЯ

Рецензенти: док-р. б. наук, професор Бугров О.Д.; канд. б. наук Саліна А.С.

Л.В. Горбунов, А.Г. Міщенко, Ю.Г. Черкашина
Інститут тваринництва НААНУ

Запропоновано спосіб визначення зміни об'єму середовища в контейнері, призначеному для розміщення сперміїв та ембріонів тварин, при заморожуванні в широкому діапазоні швидкостей (0,3÷6·103 °С/хв) і прискорень (-474÷+474 °С/хв2). Показано, що при нелінійних режимах заморожування 5% розчину гліцерину до -30 °С відносна зміна об'єму варіює своє значення в діапазоні від (25±16) % до (80±15) %. Визначено, що збільшення концентрації гліцерину від 10 % до 20 % при швидкості заморожування 0,3 °С/хв призводить до зниження величини відносної зміни об'єму від (64,4±5,9) % до (40,7±7,7) % при температурі -35 °С. Встановлено, що відносна зміна об'єму розчину кріопротектора (30 % гліцерину і 20 % сахарози) із використанням швидкості охолодження 6·103 °С/хв становить при заморожуванні (17,1±6,1) %.

Ключові слова: **розчин кріопротектора, спермії бугая, ембріони, заморожування, дилатометрія, відносна зміна об'єму, кристалоутворення**.

До нині існує два альтернативні напрями кріоконсервування статевих клітин і ембріонів тварин, основаних на повільному й швидкому охолоджуванні. У свою чергу, повільний спосіб охолоджування реалізується за рахунок застосування лінійних і нелінійних швидкостей, а швидкий - високих і надвисоких. При цьому рівень збереження деконсервованого матеріалу становить від 30% до 60 % для сперміїв бугаїв та 60-80 % для ембріонів тварин [1-3]. Основними причинами зниження збереженості біооб'єкта є ріст поза- і внутрішньоклітинних кристалів [1-5]. При повільному охолоджуванні біооб'єкта це явище супроводжується згубною дією на клітини ліотропного ефекту [5], а при швидкому - гідродинамічного удару [6-7].

На цей час були спроби визначення зміни об'єму розчинів кріопротекторів при кріоконсервації [8-10]. Так, були отримані абсолютні значення зміни об'ємів розчинів гліцерину при заморожуванні в діапазоні температур (0÷-196) °С [8], але існуючі способи визначення росту кристалів не дають можливості одержати необхідну інформацію щодо впливу цього чинника на збереженість біологічного матеріалу в контейнерах, призначених для його заморожування, особливо при високих швидкостях. Розробка способу визначення відносної зміни об'єму (ВЗО) середовища, що містить біооб'єкт при заморожуванні з використанням вимірювального капіляру малого діаметра, дає можливість вивчити механізми кріопошкодження сперміїв та ембріонів тварин і способи їх захисту, що дасть змогу об'єднати переваги існуючих альтернативних напрямів кріоконсервування біооб'єкта.

Мета роботи - розробка способу та визначення відносної зміни об'ємів середовища в контейнері, призначеному для розміщення сперміїв та ембріонів тварин при його повільному і швидкому заморожуванні.

Матеріали та методи досліджень. На дослідження ставилися розчини гліцерину і сахарози з концентрацією від 5 % до 30 % та 20 % відповідно.

Біологічним об'єктом служили спермії бугаїв-плідників, які належать експериментально-методичному племпідприємству ІТ НААНУ. Взяття, оцінку якості, розбавлення і підготовку сперми до заморожування проводили за Харківською технологією [11].

Охолоджування розчинів із низькими швидкостями (υ=0,3÷50 °С/хв) із використанням пробірки Уленгута до кінцевої температури –35 °С і прискореннями (А=-474÷+474 °С/хв^2) із використанням пластикового контейнера з ініціюючим стержнем до кінцевої температури –30 °С здійснювали в пристрої, основаному на пасивному охолоджуванні термоблока в горловині посудини Дьюара [12]. Заморожування розчинів кріопротекторів з високими швидкостями (υ=60÷6·103 °С/хв) проводили за допомогою прямого занурення пластикової соломинки в рідкий азот. Відносну зміну об'єму (ВЗО) досліджуваних розчинів у контейнерах, призначених для розміщення сперміїв і ембріонів тварин при заморожуванні, визначали за допомогою дилатометричного методу [13], модифікованого в ході проведення дослідження. Кількість вимірів дорівнювала 5±2. Температуру середовища вимірювали опосередкованим способом [14] хромель-копелевою термопарою з діаметром вимірювальної голівки 0,3 мм. Режим зниження температури реєстрували за допомогою графобудівника Н-307. Статистичне опрацювання отриманих результатів проводили за допомогою загальноприйнятих методів [15].

Застосування дилатометричного методу, як показано в роботі [13], супроводжується різними чинниками, такими як зміна об'єму контейнера і складових частин середовища з біооб'єктом, що впливає на величину зміни об'єму досліджуваного зразка. Тому для виключення вищезгаданих чинників нами застосовувалися відносні показники зміни об'єму середовища при його охолоджуванні. Для визначення ВЗО середовища в контейнері, що містить біооб'єкт, запропоновано спосіб, застосований при повільному (рис. 1а) і швидкому охолоджуванні (рис. 1б). Для збільшення точності визначення ВЗО використовували вимірювальний капіляр (2) з малим діаметром (d=0,15 мм).

Показником ВЗО розчину (5) у контейнері (4) при заморожуванні в горловині посудини Дьюара (рис. 1а) або безпосередньо в рідкому азоті (рис. 1б) є величина ΔL (формула 1), яка фіксується у вимірювальному капілярі (2) за допомогою градуйованої шкали (1):

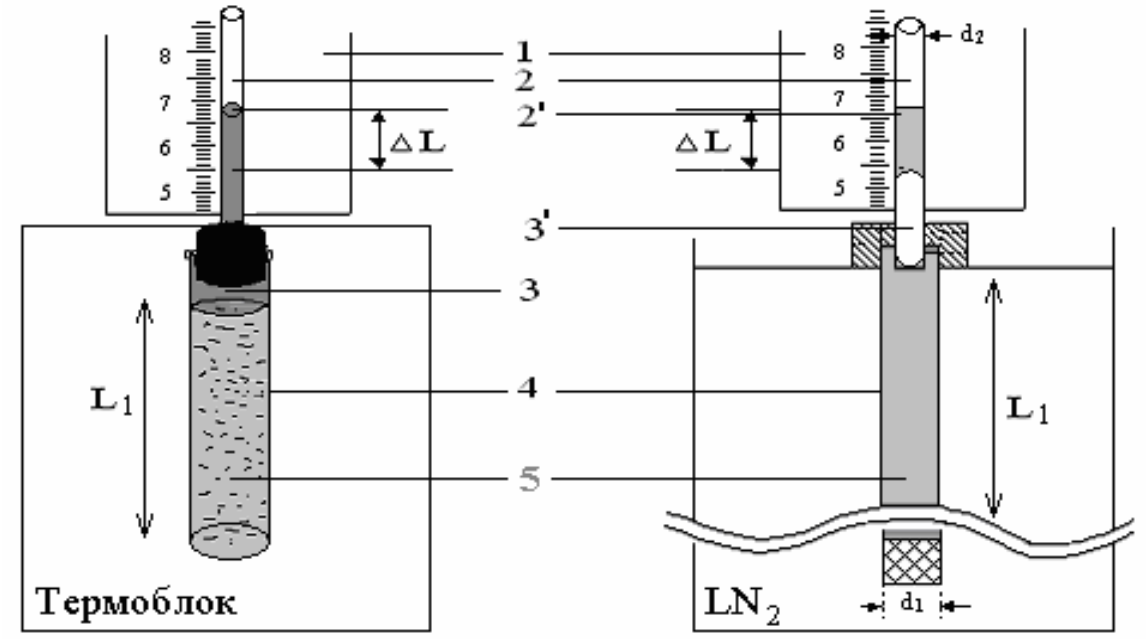
$$\Delta L = L2 - L1 , \qquad (1)$$

де ***L1, L 2*** – показники на градуйованій шкалі до та після заморожування досліджуваного розчину, мм.

При такому способі вимірювання запропонована формула (2), що необхідна для визначення ВЗО досліджуваного розчину при заморожуванні:

$$V' = \frac{\Delta l_a}{\Delta l_я} \cdot 100\ \% \ , \qquad (2)$$

де *Δla, Δlя* – різниця між висотою стовпця у вимірювальному капілярі до і після заморожування досліджуваного розчину й розчинника (дистильованої води) відповідно.



а) б)

Рис. 1. Принципова схема способу вимірювання об'єму досліджуваного середовища при повільному (а) і швидкому (б) заморожуванні.

Такий підхід вимагає дотримання умов, за яких початковий ступінь заповнення L1 контейнера (4) досліджуваним розчином (кріопротектором) і розчинником (як контроль використовували дистильовану воду) має бути строго однаковим. Також необхідно застосовувати вимірювальний капіляр із діаметром d2 як можна меншим, ніж у контейнера з досліджуваним середовищем d1, оскільки показник збільшення чутливості (точності) визначення ВЗО прямо пропорційний співвідношенню d1:d2.

Відмінність вимірювань ВЗО при низьких і високих швидкостях заморожування (рис. 1а і 1б) полягає в середовищі (3 і 3’), яке відокремлює досліджуваний розчин у контейнері від рідини, що заповнена у вимірювальному капілярі, зміна положення якої є показником величини об'єму розчину при його заморожуванні. При повільному заморожуванні (рис. 1а) верхня частина контейнера зі зразком (5) заповнюється маслом (3), а при швидкому (рис. 1б) - між капілярами (2) і (4) розташовано повітряний пухирець (3’) для того, щоб не відбувалося взаємодії між досліджуваним розчином і спиртом (2’).

Результати досліджень. Попередні досліди показали, що при лінійній швидкості заморожування сперміїв бугая (30 °С/хв) збереженість деконсервованного матеріалу становила (43,3±2,4) %, тоді як із додатним і від'ємним прискоренням ±173 °С/хв^2 - ця величина становила (47,5±2,5) % і (23,7±2,3) % відповідно. Отримані результати різниці показників збереження вказують на необхідність вивчення ВЗО розчинів, що містять біооб'єкт, при прискорених режимах заморожування.

За допомогою запропонованого способу визначено вплив величини і знаку прискорення в діапазоні від -474 до +474 °С/хв^2 на ВЗО 5% розчину гліцерину, необхідного для заморожування сперміїв бугая, при середніх швидкостях заморожування 10, 30 і 50 °С/хв до температури -30 °С (рис. 2).

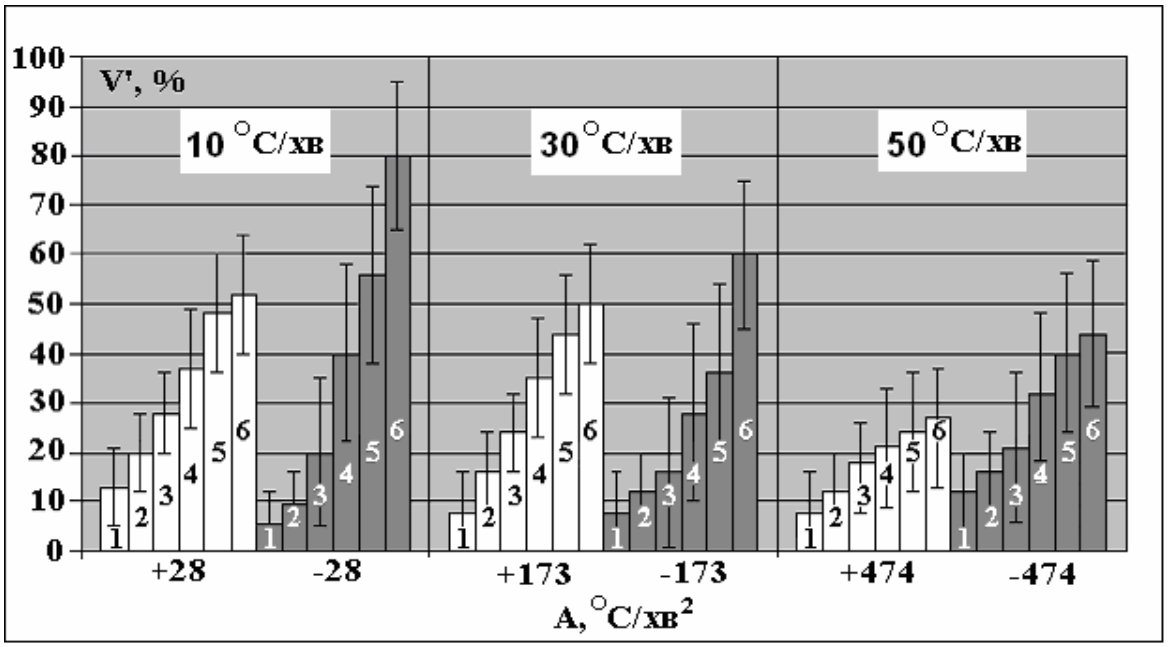


Рис. 2. Залежність ВЗО V′ 5% розчину гліцерину від величини і знаку прискорення зниження температури при середніх швидкостях заморожування 10, 30 і 50 °С/хв; 1, 2,..., 6 – діапазон температур від -5 °С до -30 °С з кроком 5 °С.

З рис. 2 видно, що при прискоренні ±28 °С/хв^2 ВЗО розчину з додатним знаком прискорення на 29 % вище, ніж з від'ємним, при прискоренні ±173 °С/хв^2 - на 22 %, а при ±474 °С/хв^2 - ця величина скорочується до 19 %. Отримані результати показують, що величина і знак прискорення в процесі заморожування значно впливають на ВЗО охолоджуваного середовища. Так, при нелінійних режимах заморожування 5% розчину гліцерину в діапазоні від -474 до +474 °С/хв^2 ВЗО розчину може змінювати своє значення від (25±16) % до (80±15)%, що ймовірно є причиною зміни показника збереження сперміїв бугая.

Результати, отримані нами раніше [16], показують, що максимальне збереження ембріонів миші 78÷80 % після відтавання одержана при використанні 10% розчину гліцерину при швидкості охолоджування 0,3÷0,6 °С/хв у температурному діапазоні від -5 °С до -25 °С. При збільшенні швидкості від 0,8 °С/хв до 3,3 °С/хв показник збереження знижується від 75 % до 57 % (P=0,95).

Тому для визначення впливу швидкості заморожування від 0,3 °С/хв до 5 °С/хв на величину ВЗО 10%, 15% і 20% розчину гліцерину в діапазоні критичних температур -5÷-35 °С одержані наступні дані (табл. 1).

1. Вплив швидкості охолоджування і концентрації гліцерину на ВЗО (V′) середовища в пробірці Уленгута (n=3)

Швидкість заморожування υ, °С/хв	Відносна зміна об'єму V′, % (M±m)		
	Концентрація гліцерину С, %		
	10	15	20
0,3	64,4±5,9	55,9±6,6	40,7±7,7
1,0	62,9±6,1	54,2±6,8	43,3±7,5
5,0	62,7±6,2	52,5±7,0	47,5±7,2

При заморожуванні 10% розчину гліцерину до кінцевої температури -35 °С ВЗО приблизно однакова при усіх трьох швидкостях охолодження. Очевидно, що ВЗО не є причиною зниження збереження деконсервованих ембріонів миші при збільшенні швидкості заморожування до 5 °С/хв. Збільшення концентрації гліцерину від 10 % до 20 %, призводить до значного зниження ВЗО від (64,4±5,9) % до (40,7±7,7) % відповідно.

Встановлено, що швидкість охолоджування є непрямим чинником, який визначає інтенсивність росту кристалів, а концентрація кріопротектора, у свою чергу, значно впливає на позаклітинне кристалоутворення. Причиною зниження збереження ембріонів, ймовірно, є не механічна дія зростання кристалів, а недостатній ступінь дегідратації клітин при збільшенні швидкості їх охолоджування.

У ході проведення роботи [6] емпірично встановлено, що при охолодженні за допомогою високих швидкостей спостерігається різка зміна об'єму середовища, що містить біооб'єкт. У деяких випадках розширення середовища, що охолоджується, призводить до механічного руйнування контейнера і, як наслідок, загибелі ембріонів миші при використанні швидкості заморожування 6,24·103 °С/хв і концентрації кріопротектора 30 % гліцерину і 20 % сахарози. Також було встановлено [6], що зменшення об'єму середовища в контейнері дає змогу збільшити збереження деконсервованих ембріонів миші. Як контейнер використовували пластикові соломини діаметром 1,0 мм, що заповнювали кріозахисним середовищем, яке містить біооб'єкт, на 95 % (традиційний спосіб заповнення соломин) і 10 % від загального об'єму контейнера. Рівень збереження деконсервованих ембріонів миші становив (77,1±6,6) % (n=35) і (87,5±5,2) % (n=40), відповідно.

Тому на наступному етапі роботи нами вивчені кількісні значення ВЗО розчинів гліцерину і сахарози, одержані при високих швидкостях заморожування і концентраціях кріопротектора (табл. 2).

2. ВЗО (V′) розчину гліцерину і сахарози при його швидкому заморожуванні у пластиковій соломині (n=±5)

Швидкість заморожування υ, °С/хв	**Відносна зміна об'єму V′, % (M±m)**		
	Концентрація кріопротектора С, %		
	10 % гліцерину і 20 % сахарози	**20 % гліцерину і 20 % сахарози**	**30 % гліцерину і 20 % сахарози**
60	-	-	79,6±4,5
1800	83,8±4,0	67,1±5,7	23,0±5,7
6000	78,0±4,7	23,0±8,7	17,1±6,1

Використовуючи запропонований дилатометричний спосіб (рис.1б), встановили, що ВЗО розчину кріопротектора, що складається з 30 % гліцерину і 20 % сахарози, при використанні швидкості заморожування 6·103 °С/хв, становить (17,1±6,1) %. У свою чергу, використання розчину криопротектора, що складається з 10 % гліцерину і 20 % сахарози, призводить до збільшення величини ВЗО до (78,0±4,7) %.

Таким чином, низькі швидкості заморожування з позитивним і негативним прискоренням приводять до значної зміни ВЗО середовища і збереження сперміїв бугая, що вірогідно пов'язане з механічною дією росту кристалів на клітини. Тоді як, при заморожуванні ембріонів миші, на показник збереження значно впливає

тільки концентрація кріопротектора. Ймовірно, на збереження ембріонів впливає не механічна дія кристалів льоду, а ступінь зневоднення клітин. При високих швидкостях заморожування ембріонів зміна об'єму середовища призводить до зниження їх збереження, що обумовлене гідродинамічним ударом.

Вважаємо, що дослідження зміни об'єму середовища, що містить біооб'єкт у процесі кріоконсервації в широкому діапазоні швидкостей заморожування може бути основою для створення способу кріоконсервування біологічного матеріалу, який дасть змогу об'єднати переваги існуючих альтернативних методів, що сприятиме значному зниженню рівня втрат деконсервованого біооб'єкта. Отримані результати є передумовою отримання високого збереження біологічного матеріалу, що основане на комплексному вивченні кінетики росту позаклітинних кристалів, процесів зневоднення клітин і гідродинамічного удару, з урахуванням ефекту їх сумісної взаємодії.

Висновки:

Розроблено спосіб визначення відносної зміни об'єму середовища у контейнерах, призначених для розміщення сперміїв і ембріонів тварин при заморожуванні, з використанням вимірювального капіляру малого діаметра, що сприяє збільшенню точності отримання цієї величини до 10 разів.

Запропонований спосіб визначення відносної зміни об'єму може бути застосований у широкому діапазоні швидкостей від 0,3 до 6·103 °С/хв, прискорень ±474 °С/хв^2 зниження температури та концентрацій досліджуваних розчинів кріопротекторів від 5% до 50%.

Встановлено, що знак прискорення не впливає на величину відносної зміни об'єму 5% розчину гліцерину, а температура заморожування, в свою чергу, призводить до значимого впливу на цю величину (варіює від 7±5% до 80±15%). Показано, що при нелінійних режимах заморожування 5% розчину гліцерину до кінцевої температури – 30 °С величина відносної зміни об'єму варіює в діапазоні від (25±16) % до (80±15) %.

Встановлено, що збільшення швидкості охолоджування від 0,3 °С/хв до 5 °С/хв не впливає на відносну зміну об'єму досліджуваних растворів гліцерину.. Визначено, що збільшення концентрації гліцерину від 10 % до 20 % при швидкості заморожування 0,3 °С/хв, призводить до зниження відносної зміни об'єму від (64,4±5,9) % до (40,7±7,7) % відповідно.

Встановлено, що відносна зміна об'єму розчину кріопротектора, що складається з 30 % гліцерину і 20 % сахарози, при використанні швидкості охолодження 6·103 °С/хв, становить при заморожуванні (17,1±6,1) %.

Бібліографічний список

1. Белоус А.М. Криоконсервация репродуктивных клеток / А.М. Белоус, В.И. Грищенко, Ю.С. Паращук. – К.: Наукова думка, 1986. – 205 с.

2. Осташко Ф.И. Глубое замораживание и длительное хранение спермы производителей / Ф.И. Осташко. – К.: Урожай, 1978. – 255 с.

3. Горбунов Л.В. Криоконсервация половых клеток и эмбрионов животных / Л.В. Горбунов, Л.П. Бучацький. – К.: Киевский университет, 2005. – 325 с.

4. Leibo S.P. Nucleation temperature of intracellular ice formation in mouse embryos / S.P. Leibo //Cryobiology. - 1976. - N13. - P.646.

5.Гордиенко Е.А. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий / Е.А. Гордиенко, Н.С. Пушкарь. – К.: Наукова думка, 1994. – 142 с.

6.Морозова И.А. Влияние объемного расширения среды, содержащей биообъект, на сохранность деконсервированных половых клеток и эмбрионов животных при сверхвысоких скоростях замораживания / И.А. Морозова, Н.И. Горбунова, Л.В. Горбунов //Рибне господарство. – К.: Аграрна наука. - 2002. – Вип. 61.- С. 37-41.

7.Осташко Ф.И. Биотехнология воспроизведения крупного рогатого скота / Ф.И. Осташко. – К.: Аграрная наука, 1995. – 182 с.

8.Бугров О.Д. Розробка теорії та практики кріоконсервації сперми бугаїв-плідників: дис…докт. біол. наук: 03.00.13 «фізіологія людини та тварин» /Бугров О.Д. - Харків, 1983. - 478 с.

9.Виноград-Финкель Ф.Р. Биофизика / Ф.Р. Виноград-Финкель, Л.А. Разумова, С.Н. Кудряшова. - 1960. - № 2. - С. 229-231.

10. Вишневский В.И. Криомикроскопия растворов, содержащих глицерин или полиэтиленоксид / В.И. Вишневский, Ю.В. Калугин //Молочно-мясное скотоводство. - 1971. - № 26. - С. 31-34.

11. Харьковская технология асептического взятия и криоконсервации спермы быков-производителей: Методические рекомендации (под ред. проф. Ф.И. Осташко). – Харьков, 1990. – 47 с.

12. Пат. 60161А Україна, МКІ F 25 D 3/10. Установка для заморожування біологічних об’єктів та спосіб ініціації кристалоутворення в кріозахисному середовищі / Л.В. Горбунов, В.І. Кабачний, Т.С. Антоненко, Н.І. Горбунова, Т.О. Томаровська; Національна фармацевтична академія України. - №2003021337; Заявл. 14.02.2003; Опубл. 15.09.2003; Бюл. №9.- 2 с.

13. Александров Ю.И. Точная криометрия органических веществ / Ю.И. Александров. – Л.: Химия, 1975. – 160 с.

14. Горбунов Л.В. Контроль температуры и скорости её изменения в среде, содержащей биообъект / Л.В. Горбунов //Проблемы криобиологии. - 2002.- №1.- С. 32-38.

15. Лакин Б. Ф. Биометрия / Б.Ф. Лакин. - Москва: Высшая школа, 1990. - 254 с.

16. Горбунов Л.В. Изучение влияния изменения скорости замораживания на сохранность эмбрионов млекопитающих / Л.В. Горбунов, Т.С. Антоненко, Н.Д. Безуглый //Проблемы криобиологии. – 2001.- №4.- С.36-42.

ИЗМЕНЕНИЕ ОБЪЕМА СРЕДЫ В КОНТЕЙНЕРАХ ДЛЯ РАЗМЕЩЕНИЯ СПЕРМИЕВ И ЭМБРИОНОВ ЖИВОТНЫХ В ШИРОКОМ ДИАПАЗОНЕ СКОРОСТЕЙ ЗАМОРАЖИВАНИЯ

Горбунов Л.В., Мищенко А.Г., Черкашина Ю.Г., ИЖ НААНУ

Предложен способ определения изменения объема среды в контейнере, предназначенном для размещения спермиев и эмбрионов животных, при замораживании в широком диапазоне скоростей (0,3÷6·103 °С/мин) и ускорений (-474÷+474 °С/мин2). Показано, что при нелинейных режимах замораживания 5% раствора глицерина до -30 °С относительное изменение объема варьирует в диапазоне от (25±16) % до (80±15) %. Определено, что увеличение концентрации глицерина от 10% до 20 % при скорости замораживания 0,3 °С/мин приводит к снижению величины относительного изменения объема от (64,4±5,9) % до (40,7±7,7) % соответственно при температуре -35 °С. Установлено, что

относительное изменение объема раствора криопротектора (30 % глицерина и 20 % сахарозы) с использованием скорости замораживания 6·103 °С/мин, составляет (17,1±6,1) %.

Ключевые слова: раствор криопротектора, спермии быка, эмбрионы, замораживание, дилатометрия, относительное изменение объема, кристаллообразование.

MEDIUM VOLUME SWAP IN THE REFRIGERATED TANK DURING WIDE FREEZING VELOCITY SPECTRUM OF SPERMATOZOA AND EMBRYOS

Gorbunov L., Mishchenko A., Cherkashina Yu.,Institute of animal science, NAASU

This article highlights the experimental research results on medium volume swap in the refrigerated tank during wide freezing velocity spectrum of spermatozoa and embryos. Medium volume swap evaluation method in the refrigerated tank was elaborated for the wide velocity range (0,3÷6x10³◦S/min) and acceleration (-474÷+474ºS/min²). Non-linear freezing regime of 5% glycerol dilution proved to be varied from 25 ±16% to 80±15%. Percentage indicates relative medium volume swap. Glycerin was frozen up to -30ºC. Glycerol concentration increase observed to abate relative medium volume from 64,4±5,9% to 40,7±7,7% under -35ºC thermal regime. Glycerol concentration was upped from 10% to 20% under 0,3ºS/min freezing velocity regime. Relative volume swap of freezing protector dilution forms 17,1±6,1% by freezing. Freezing protector includes 30% glycerol and 20% beet sugar. Cooling velocity constitutes 6 x 10³◦S/min.

Key words: freezing protector dilution, servicing bull, spermatozoa, embryos, freezing, dilation measurement procedure, relative volume swap, crystal formation.