

СПОСІБ ІНІЦІАЦІЇ КРИСТАЛІВ ПРИ ЗАМОРОЖУВАННІ СПЕРМІЇВ БУГАЇВ

А.Г. Міщенко, Л.В.Горбунов
Інститут тваринництва УААН

Представлено способи ініціації росту кристалів з метою мінімізації величини викиду схованої теплоти кристалізації. Показано, що при ініціації росту кристалів схоронність деконсервованих спермій збільшується на $10\pm 5\%$.

спермії бугая, кріоконсервація, схована теплота кристалізації, ініціація кристалів

Аналіз літературних даних показує, що показники схоронності деконсервованих спермій тварин у закордонних дослідників вищі, ніж у вітчизняних [1-2]. Однією з імовірних причин цього може бути відсутність способу ініціації в існуючих в Україні технологіях заморожування спермій сільськогосподарських тварин.

При швидкості теплообміну $0,3\text{ }^{\circ}\text{C/хв}$ спонтанне виділення схованої теплоти кристалізації спостерігається у діапазоні температур від -7 до $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$ при заморожуванні ембріонів корови [3], що у свою чергу впливає на величину схоронності деконсервованого об'єкта [1-2]. Режим заморожування для спермій риби [4] значно відрізняється від режиму для статевих клітин бугая тим, що він визначається ступінчастим охолодженням з метою мінімізації згубної дії виділення схованої теплоти кристалоутворення. У роботі [5] показано, що викид захованої теплоти кристалізації не має суттєвого впливу на збереженість деконсервованого матеріалу. Вважаємо, що причиною такого висновку є помилка вибору способу реєстрації температури, при якому сам термодатчик ініціює ріст позаклітинних кристалів льоду.

Вважаємо, що виділення схованої теплоти кристалізації може значимо впливати на схоронність спермій тварин; це пов'язано з роботою [6] про те, що клітини спермій мають високу чутливість до температурного шоку не тільки у плюсових температурах, але й у мінусових.

Метою роботи було дослідження впливу ініціації росту кристалів на схоронність деконсервованих спермій бугая.

Матеріали і методи дослідження. Як контейнери для досліджуваного розчину використовували пластикові соломинки з діаметром 2 мм і пробірки об'ємом 1 мл. Ініціацію росту кристалів проводили за розробленою у ході дослідження методикою за допомогою розташування сталевих стрижнів різного діаметра і форми у досліджуваному розчині. У роботі використовували метод пасивного остигання термоблока, виготовленого з іржостійкої сталі, у горловині посудини Дьюара Х-34 [7]. Температуру зразка вимірювали хромель-копелевою термопарою (ХК – $d = 0,2\text{ мм}$.), відкаліброваною з точністю до $0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ термодатчиком, що входить у комплект заморожувача "Minicool". Режим зниження температури реєстрували за до-

помогою графопобудівника Н-307. Вимірювання температури здійснювали у першому випадку за допомогою розташування головки термопари у досліджуваному розчині, а у другому - поруч із зовнішньою стінкою контейнера, що містить біооб'єкт. При опрацюванні показників температур процесу кристалізації застосовували оцінку варіювання ($\pm t\sigma$), яка виражає розкид вимірюваних величин [8].

Об'єктом дослідження була нативна сперма бугаїв-плідників червоно-рябої української молочної породи, що належить племпідприємству Інституту тваринництва УААН. Узяття і розрідження сперми проводили за Харківською технологією [2]. Відтавання контейнерів зі спермою проводилося у водяній бані при температурі 40 °С. Активність спермій визначалася окомірним способом та за допомогою методу відеофіксації. Число досліджень у кожному з експериментів становило 7. Отримані результати статистично опрацьовано за загальноприйнятими методами.

Результати досліджень. Як показано у роботі [9], при заморожуванні спермій бугая викид схованої теплоти кристалізації впливає на характер змінювання швидкості (прискорення) процесу охолодження. Це, у свою чергу, може бути причиною зниження схоронності деконсервованого матеріалу при температурному шокові. Для перевірки цієї гіпотези спермій бугая заморозили за методикою, розробленою для ембріонів [10] у соломинках з пухирцем з метою виключення викиду схованої теплоти кристалізації. При оцінці розмороженої сперми з'ясувалося, що схоронність спермій з ініціацією росту кристалів виявилась вищою на $10 \pm 5\%$. Однак застосування соломинок як контейнерів для заморожування спермій тварин має ряд недоліків: обмеження об'єму біоматеріалу ($V < 150$ мкл), тому що знизу пухирця повинне знаходитися середовище без біооб'єкта. Збільшення об'єму соломинок спричиняє і збільшення їхнього діаметра, та, як наслідок, неможливість створення пухирця зі змоченими стінками. Щоб виключити ці недоліки методу, ми застосували інший вид контейнера для заморожування спермій і спосіб ініціації росту кристалів.

На початковому етапі дослідження поставлена задача вибору способу реєстрації температур при виділенні схованої теплоти кристалоутворення, який би не робив свого впливу на ріст кристалів при заморожуванні досліджуваного розчину. У першому випадку головку термопари поміщали у верхній шар розчину (рис. 1а). Такий спосіб реєстрації застосовувався з метою мінімізації впливу на ріст кристалів самою термопарою, тому що імовірність кристалізації значно збільшується у нижній частині контейнера через відносно великий градієнт температури у термоблоці (1 °С/см). Однак досліди показали, що навіть у такому положенні термодатчика, що реєструє температуру і її зміну, відбувається його вплив на процес росту кристалів, як і будь-якої неоднорідності, що знаходиться у досліджуваному середовищі. Для того щоб виключити вплив елементів, що реєструють температуру процесу кристалізації розчину, вимірювальну головку термопари зафіксували поблизу зовнішньої стінки контейнера (рис. 1б). Термоізоля-

ційну оболонку (4) застосовували з метою підвищення чутливості термодатчика до викиду схованої теплоти кристалоутворення.

Запропоновано ряд способів ініціації росту кристалів, які полягають у включенні у нижню частину контейнера елементів неоднорідності у виді сталевих стрижнів з різними діаметрами (0,2 і 1 мм) і формою. Необхідність змінювання діаметра стрижнів викликана впливом цього фактору на інтенсивність теплопроводу, а загострену форму стрижня (голкоподібна) підбирали з урахуванням того, що імовірність ініціації зростає, коли величина розміру неоднорідності порівняна з розміром зростаючого зародка кристала.

Для визначення ступеня росту кристалів використовувався ряд критеріїв: швидкість теплообміну - B ($^{\circ}\text{C}/\text{хв}$), температура початку росту кристалів - T ($^{\circ}\text{C}$), діапазон температури між початком росту і точкою депресії, ΔT ($^{\circ}\text{C}$), а також фактори, що зумовлюють їхній розкид (критерій Стюдента та середньоквадратичне відхилення).

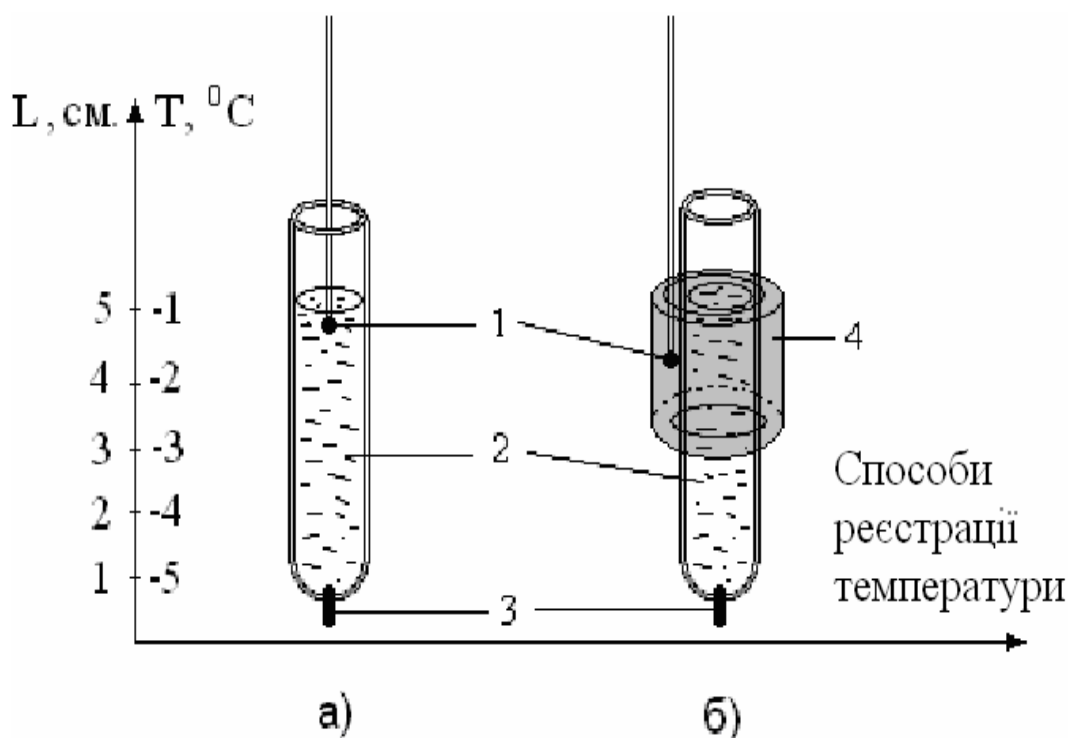


**Рис. 1. Схематичне зображення способів реєстрації температури досліджуваного розчину в контейнерах у термоблоці з градієнтом $1^{\circ}\text{C}/\text{см}$:
 1 - вимірювальна головка термопари, 2 - досліджуваний розчин,
 3 - сталевий стрижень, 4 - термоізоляційна оболонка.**

Експериментальні дані, отримані у ході дослідження (табл.1), відображені на гістограмах (рис.2 і 3), свідчать, що найбільш значимо на сидінг впливають наявність металевого стрижня, швидкість теплообміну, а також спосіб реєстрації температури.

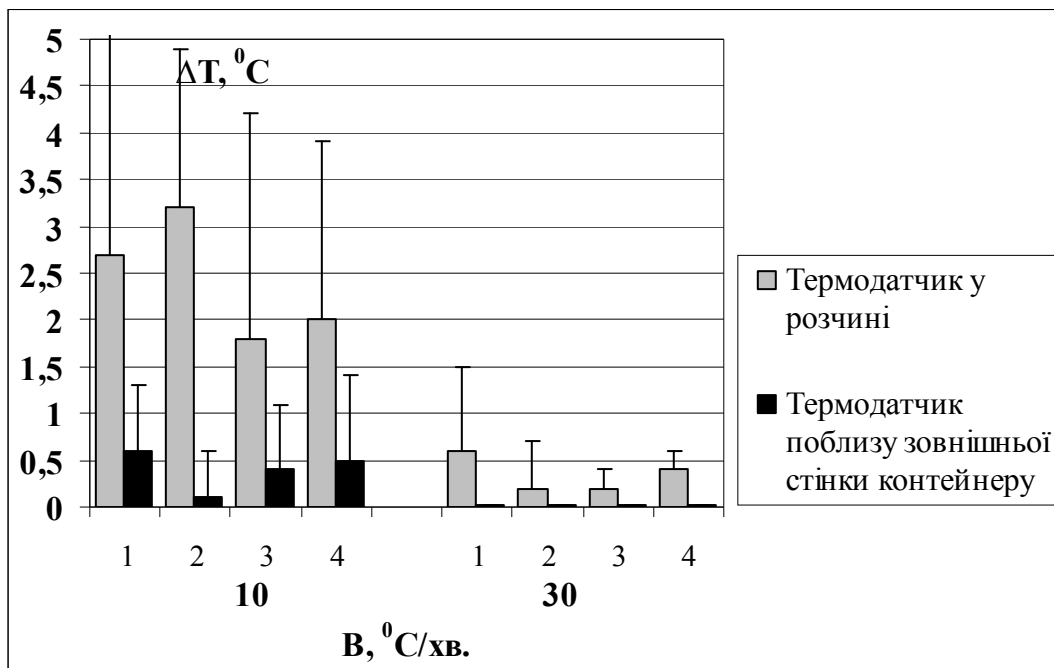


Рис.2. Гістограма показників температур початку росту кристалів у 5 % розчині гліцерину при швидкості теплообміну 10 і 30 °C/хв

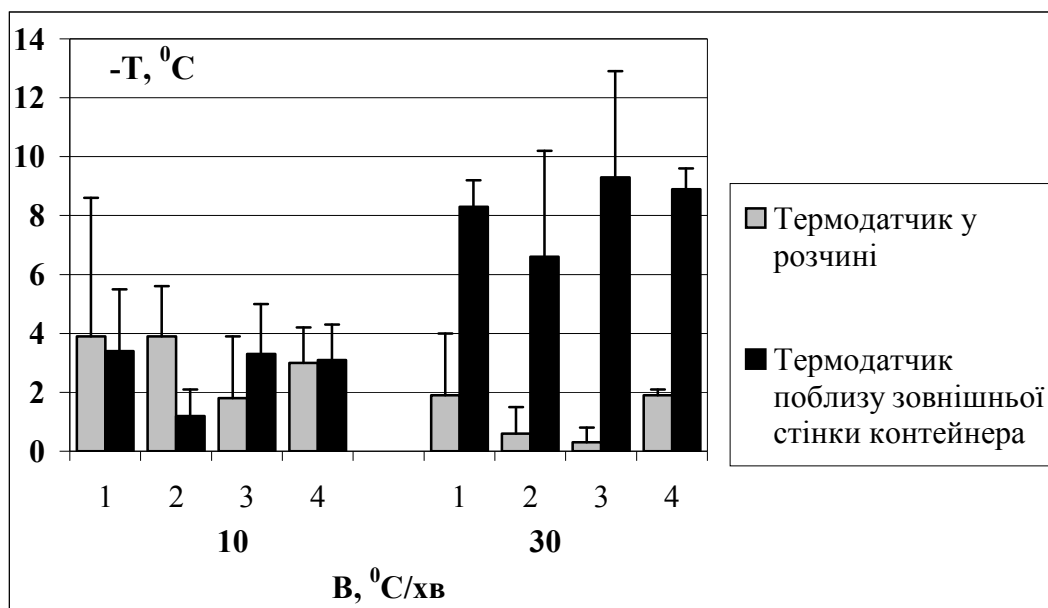


Рис.3 Гістограма показників зміни температур при викиді схованої теплоти кристалоутворення у 5% розчині гліцерину зі швидкістю теплообміну 10 і 30 °C/хв:

1 - контейнер без стрижня, 2 - контейнер зі стрижнем з діаметром 0,2 мм, 3 - контейнер зі стрижнем з діаметром 1 мм, 4 - контейнер із загостреним стрижнем з діаметром 1 мм.

1. Показники температур процесу кристалоутворення при різному способі ініціації у 5 % розчині гліцерину зі швидкостями теплообміну 10 і 30 °C/хв

Спосіб ініціації росту кристалів	Швидкість теплообмін у В, °C/хв	Температура початку росту кристалів Т, °C; $T \pm \sigma$	Зміна температури при викиді схованої теплоти кристалізації ΔT , °C; $\Delta T \pm \sigma$
Контейнер без ініціюючого елемента	10	-3,4 ± 2,1 (-3,9 ± 4,7)	0,6 ± 0,7 (2,7 ± 5,5)
	30	-8,3 ± 0,9 (-1,9 ± 2,1)	0 (0,6 ± 0,9)
Стрижень, з діаметром 0,2 мм.	10	-1,2 ± 0,9 (-3,9 ± 1,7)	0,1 ± 0,5 (3,2 ± 1,7)
	30	-6,6 ± 3,6 (-0,6 ± 0,9)	0 (0,2 ± 0,5)
Стрижень, з діаметром 1 мм.	10	-3,3 ± 1,7 (-1,8 ± 2,1)	0,4 ± 0,7 (1,8 ± 2,4)
	30	-9,3 ± 3,6 (-0,3 ± 0,5)	0 (0,2 ± 0,2)
Загострений стрижень з діаметром 1 мм.	10	-3,1 ± 1,2 (-3 ± 1,2)	0,5 ± 0,9 (2 ± 1,9)
	30	-8,9 ± 0,7 (-1,9 ± 0,2)	0 (0,4 ± 0,2)

Примітка. Без дужок - значення температур початку росту кристалів і зміни температур при викиді схованої температури кристалізації, коли термopapa перебуває поблизу стінки контейнера з досліджуваним розчином, у дужках - вимірювальна головка термopapi у поверхневому шару розчину.

Вплив ініціації росту кристалів на схоронність біооб'єкта виражається величиною схованої теплоти кристалізації і, як наслідок, різким відтоком рідини з клітини (температурний шок). Експериментально показано, що за плюсових температур швидкість не може перевищувати 1°C/хв . У нашому ж випадку за мінусових температур зміна швидкості і прискорення теплообміну при виділенні схованої теплоти (величини яких можуть змінюватися у межах від 1°C/хв до 100°C/хв і від 1000°C/хв до $-2000^{\circ}\text{C/хв}^2$, відповідно, у процесі заморожування) є вагомим фактором, що впливає на схоронність деконсервованих спермій.

Для підтвердження даної гіпотези проведено заморожування спермійв бугая активністю $80 \pm 5 \%$ зі швидкістю $30^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ двома способами. Процес охолодження реалізовувався у діапазоні температур від 0 до -70°C . У першому випадку біооб'єкт заморожувався у пробірці без ініціюючого стрижня, у другому - спермії знаходилися у пробірці з металевим загостреним стрижнем з діаметром 1 мм . Схоронність деконсервованих спермійв була відповідно $40 \pm 5 \%$ і $50 \pm 5 \%$.

Після оцінки деконсервованого матеріалу визначено залежність схоронності спермійв бугая від часу у порівнянні з нативними і розведеними, але не замороженими (рис.4).

За результати проведеної роботи одержані попередні дані показників схоронності сперміїв бугаїв при різних обробках і умовах утримування (табл. 2). Встановлено, що сидінг позитивно впливає на схоронність деконсервованого біооб'єкта, яка збільшується на $10 \pm 5 \%$ внаслідок зменшення викиду схованої теплоти кристалізації, і як наслідок, зміни температури у 7 разів у процесі заморожування.

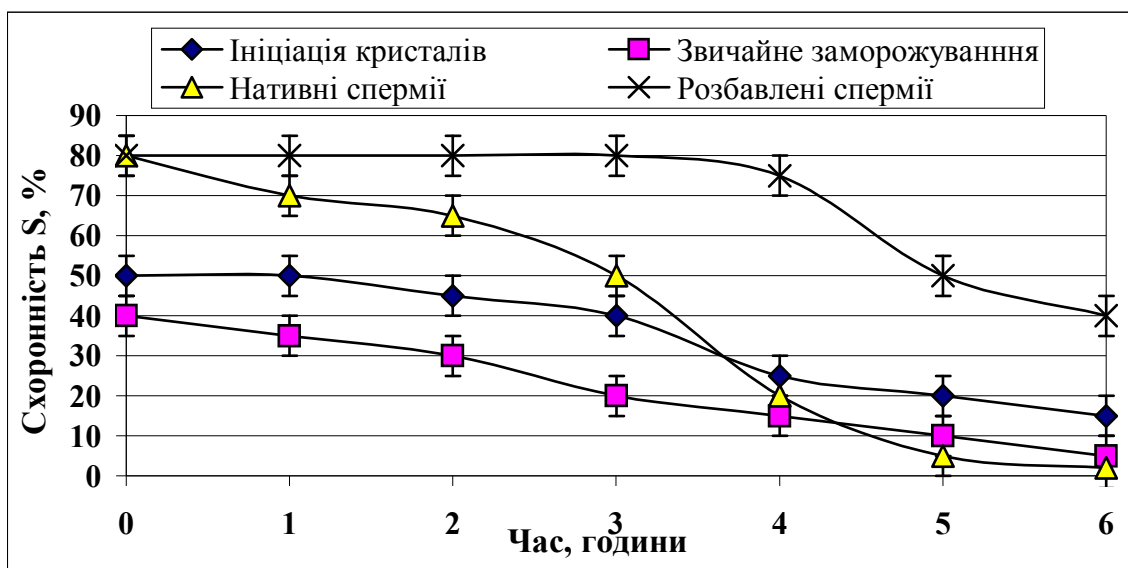


Рис. 4. Залежність схоронності сперміїв бугая від часу при температурі 37 °С

Різниця між контролем і дослідом ($10 \pm 5 \%$) є достовірною при рівні надійності $P = 0,95$. Припускаємо, що повне виключення викиду схованої теплоти кристалізації дасть змогу підвищити схоронність біооб'єкта на 15-20 %. Отримані результати дають основу для розробки контейнера при заморожуванні сперміїв різних видів тварин (риба, кнур, баран) як у лабораторних, так і у польових умовах.

2. Показники схоронності сперміїв бугая при різних обробках і умовах утримування

Вид обробки сперми бугая	Зміна температури при викиді схованої теплоти кристалізації $\Delta T \pm \sigma, ^\circ\text{C}$	Схоронність S, %	Схоронність після 5 годин при 37 °C, %
Нативна	-	80 ± 5	5 ± 5
Розбавлена	-	80 ± 5	50 ± 5
Деконсервована, без ініціації кристалів	$0,6 \pm 0,7$ ($2,7 \pm 5,5$)	40 ± 5	10 ± 5
Деконсервована, з ініціацією кристалів	0 ($0,2 \pm 0,2$)	50 ± 5	20 ± 5

Контейнер повинен мати таку характеристику: ініціація кристалізації, простота застосування, зручність при заповненні-витязі біоматеріалу і наступному заплідненні.

Висновок. Схоронність деконсервованих сперміїв бугая збільшується на $10 \pm 5 \%$ внаслідок зменшення перепаду температури у 7 разів у процесі заморожування при ініціації росту кристалів стальним стрижнем у дні контейнера та швидкості теплообміну $30 ^\circ\text{C}/\text{хв}$.

Бібліографічний список

1. Polge C., Rawson L.S. Fertilizing capacity of bull spermatozoa after freezing at $-79 ^\circ\text{C}$ // Ibid. – 1952. – V.169, №5143. - P. 629-637.

2. Харьковская технология асептического взятия и криоконсервации спермы быков-производителей: Методические рекомендации (под ред. проф. Ф.И. Осташко). –Х.-1990. -47с.
3. Валигура Е.Г. Влияние различных режимов замораживания на сохранность эмбрионов крупного рогатого скота: Дис. ... канд. биол. наук. – Харьков, 1994.-110 с.
4. Методическое пособие по криоконсервации спермы карпа, лососевых и осетровых видов рыб: Всероссийский научно-исследовательский институт прудового рыбного хозяйства. – Москва, 1997. – 10 с.
5. Вишневський В.І., Марющенко О.В. Захована теплота кристалізації та її вплив на виживаність сперми бугаїв. Розведення та штучне осіменіння великої рогатої худоби //Респ. міжвідомчий тематичний науковий збірник.– К.:Урожай.- №8.- 1976.– С. 62-66.
6. Бугров А.Д. Разработка теории и практики криоконсервации спермы быков-производителей: Дисс. ...д-ра биол. наук.- 1984.- 656 с.
7. Горбунов Л.В., Антоненко Т.С. Пристрій для заморожування статевих клітин і ембріонів ссавців у широкому спектрі швидкостей заморожування //Науково-технічний бюлетень. – Х.: ІТ УААН. – 2000.- №78 – С. 18-21.
8. Лакин Б. Ф. Биометрия. -Москва:Высшая школа, 1990.- 254 с.
9. Мищенко А.Г., Горбунов Л.В. Криоконсервация биологического материала на основе ускоренных режимов замораживания //Науково-технічний бюлетень . – Х.: ІТ УААН.– 2005 - №91 - С. 47-52.
10. Пат. 1802700А3 СССР, МКИ А 61 D 19/00. Установка для замораживания эмбрионов /Ф.И.Осташко, Н.Д.Безуглый, Е.Г.Валигура, Л.В.Горбунов (СССР); УНИ ИЖ.-№492296/14; Заявл. 29.03.91; Опубл. 15.03.93; Бюл. №10.- 4 с.

СПОСОБ ИНИЦИАЦИИ КРИСТАЛЛОВ ПРИ ЗАМОРАЖИВАНИИ СПЕРМИЕВ ЖИВОТНЫХ

А.Г.Мищенко, Л.В.Горбунов, Институт животноводства УААН

Представлены способы инициации роста кристаллов с целью минимизации величины выброса скрытой теплоты кристаллизации. Показано, что при инициации роста кристаллов сохранность деконсервированных спермиев увеличивается на 10±5%.

CRYSTAL INITIATION WAY BY ANIMAL SPERM FREEZING

A.G. Micshenko, L.V. Gorbunov, The Institute of animal science UAAS

Crystal growth initiation ways are submitted with the purpose the latent crystallization heat emission rate minimization. It is shown that by crystal growth initiation deconservaty sperm safety increases per 10 ± 5%.