

ТЕМПЕРАТУРА ВНУТРІШНЬОКЛІТИННОГО КРИСТАЛОУТВОРЕННЯ СПЕРМІЇВ БУГАЇВ

Л.В.Горбунов, Я.Ю. Суржанська
Харківський біотехнологічний центр

Для визначення температури внутрішньоклітинного кристалоутворення спермій бугаїв проводили охолодження сперми до різноманітних кінцевих температур у діапазоні від -10 до -70°C з наступним зануренням зразків у рідкий азот. Показано, що внутрішньоклітинне кристалоутворення спермій бугаїв спостерігається в інтервалі температур від -20 до -60°C , а максимум щільності імовірності розподілу цієї температури при швидкості заморожування $12 \pm 2^{\circ}\text{C}/\text{хв.}$ відповідає $35 \pm 5^{\circ}\text{C}$.

внутрішньоклітинна кристалізація, сперма бугаїв, заморожування, кінцева температура охолодження, виживаність

Одним з шляхів підвищення рівня життєздатності деконсервованих ембріонів великої рогатої худоби (ВРХ) та, очевидно, спермій ссавців, є мінімізація імовірності їх внутрішньоклітинного кристалоутворення. З цією метою, за загальноприйнятими технологіями кріоконсервації ембріонів ВРХ охолодження біооб'єкта перед безпосереднім зануренням у рідкий азот проводиться у парах азоту доки біооб'єкт не досягне температури його внутрішньоклітинної кристалізації [1]. На підставі того, що у доступній нам літературі значення температури внутрішньоклітинного кристалоутворення спермій бугаїв не було знайдено, у роботі [2] для її визначення використовували модифікований метод диференційної термометрії, однак достовірні результати цим методом отримати не вдалося. У даній роботі для встановлення температури внутрішньоклітинної кристалізації спермій бугаїв застосовано інший підхід, близький до методики визначення температури внутрішньоклітинної кристалізації ембріонів ВРХ [1].

Метою роботи було визначення характеру щільності імовірності розподілу температури внутрішньоклітинної кристалізації спермій бугаїв на підставі зміни активності сперми в залежності від умов її заморожування.

Методика досліджень. Об'єктом дослідження була нативна сперма бугаїв-плідників червоно-рябої української молочної, чорно-рябої і голштинської порід, що належать племпідприємству Харківського біотехнологічного центру. Для дослідів брали сперму з рівнем збереження $80 \pm 5\%$. Взяття, оцінка якості, розведення та підготовку сперми до охолодження проводили за Харківською технологією асептичного взяття та кріоконсервації сперми бугаїв-плідників [3].

Характер щільності імовірності розподілу температури внутрішньоклітинної кристалізації спермій бугаїв встановлювали згідно з модифікованою методикою Валігури К.Г. [1]. Згідно з цим методом, після температурної адаптації та еквалібрації пробірки з розфасованою по 10 мкл

спермою розташовували в термоблоці універсального заморожувача [4], охолоджували до заданих кінцевих температур (-10 , -20 , ... , -70°C) зі швидкістю $12 \pm 2^{\circ}\text{C/хв.}$ та занурювали у рідкий азот. Спермодози виймали з холодоагента, розморожували у водяній бані ($+38^{\circ}\text{C}$) та оцінювали рівень збереженості спермій. Отримані значення переводили у показники виживаності, як відношення кількості рухливих спермій після заморожування до кількості рухливих спермій до заморожування [5]. Величина виживаності була критерієм, за яким судили про досягнення сперміями температури внутрішньоклітинної кристалізації.

Результати досліджень. Модифікація методу, яка була запропонована у роботі для встановлення залежності рівня виживаності спермій бугая від кінцевої температури їх охолодження, полягала в тому, що після досягнення цієї температури, спермій занурювали у рідкий азот, а не розморожували, як у випадку з ембріонами [1]. Тому що коефіцієнт проникності спермій бугаїв до води на порядок вищий, ніж для ембріонів (ВРХ), при швидкостях заморожування ($B_3 \geq 100^{\circ}\text{C/хв.}$) згубність внутрішньоклітинного кристалоутворення буде проявлятися тільки у випадку їх неповної дегідратації раніше досягнення температури внутрішньоклітинної кристалізації. Таким чином, запропонований методичний прийом дозволяє встановлювати температуру росту внутрішньоклітинних кристалів за виживаністю біооб'єкта.

Результати дослідів відображено на рисунку 1. (крива 1). Там же наведено криву, побудовану на підставі даних Zishu Liu та ін. [6], які досліджували виживаність спермій бугаїв при різних режимах та швидкостях охолодження сперми після внесення в неї спеціальних добавок (крива 2).

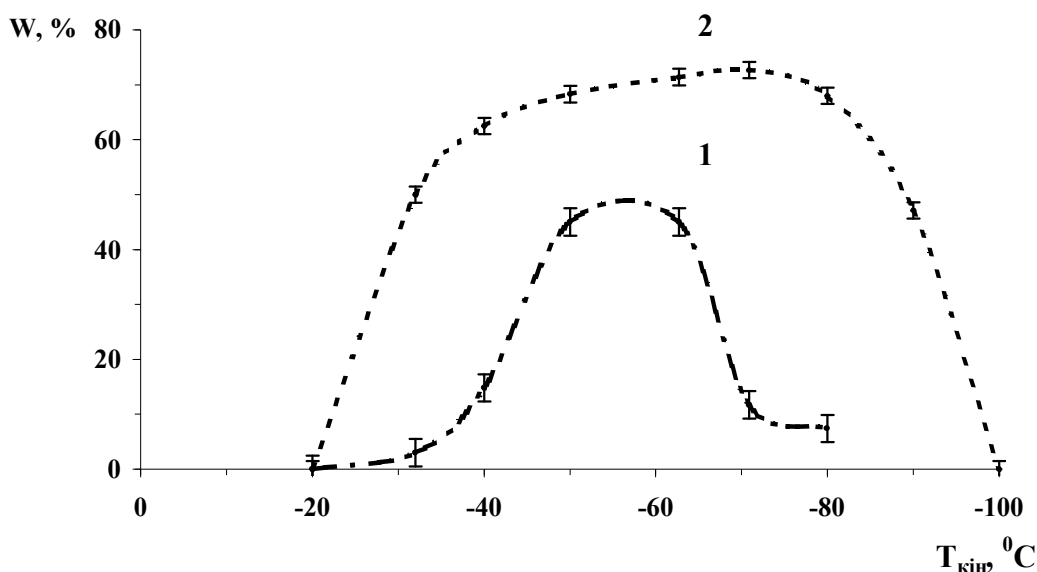


Рис.1 Залежність виживаності спермій бугаїв (W) від кінцевої температури охолодження ($T_{\text{кін.}}$): 1 – при швидкості заморожування $B_3=12 \pm 2^{\circ}\text{C/хв.}$; 2 – $B_3=2 \div 180^{\circ}\text{C/хв.}$ (літературні дані [6]).

Як видно з графіків, максимальна виживаність спермій, отримана нами та авторами статті [6], спостерігається в діапазоні температур від -45°C до -65°C і від -35 до -80°C , відповідно.

Для аналізу наведених кривих встановили рівень виживаності біооб'єкта, який, згідно з [7], обернено пропорційний імовірності його внутрішньоклітинної кристалізації:

$$W = (1 - P_{кр.}^i) \cdot W_{\max} \cdot 100\% , \quad (2)$$

де W – виживаність біооб'єкта; $W_{\max}$ – найбільше значення виживаності біооб'єкта; $P_{кр.}^i$ – вірогідність внутрішньоклітинного кристалоутворення.

З формули (2) значення імовірності внутрішньоклітинного кристалоутворення можна виразити як

$$P_{кр.}^i = (1 - W/W_{\max}) \cdot 100\% \quad (3)$$

За допомогою формули (3) шляхом підстановки в неї значень виживаності заморожено-відталой сперми, отриманих під час експериментів, встановлено значення вірогідності внутрішньоклітинної кристалізації спермій бугаїв. На підставі цих даних побудовано криві фазового переходу внутрішньоклітинного середовища спермій при його кристалізації (рис. 2).

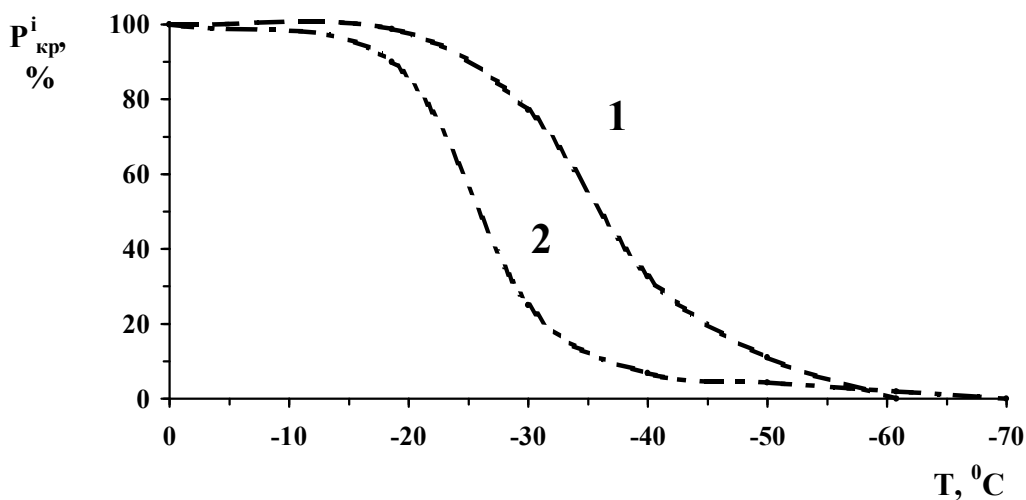


Рис. 2. Криві фазового переходу внутрішньоклітинного середовища спермій бугаїв: 1 – при швидкості заморожування $B_3 = 12 \pm 2^{\circ}\text{C/хв.}$; 2 – $B_3 = 2 \div 180^{\circ}\text{C/хв.}$ (літературні данні [6]).

Після диференціювання графічним способом залежності імовірності внутрішньоклітинної кристалізації $P_{кр.}^i(T)$, було отримано розподіл щільності

вірогідності внутрішньоклітинної кристалізації спермійів бугая від температури їх охолодження $F_{кр}^i(T)$ (рис.3).

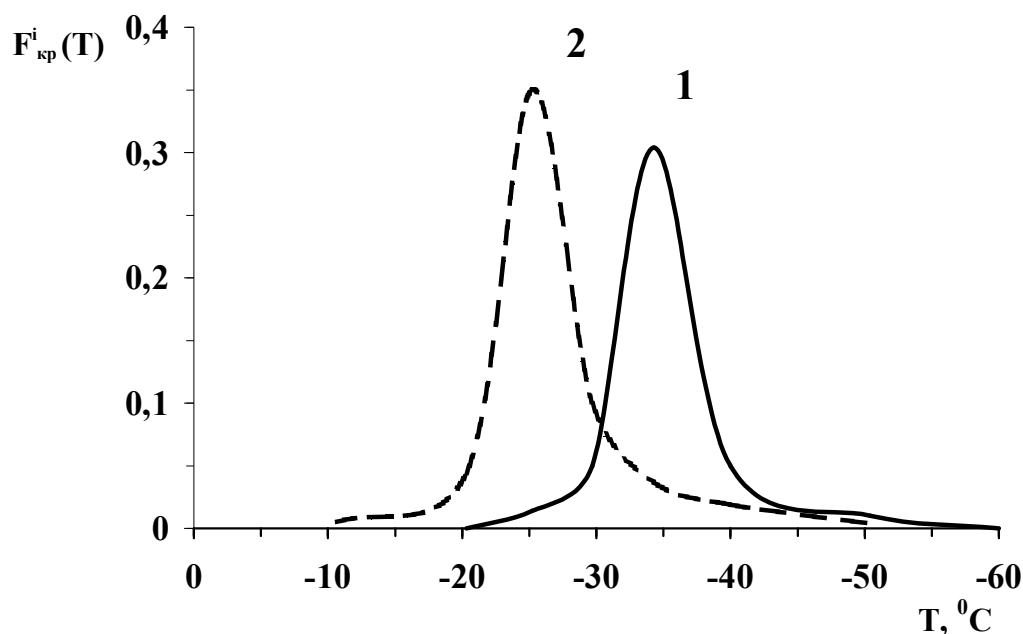


Рис. 3. Щільність імовірності розподілу внутрішньоклітинної кристалізації $F_{кр}^i(T)$ спермійів бугаїв: 1 – при швидкості заморожування

$V_3=12\pm 2^\circ\text{C}/\text{хв.}$;

2 – $V_3=2\div 180^\circ\text{C}/\text{хв.}$ (літературні данні [6]).

З отриманої залежності, можна зробити висновок, що щільність імовірності внутрішньоклітинного кристалоутворення реалізується у широкому діапазоні температур від -20°C до -60°C для сперми, охолодженої з постійною швидкістю ($V_3=12\pm 2^\circ\text{C}/\text{хв.}$), та від -15°C до -50°C , при різних швидкостях ($V_3=2\div 180^\circ\text{C}/\text{хв.}$). Розходження між вказаними діапазонами та максимальними величинами, які склали -35°C і -27°C , можна пояснити тим, що швидкість досягнення сперміями різних кінцевих температур охолодження в нашому випадку була відносно постійною, а в згаданій роботі [6] – ні. При цьому відрізнявся склад середовищ, які використовували для заморожування.

Вважаємо, що внутрішньоклітинне кристалоутворення відбувається у відносно вузькому діапазоні температур ($-35\pm 5^\circ\text{C}$), де фазовий перехід відбувається приблизно для $80\div 90\%$ спермійів. Очевидно, що зафіксувати внутріклітинну кристалізацію усіх спермійів за рівнем їх виживаності не можна, тому, що з початку експерименту приблизно 20% клітин мають низьку життєздатність – збереженість спермійів до охолодження становить $80\pm 5\%$.

Вважаємо, що при швидкостях заморожування $V_3 \leq 27^\circ\text{C}/\text{хв.}$ перед прямим зануренням у рідкий азот сперму бугая достатньо охолоджувати до температури $-30 \div -35^\circ\text{C}$. Проте, для підтвердження даного припущення необхідно проведення додаткових досліджень.

Висновки:

1. Температура внутрішньоклітинної кристалізації, що встановлена за рівнем виживаності спермій бугаїв, належить інтервалу температур від -20 до -60°C .

2. Максимум щільності імовірності розподілу температури внутрішньоклітинної кристалізації при швидкості заморожування $V_3 = 12 \pm 2^\circ\text{C}/\text{хв.}$ відповідає $-35 \pm 5^\circ\text{C}$.

Бібліографічний список

1. Валигура Е.Г. Влияние различных режимов замораживания на сохранность эмбрионов крупного рогатого скота: Автореф. дис.. канд. биол. наук /Х., 1994.- 14 с.

2. Горбунов Л.В., Суржанська Я.Ю. Дослідження процесів кристалізації сперми бугаїв // Науково-технічний бюлетень ІТ УААН. – Харків. –2002. -№81. – С. 38-42.

3. Осташко Ф.И. Харьковская технология асептического взятия и криоконсервации спермы быков-производителей.- Харьков, 1990.- 48 с.

4. Горбунов Л.В., Антоненко Т. С. Пристрій для заморожування статевих клітин і ембріонів ссавців у широкому спектрі швидкостей заморожування //НТБ №78 ІТ УААН.- Харків. - 2000. -С. 18-21.

5. Лучко Н.А. Вплив умов понадшвидкого охолодження на морфофункціональні властивості спермій та ембріонів: Автореферат дисс. д.б.н. – 1997 – Харків, с. 35.

6. Zishu Liu, Robert H. Foote and Charles C. Brockett. Survival of bull sperm frozen at different rates in media varying in osmolarity // Cryobiology, 1998, 37 p., 219-230.

7. Leibo, S.P., McGrath, J.J., Crvalho, E.G. Microscopic observation of intracellular ice formation in unfertilized mouse ova as a function of cooling rate. Cryobiology, 1978 –15, p. 257-271.

Для определения температуры внутриклеточной кристаллизации спермиев быков сперму охлаждали до разных конечных температур в диапазоне от -10 до -70°C с последующим погружением образцов в жидкий азот. Показано, что внутриклеточная кристаллизация спермиев быков происходит в интервале температур от -20 до -60°C , а максимум плотности вероятности распределения этой температуры при скорости замораживания $12 \pm 2^\circ\text{C}/\text{мин.}$ соответствует $35 \pm 5^\circ\text{C}$.

For study of the bull sperm intracellular crystallisation temperature the sperm was cooling up to various final temperature in a range from -10°C up to -70°C with the next immersing of the samples in liquid nitrogen. It is shown that the intracellular crystallisation temperature is in an interval from -20°C up to -60°C and the maximum of density of probability of distribution of this temperature at speed of freezing $12 \pm 2^\circ\text{C}/\text{min.}$ corresponds $35 \pm 5^\circ\text{C}$.