

ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОЦЕСІВ КРИСТАЛІЗАЦІЇ СПЕРМИ БУГАЇВ

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

Досліджено можливість визначення температури внутрішньоклітинної кристалізації спермійв бугаїв модифікованим методом диференційної термометрії.

спермій, диференційно-термометричний аналіз, внутрішньоклітинна кристалізація

Один з шляхів підвищення рівня життєздатності біооб'єкта, який заморожується, складається з позбавлення росту внутрішньоклітинних кристалів. З цією метою, ембріони тварин перед зануренням у рідкий азот повільно охолоджують до температури їх внутрішньоклітинної кристалізації. У доступній нам літературі значення цього параметра для спермійв бугаїв не вказується. Можливо тому, кріоконсервація сперми припускає її охолодження перед заморожуванням у широкому діапазоні температур від -55°C до -125°C [1,2]. Для оптимізації етапу заморожування сперми бугаїв має інтерес визначення температури внутрішньоклітинної кристалізації їх спермійв. Встановлення цієї температури для деяких видів біооб'єктів проводиться шляхом реєстрації процесу виділення теплоти кристалізації внутрішньоклітинної води. Так, наприклад, за допомогою методу диференційно-скануючої калориметрії (ДСК) Paul D. Schreuders at al. [3], досліджуючи внутрішньоклітинну кристалізацію ембріонів *Anopheles mosquito*, зафіксували температуру виділення енергії кристалізації як поза-, так і внутрішньоклітинного середовища. Метод ДСК успішно застосовувався для дослідження температури внутрішньоклітинної кристалізації ембріонів *zebrafish* (*Danio rerio*) [4]. Однак, існуючі методи ДСК дозволяють встановлювати температуру кристалізації середовища, що досліджується, при його охолодженні чи відігріву зі швидкостями (V_3), які не перевищують $10^{\circ}\text{C}/\text{хв}$.

Мета роботи полягала у дослідженні можливості визначення температури внутрішньоклітинної кристалізації спермійв бугаїв при швидкостях заморожування ($V_3 \leq 70^{\circ}\text{C}/\text{хв}$), використовуючи модифікований метод диференційної термометрії.

Методика досліджень. Встановлення ймовірності кристалоутворення середовища здійснювалось методом диференційно-термометричного аналізу за розробленою у ході проведення досліджень схемою. Посилення сигналу для визначення ймовірності позаклітинного кристалоутворення складало 5,5 раза, а внутрішньоклітинного біля 110 разів, що досягалось підключенням додаткового посилювача. Реєстрація отриманого сигналу проводилась графобудівником Н-307.

*Науковий керівник – доктор с.-г. наук Безуглий М.Д.

Об'єктом досліджень була свіжоотримана розведена сперма здорових тварин з рівнем збереженості біля 80%. Підготовку сперми для експериментів проводили згідно з Харківською технологією асептичного взяття та кріоконсервації сперми бугаїв [2].

Результати досліджень. Для реалізації поставленої мети розроблено пристрій, який завдяки зниженню термоінерційності пластини, на якій міститься розчин, дозволяє визначати температуру кристалізації середовища, що досліджується, в діапазоні швидкостей охолодження до $27^{\circ}\text{C}/\text{хв}$. Пристрій працює за принципом пасивного остигання термоблока у парах рідкого азоту в горловині посудини Дьюара Х-34Б. Як термоблок (1) в ньому виступають змінні мідні пластини, що мають різну товщину (рис. 1). На пластину (4) (рис.2) наноситься крапля розчину, що досліджується (5). При цьому, температура його охолодження повинна відповідати температурі остигання пластини. Ця швидкість визначається характерним часом остигання та глибиною занурення термоблока в горловину посудини Дьюара Х-34Б. Температура розчину, що досліджується, контролюється хромель-копелевою термопарою (2) з діаметром вимірювальної головки 0,5 мм.

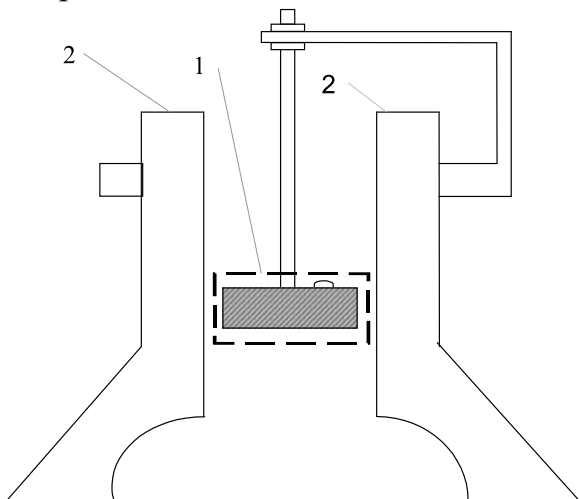


Рис.1.Росташування термоблока (1) у горловині посудини Дьюара Х-34Б (2).

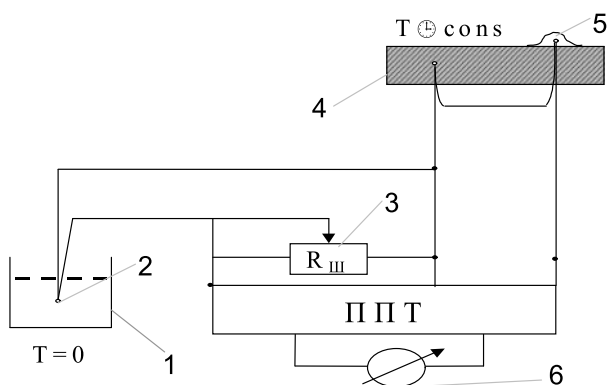


Рис.2.Електрична схема виміру температури кристалізації середовища у термоблоці. (1)-лід, що тане; (2)-термопара; (3)-перемінний резистор; (4)-мідна пластина; (5)-середовище, що досліджується; (6)-графобудівник.

Електрична схема вимірювання складається з двох частин: термометричної (ТМ), яка дозволяє вимірювати температуру металевої пластини, що занурюється у горловину посудини Дьюара Х-34Б, та диференційно-термометричної (ДТМ), яка дозволяє реєструвати ймовірність виділення теплоти кристалізації (див.рис.2). Коли показання сигналу в ДТМ схемі починає змінюватись, що відповідає початку росту кристалів у середовищі, яке досліджується, включається ТМ-схема, за якою фіксується температура.

Сигнали від обох частин електричної схеми реєструються графобудівником (6). При цьому точність виміру пропорційна діапазону отриманого з термопарі сигналу. Робочий діапазон, в якому відбувається реєстрація сигналу теплообміну ДТМ, складає $3\div 5^{\circ}\text{C}$. При збільшенні коефіцієнта посилення на всю робочу зону вимірювань напруги від 0 до 200 mV чутливість прибору, що

реєструє, складає $40 \text{ mV}/^{\circ}\text{C}$. Чутливість ТМ пропорційна робочому діапазону, в якому відбувається реєстрація температури від $+20^{\circ}\text{C}$ до -50°C . Таким чином, робочий діапазон температур складає біля 70°C . Як наслідок, чутливість цього методу вимірювання дорівнює $3 \text{ mV}/^{\circ}\text{C}$. Видно, що чутливість ДТМ на порядок вище чутливості ТМ. Комбінуючи ці методи, можна встановити температуру кристалізації розчину за допомогою ТМ-способу вимірювання в діапазоні до 70°C , а за допомогою ДТМ — з високою точністю реєструвати виділення теплоти кристалоутворення, звужуючи робочий діапазон вимірювання до 4°C , і як наслідок, підвищуючи його чутливість.

Результати модельних дослідів з розчином гліцерину ($C=15\%$) показали, що при товщині пластини термоблока 8 мм та глибині його занурення у горловину посудини Дьюара Х-34Б на 15 см початок виділення теплоти кристалізації відбувалося через 15 хвилин після занурення термоблока і швидкості охолодження розчину $2^{\circ}\text{C}/\text{хв}$. При зануренні тієї ж пластини на 24 см швидкість охолодження підвищується до $10^{\circ}\text{C}/\text{хв}$. При зменшенні товщини пластини до $0,1 \text{ мм}$ і глибині занурення 15 см , швидкість заморожування зростає до $27^{\circ}\text{C}/\text{хв}$., а час виділення тепла зменшується до 1 хв . Однак при цьому з'являються шуми, які відповідають температурним коливанням та електричним наводкам.

На наступному етапі роботи досліджувалась можливість реєстрації температури кристалізації внутрішньоклітинного середовища спермійів бугаїв з використанням модифікованого методу ДТМ. Отримано залежність інтенсивності сигналу, що подається на графобудівник, від температури охолодження пластини у вигляді термограм заморожування середовища, яке досліджується (рис. 3).

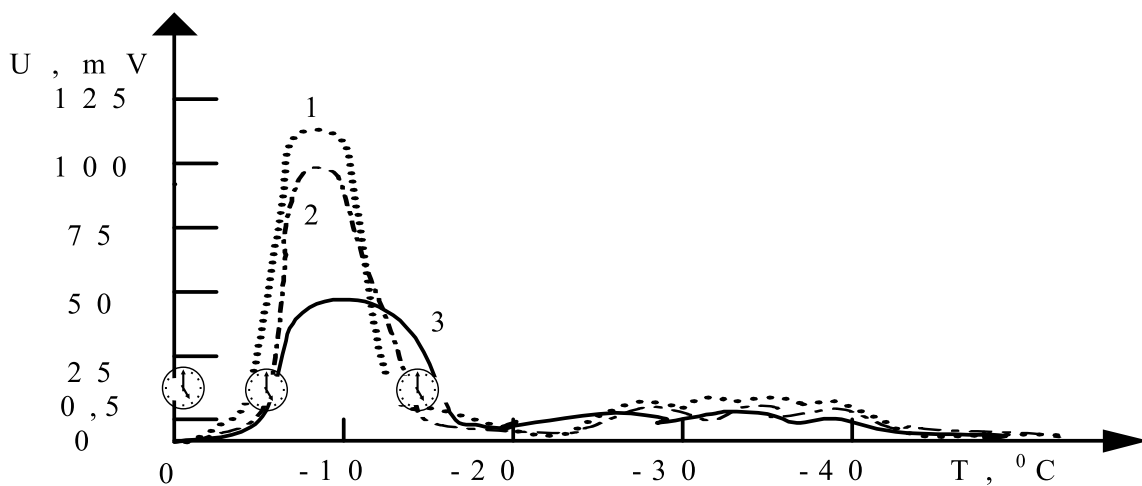


Рис. 3. Залежність амплітуд сигналів виділення схованої теплоти кристалоутворення зразків, що досліджуються, від температури:

1 – нативна сперма; 2 – сперма з кріоконсервантом;
3 – кріоконсервант.

Як видно з термограм, в діапазоні охолодження усіх зразків від -3°C до -20°C виникають піки. Тут, згідно з [5], знаходиться інтервал температур замерзання позаклітинного середовища спермійів. У діапазоні від -20°C до -40°C спостерігається незначне проявлення стійкого сигналу на рівні шумів. Вважаємо, що цей сигнал відповідає виділенню схованої теплоти внутрішньоклітинного кристалоутворення. Однак у зв'язку з надмірним зневодненням клітин, яке відбувається при даних швидкостях охолодження ($V_3 \leq 27^{\circ}\text{C/хв}$) в результаті високого коефіцієнта проникності спермійів бугаїв до води $L_p = 10,4 \text{ мкм}^3/\text{мкм}^2 \times \text{хв.} \times \text{атм.}$ [6] інтенсивність сигналу, що реєструється, є не достатньо високою. Базуючись на експериментальних даних, представлених у літературі [1], зниження рівня збереженості деконсервованої сперми бугаїв спостерігається у випадку перевищення швидкості заморожування 50°C/хв. З цього виходить, що лише при таких умовах кріоконсервації настає внутрішньоклітинна кристалізація спермійів в наслідок не повного зневоднення клітин.

З метою збільшення інтенсивності сигналу виділення теплоти внутрішньоклітинної кристалізації, підвищували швидкість охолодження біооб'єкта шляхом крапання сперми на попередньо охолоджену до різних кінцевих температур, а саме: -20°C , -30°C , ... , -70°C , мідну пластину ($V_3 \approx 20$; 30 ; ... 70°C/хв. , відповідно). У цьому випадку отриманні криві також характеризувалися наявністю деякого піку в діапазоні температур від -20°C до -40°C , як і криві охолодження зразків з більш низькою швидкістю. Однак значущого виділення корисного сигналу з рівня шуму добитись не вдалось.

Таким чином, запропонований пристрій дозволяє реєструвати ймовірність кристалоутворення позаклітинного середовища як при повільних швидкостях заморожування, так і при підвищених ($V_3 \leq 70^{\circ}\text{C/хв.}$). Однак зафіксувати піки виділення теплоти внутрішньоклітинного кристалоутворення спермійів бугаїв за його допомогою було проблематично.

Висновки:

1. Запропонований пристрій дає змогу встановлювати ймовірність кристалоутворення позаклітинного середовища як при повільних швидкостях заморожування, так і при підвищених ($V_3 \leq 27^{\circ}\text{C/хв.}$).

2. При охолодженні сперми бугаїв зі швидкостями $V_3 \leq 70^{\circ}\text{C/хв.}$, запропонованим методом, встановити температуру внутрішньоклітинної кристалізації спермійів бугаїв неможливо через їх зневоднення та, як наслідок цього, — низький рівень сигналу, що реєструється.

Бібліографічний список

1. Исаченко Е.Ф. Влияние геометрии и объема контейнера на качество спермы быков, замороженной в облицованных гранулах методом непосредственного погружения в жидкий азот. // Сборник научных трудов. Влияние охлаждения на биобъекты. — 1990. — С. 62-67.

2. Осташко Ф.И. Биотехнология воспроизведения крупного рогатого скота. — К.: Аграрна наука, 1995. — 182 с.

3. Paul D. Schreuders, Erica D. Smith, Kenueth W. Cole, Maria-Del-Pilar Valencia, Andre Laughinghouse, and Peter Mazur. Characterization of intraembryonic freezing in *Anopheles gambiae* embryos. – *Cryobiology*, 1996, № 33. P.487-501.

4. Differential scanning calorimetry studies of intraembryonic freezing and cryoprotectant penetration in zebrafish (*Danio rerio*) embryo. Liu XH, Zhang T. Rawson DM. — *J Exp Zool* 2001 Aug 1; 290(3):299-310.

5. Пушкарь Н.С., Белоус А.И., Иткин Ю.А., Вишневский В.И., Розанов Л.Ф.. Низкотемпературная кристаллизация в биологических системах.- К.: Наук. думка, 1977.- С. 132-144, 198-209.

6. Drevius L.O. Permiability coefficientsof bull spermatozoa for water and polihydric alcohols. — *Exp. cell res.*, 1971, 69, p. 212–216.

Исследована возможность определения температуры внутриклеточной кристаллизации спермиев быков модифицированным методом дифференциальной термометрии.

The possibility of definition of bull sperm intracellular crystallisation temperature using modiflicated method of differential thermometry was studied

УДК 636.2.083:591.5

ЕТОЛОГІЧНІ ПОКАЗНИКИ КОРІВ І НОВОНАРОДЖЕНИХ ТЕЛЯТ ПРИ ОТЕЛЕННЯХ КОРІВ У РІЗНИХ УМОВАХ УТРИМАННЯ

Г.О. Гриненко, В.П. Міненко
Інститут тваринництва УААН

Наведено результати етологічних досліджень, проведених на коровах і телятах абердин-ангуської породи в перші 2 доби після отелення корів у різних умовах утримання – на прив'язі, в денниках, в стаді, на пасовищі.

етологія, м'ясні корови, отелення, приплід, утримання

У районах, забруднених радіонуклідами, склалися умови (зменшення кількості працездатного населення, енергетична криза, значне зниження ринків збуту молока через забрудненість його радіонуклідами та ін.), які призвели до неможливості ефективно вести галузь молочного скотарства.

Це стало підставою для того, що в значній кількості господарств цього регіону згідно з державною програмою здійснюється перепрофілювання, повне або часткове, галузі молочного скотарства на спеціалізоване м'ясне.

Через відсутність коштів на нове будівництво приміщень для утримання м'ясної худоби використовують приміщення, в яких утримували молочну худобу. Як правило, у цих приміщеннях передбачено прив'язне утримання. Для м'ясної худоби цей спосіб утримання неефективний. Однак через відсутність коштів на реконструкцію приміщень, а також через недостатню кількість соломи для застосування безприв'язного утримання на глибокій підстилці, особливо в зоні Полісся, більшість господарств утримують м'ясну худобу в