УДК 57.08:577.15/.17:639.3

ВПЛИВ ЕЯКУЛЯТУ РІЗНОЇ ЯКОСТІ НА ОЦІНКУ ЕФЕКТИВНОСТІ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ СПЕРМІЇВ КОРОПА

Л.В. Горбунов[1], Л.П. Бучацький[2]

[1] Інститут тваринництва УААН, м. Харків,
[2] Інститут рибного господарства УААН, м. Київ

Встановлено значимий вплив різної якості нативної сперми коропа на показники її збереженості при оцінці етапів вибраного способу кріоконсервування: температурної адаптації (60÷74%), підбору кріоконсерванту (51÷67%), заморожування-відтавання (54÷65%). Показано, що основним лімітуючим фактором, що визначає ефективність кріоконсервування сперміїв коропа (60±5%), є вибраний режим заморожування-відтавання, ефективність реалізації якого становить 73±3%.

Загальноприйнятий спосіб оцінки кріоконсервування статевих клітин тварин здійснюється за показником збереженості деконсервованого біологічного матеріалу. Збереженість оцінюється як відношення кількості рухливих сперматозоїдів до загального їх числа (формула 1) [1–3]. На цей показник впливають початкова якість біооб'єкта, склад і спосіб застосування кріоконсерванту та обраний режим заморожування-відтавання. За послідовної реалізації процесу кріоконсервування об'єкта відбувається зниження його збереженості на кожному з етапів: свіжоодержаної сперми; обробки кріопротектором; заморожування-відтавання.

Збереженість сперми коропа, замороженої одним способом, може змінюватися в межах від 10 до 70%. Провідним фактором такої значної розбіжності одержаних показників є різна якість нативного об'єкта. Зниження впливу різної якості біоматеріалу на оцінку досліджуваного способу кріоконсервування можна реалізувати за допомогою різних способів. Найпоширеніший полягає у проведенні порівняльного аналізу в дослідній і контрольній групі методом роздільного еякуляту. Для зіставлення результатів, одержаних на різних еякулятах, прийнято стандартизувати рівень збереженості сперміїв, узятих на дослідження. Прикладом цьому є норми, які регламентують збереженість нативних сперміїв бугая, рекомендовані до заморожування, і які не повинні бути нижчими 70÷80% [3]. Оскільки максимальна початкова збереженість нативних сперміїв для коропа становить 100%, то такий значний розкид (20÷30%) може впливати на оцінюваний показник ефективності вибраного способу заморожування і на його складові етапи.

Зниження збереженості залежить від ефективності оптимізації досліджуваних параметрів, їх варіації, а також сумісної взаємодії цих факторів. Необхідність оцінки ефективності реалізації складових етапів процедури кріоконсервування зумовлена потребою зниження втрат збереженості біооб'єкта на кожному з аналізованих етапах. Це можливо за допомогою визначення "слабких ланок" технологічного "ланцюга" з подальшим їх "посиленням" за умов оптимізації параметрів, які впливають на збереженість біооб'єкта в циклі низькотемпературного кріоконсервування.

Метою роботи є вивчення впливу різної якості сперміїв коропа на оцінку ефективності реалізації складових етапів кріоконсервування біооб'єкта.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Об'єктом дослідження були сперміі малолускатого коропа. Захисне середовище для кріоконсервування сперми коропа готували за стандартною методикою [1, 2]. Оцінку рухливості сперміїв тварин робили за допомогою візуального методу. Одержані еякуляти охолоджували до 5°С в холодильнику протягом 30 хв. До охолодженого еякуляту за безперервного перемішування додавали охолоджене до

тієї самої температури захисне середовище в об'ємному відношенні 1:1. Суспензію сперми коропа в захисному середовищі залишали на еквілібрацію протягом 0,5 год. Якість розбавленої сперми оцінювали за рухливістю сперміїв, відбираючи для заморожування еякуляти, що містять залежно від цілей кріоконсервування 60÷100% рухомих сперматозоїдів. Відібрані розбавлені еякуляти розливали в епендорфівські пробірки 0,5÷2,5 мл, герметизували, охолоджували, а потім заморожували. Після закінчення розливу контейнери виймали з крижаної бані, витирали від вологи і встановлювали в диск заморажувача.

Контроль зміни температури здійснювали за допомогою хромель-копелевої (ХК) термопари з діаметром спаю 0,3 мм. Заморожування сперміїв відбувалося в пристрої, що базується на пасивному охолодженні термоблоку в горловині посудин Дьюара Х-34 і Х-5 [3, 4]. Режим охолоджування має два ступеня. На першому охолоджування проходить за температури від +5 до –15°С зі швидкістю 2÷3°С/хв, на другому — від –15 до –70°С за 15÷20°С/хв. Відтавання контейнерів, що містять біооб'єкт, проводили на водяній бані за 40°С [1, 2]. Збереженість сперміїв перевіряли в кожній пробі не менше трьох разів і обчислювали середнє значення [1, 2] за формулою:

$$S_j = \frac{n_j}{n_o} \cdot 100\%;$$

$$m_j = \sqrt{\frac{S_j \cdot \left(100 - S_j\right)}{n_o}}, \qquad (1)$$

де n_o — загальна кількість сперміїв у пробі, n_j — кількість рухливих сперміїв на j-му етапі кріоконсервування, S_j — збереженість сперміїв, оцінена на j-му етапі кріоконсервування (свіжоодержаний еякулят, температурна адаптація, обробка кріопротектором, заморожування-відтавання).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Для врахування впливу різної якості еякуляту, досліджувані проби були розділені на дві групи за умови, що в першій рухливість нативних сперміїв становить вище 70%, у другій — нижча. Різниця усереднених показників збереженості порівнюваних груп 79,2±2,6% і 66,4±2,5% становила 12,8% для 4 еякулятів у першій групі і 3 в другій відповідно.

Ефективність обраного етапу кріоконсервування сперміїв розраховували, виходячи із співвідношення збереженості сперматозоїдів (формула 1) після виконання заданої операції до порівнюваної:

$$W_a = \frac{S_a}{S_c} \cdot 100\%; \qquad (2a),$$

$$W_t = \frac{S_t}{S_a} \cdot 100\%; \qquad (2б),$$

$$W_z = \frac{S_d}{S_t} \cdot 100\%; \qquad (2в),$$

$$W_d = \frac{S_d}{S} \cdot 100\%, \qquad (2г),$$

де W_j — показник ефективності реалізації j-го етапу кріоконсервування сперміїв; $j\{z, a, t, d\}$ — індекси, що позначають етапи технології кріоконсервування сперміїв (свіжоодержаний еякулят, температурна адаптація, обробка кріопротектором, заморожування-відтавання).

Для оцінки ефективності технологічного етапу температурної адаптації порівнювали показники збереженості сперміїв після 30-хвилинної витримки за 5°С у середовищі, що не містить кріопротектор, зі збереженістю нативної розбавленої сперми до її охолоджування (формула 2*а*). Оцінку ефективності вибору способу застосування кріопротектора здійснювали через відношення збереженостей сперміїв у середовищі з кріопротектором і без (формула 2*б*). Ефективність вибору режиму заморожування визначали за допомогою зіставлення показників збереження сперміїв після заморожування і до (формула 2*в*). Ефективність вибраного способу кріоконсервування обчислювали через співвідношення збереженостей деконсервованих сперміїв до нативних (формула 2*г*).

Відмінність збереженості між групами на кожному з тестованих етапів (температурної адаптації, застосування кріоконсерванту, вибору режиму заморожування-відтавання) становила від 14 до 16%, а за показником відносної збереженості–ефективності 3÷7% (таблиця).

Вплив початкової рухливості сперміїв коропа на оцінку різних етапів процесу кріоконсервування, визначеного за показниками збереженості *S* і ефективності *W*

j	Технологічні етапи	Показники стану сперміїв у першій групі з початковою активністю 79,2±2,6, *n*=6, у другій — 66,4±2,5, *n*=8, %				
		$S \pm m$	ΔS	$S_j - S_{j+1}$	$W \pm m$	ΔW
1	Температурна адаптація	73,6±3,7* (59,8±3,9*)	13,8	5,6 (6,6)	92,9±3,5 (90,1±3,4)	2,8
2	Застосування кріопротектора	67,4±3,5* (51,3±3,9*)	16,1	6,2 (8,5)	92,0±3,5 (85,6±3,7)	6,4
3	Режим заморожування	51,2±3,6* (35,6±3,8*)	15,6	11,2 (10,7)	76,0±3,6 (69,4±4,2)	6,6
4	Кріоконсервування	51,2±3,6* (35,6±3,8*)	15,6	28 (30,8)	64,7±3,5* (53,6±3,6*)	11,1

* Достовірність відмінності між групами, що мають різну якість $P \geq 0{,}95$.

При оцінці складових етапів вибраного способу кріоконсервування за показниками ефективності величини різниці між групами, що мають різну початкову якість еякуляту, виявляються більш ніж удвічі меншими, ніж для збереженості. Разом з тим розбіжність показників, що характеризують ефективності різних етапів технологічного ланцюга, для різної якості еякуляту відрізняються між собою. Найвищий показник відповідає температурній адаптації 90÷93%, потім 86÷92% — підбору кріоконсерванту і режиму заморожування-відтавання — 69÷76%, а способу кріоконсервування — в цілому 54÷65%.

Таким чином, визначено значний вплив (з достовірністю $P \geq 0{,}95$) різної якості нативної сперми коропа на показники її збереженості у оцінці різних етапів обраного способу кріоконсервування і можливість його усунення при використанні запропонованих показників ефективності. Показано, що основним лімітуючим фактором, що визначає ефективність 60±5% кріоконсервування сперміїв коропа, є вибраний режим заморожування, ефективність реалізації якого становить 73±3%. Вважаємо, що підвищити цей показник можливо на основі проведеної багатофакторної оптимізації режиму заморожування-відтавання.

ВИСНОВКИ

Визначено вплив різної якості еякуляту сперміїв коропа, що мають початкову рухливість 66,4±3,5% (n=8) і 79,2±3,6% (n=6), на показники збереженості, яку оцінювали на різних етапах кріоконсервування. Збереженість на етапі температурної адаптації становила 60÷74%, підбору кріоконсерванту — 51÷67%, заморожування-відтавання — 54÷65%. При переході до відносного показника ефективності такий розкид зменшився більш ніж удвічі і становив 90÷93%, 86÷92% і 69÷76% відповідно для кожного етапу.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Копейка Е.Ф.* Инструкция по низкотемпературной консервации спермы карпа: Инструкция рассмотрена и одобрена Ученым Советом ИПКиК АН УССР (протокол № 8 от 18.07.86.) и Ученым Советом ВНИИПРХ (протокол № 13 от 21.07.86.), инструкция утверждена заместителем министра рыбного хозяйства СССР Б.Д. Монаковым 5.08.86. — М., 1986. — 9 с.
2. *Методическое* пособие по криоконсервации спермы карпа, лососевых и осетровых видов рыб: Всероссийский научно-исследовательский институт прудового рыбного хозяйства. — М., 1997. — 10 с.
3. *Горбунов Л.В., Бучацкий Л.П.* Криоконсервация половых клеток и эмбрионов: Монография. — К., 2005. — 325 с.

4 *Пат. 6417 Україна*, МКВ 7 F25 D 3/10. Пристрій для кріоконсервації біологічних об'єктів тваринного та рослинного походження. Л.В. Горбунов, В.І. Кабачний, Н.І. Горбунова, М.В. Гринжевський / Національний фармацевтичний університет. — № 20040706332; Заявл. 29.07.2004; Опубл. 16.05.2005; Бюл. № 5. — 10 с.

ВЛИЯНИЯ РАЗЛИЧНОГО КАЧЕСТВА ЭЯКУЛЯТА НА ОЦЕНКУ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ СПЕРМИЕВ КАРПА

Л.В. Горбунов, Л.П. Бучацкий

Установлено значимое влияние различного качества нативной спермы карпа на показатели её сохранности при оценке различных этапов выбранного способа криоконсервирования: температурной адаптации 60÷74%, подбора криоконсерванта 51÷67%, замораживания–оттаивания 54÷65%. Показано, что основным лимитирующим фактором, определяющим эффективность — 60±5% криоконсервирования спермиев карпа, является выбранный режим замораживания, эффективность реализации которого составляет 73±3%.

INFLUENCES OF A DIFFERENT QUALITY OF SPERM ON ESTIMATION OF KRYOPRESERVATION OF CARP SPERM

L. Gorbunov, L. Buchatsky

Meaningful influence of a different quality of nativ sperm of carp on the indexes of its safety at estimation of different stages of the chosen method of kryopreservation is set: temperature adaptation of 60÷74%, selection of kryoprotector of 51÷67%, freezing-thawing 54÷65%. It is shown that by a basic limiting factor determining efficiency are 60±5% kryopreservation of carp sperm, there is the chosen mode of freezing, efficiency of realization of which makes 73±3%.