

УДК 621.59:597-114.78:

ВІДТВОРЮВАНІСТЬ РЕЗУЛЬТАТІВ ЗАПЛІДНЕННЯ ООЦИТІВ ДЕКОНСЕРВОВАНИМИ СПЕРМІЯМИ КОРОПА (*Cyprinus carpio* L.)

Л. В. Горбунов¹
В. Ю. Філіпов²
Л. П. Бучацький²

¹Інститут тваринництва УААН, Харків
² Інститут рибного господарства, Київ

E-mail: liveroff@gmail.com

Для оцінювання вибраного способу кріоконсервування сперміїв коропа запропоновано спосіб підвищення відтворюваності результатів запліднення ооцитів. Це дало можливість більш ніж у два рази знизити вплив індивідуальних властивостей сперміїв і яйцеклітин коропа та умов проведення запліднення і культивування при оцінюванні способу кріоконсервування. За допомогою дисперсійного аналізу визначено, що різна якість сперміїв та ооцитів має силу впливу $\eta^2_A = 0,31$ на здатність клітин до запліднення, тоді як етапи кріоконсервування, зокрема температурна адаптація сперміїв, урівноваження їх у кріоконсерванті, заморожування–відтаювання, запліднення яйцеклітин та культивування, — $\eta^2_B = 0,61$.

Ключові слова: кріоконсервування–деконсервування сперміїв, ікра, плідники, збереженість статевих клітин, відтворюваність.

Проведення кріобіологічного дослідження ґрунтується на необхідності впровадження комплексу взаємопов'язаних методів. Методологічний прийом парних порівнянь — «контроль-дослід» [1], застосований в одному експерименті, не дає змоги зіставляти результати, одержані в різний час і з використанням різних способів кріоконсервування, що ускладнює аналіз і подальше узагальнення даних та потребує великої кількості повторень дослідів ($n > 30$) [1]. У разі проведення багатofакторного дослідження кількість дослідів зростає пропорційно кількості параметрів, тобто ця умова є суттєвим обмеженням.

Збереженість деконсервованих сперміїв тварин залежить від їхнього початкового стану та ефективності застосованого способу кріоконсервування. Неврахування початкового стану біооб'єкта є однією з причин зміни умов проведення експерименту і, як наслідок, низької відтворюваності одержаних результатів. Розкид показників збереженості сперміїв зростає під час здійснення процедури кріоконсервування, що зумовлено спільним впливом варіації біологічних і технологічних параметрів кожного попереднього етапу [2].

Основним критерієм ефективності застосованого способу кріоконсервування є одержання потомства від деконсервованого матеріалу. Запліднювальна здатність статевих клітин коропа суттєво залежить від їхніх індивідуальних особливостей. Збереженість ембріонів від ікри різних самок залежить від енергетичного статусу ікри [3, 4, 5]. Різна збереженість ембріонів у разі використання ікри від різних самок та сперми від різних самців, імовірно, свідчить про фізіологічну гетерогенність статевих клітин плідників, а також про можливість перекриття ушкоджених рецесивних генів сперміїв домінантними генами ікри окремих самок [3]. Тому для збільшення вірогідності запліднення яйцеклітин доцільно використовувати змішані еякуляти, одержані від трьох плідників [4, 5]. У зв'язку з цим для збільшення відтворюваності результатів експерименту слід ураховувати індивідуальні властивості біооб'єкта та особливості використаного способу кріоконсервування.

Метою роботи є підвищення відтворюваності результатів кріоконсервування сперміїв коропа зіставленням одержаних даних за різних умов проведення експерименту.

Матеріали і методи

Якість розбавленої сперми коропа (*Cyprinus carpio* L.) оцінювали за рухливістю сперматозоїдів, відбираючи для заморожування еякуляти, які містили, залежно від цілей кріоконсервування, від 60 до 90% рухливих сперматозоїдів. Рухливість сперміїв перевіряли у кожній пробі не менше трьох разів за допомогою мікроскопа МБЛ-3 зі збільшенням $\times 400$ і оцінювали в балах з подальшим переведенням у відсотки. Обсмінення ікри коропа проводили загальноприйнятими методами [3–5].

Захисне середовище для кріоконсервації сперми коропа готували за стандартною методикою [5]. Заздалегідь готували трис-НСІ-буфер, розчиняючи 15 г трису в 1 л середовища дистильованої води і додаючи соляну кислоту до рН = 8. Для отримання 1 л середовища в 600–700 мл трис-НСІ-буфера розчиняли по чергово при перемішуванні 7,3 г NaCl, 0,04 KCl, 2,3 г NaHCO₃, 1,15 г сахарози, 0,52 г MgSO₄, 0,15 г CaCl₂. За 30 хв до застосування до одержаного розчину додавали 150 г яєчного жовтка і 100–120 г етиленгліколю, доводячи розчин до 1 л трис-НСІ-буфером.

Одержані еякуляти риби охолоджували до 5 °С у холодильнику протягом 30 хв. До охолодженого еякуляту за неперервного перемішування додавали охолоджене до тієї самої температури захисне середовище у співвідношенні 1:1. Суспензію сперми коропа в захисному середовищі залишали на врівноваження упродовж 30 хв. Відібрані розбавлені еякуляти розливали в попередньо пронумеровані пластикові пробірки місткістю 2,5 мл, які герметизували й поміщали на лід. Після закінчення розливу контейнери витирали, позбавляючи від вологи, й установлювали в диск заморожувача.

Заморожування сперміїв здійснювали за допомогою розробленого нами приладу, заснованого на пасивному охолодженні термоблока в горловині посудин Дьюара Х-5 ($V = 5$ л) [2].

Відтворюваність результатів кріоконсервування визначали за розкидом показників, які характеризують стан біологічного об'єкта — S та ефективність обраного способу кріоконсервування — W , як прийнято в літературі [2–7]. Показники ефективності етапу кріоконсервування сперміїв розраховували за співвідношенням збереженості сперматозоїдів (1) після виконання заданої операції до вихідного їх стану:

$$S = (n/n_0)100\%, \quad (1)$$

$$W_a = \frac{S_a}{S_c}100\%, \quad (2)$$

$$W_t = \frac{S_t}{S_a}100\%, \quad (3)$$

$$W_z = \frac{S_d}{S_t}100\%, \quad (4)$$

$$W_d = \frac{S_d}{S_c}100\%, \quad (5)$$

де n_0 — загальна кількість сперміїв у пробі;

n — кількість рухливих сперміїв у пробі;

W_j — ефективність реалізації j -го етапу кріоконсервування сперміїв;

$\{c, a, t, z, d\}$ — індекси, які означають етапи кріоконсервування сперміїв: розбавлення еякуляту — c ; температурної адаптації — a ; еквілібрації з кріопротектором — t ; заморожування–відтаювання — z ; розбавлення еякуляту, температурної витримки та заморожування в комплексі — d .

Для оцінювання ефективності способу температурної адаптації порівнювали показники збереженості сперміїв після 30-хвилинної витримки, при 5 °С в середовищі, що не містить кріопротектор, зі збереженістю нативної розбавленої сперми до її охолодження [2]. Оцінку ефективності способу застосування кріопротектора визначали через відношення збереженості сперміїв у середовищі з кріопротектором та без нього [3]. Ефективність режиму заморожування встановлювали, порівнюючи показники збереженості сперміїв до і після заморожування [4]. Ефективність усіх етапів кріоконсервування в комплексі обчислювали через співвідношення збереженості деконсервованих сперміїв до нативних [5].

Основні критерії, які характеризують стан біоб'єкта та обраного етапу кріоконсервування: збереженість (процент придатності біологічного об'єкта до подальшого використання); ефективність етапу кріоконсервування (величина, яка характеризує, у скільки разів змінюється стан біоб'єкта в результаті виконання заданої операції); відтворюваність (розкид результатів, які одержані при використанні заданого способу кріоконсервування); зіставлення (можливість порівняння результатів, одержаних при використанні різних способів кріоконсервування) [2–5].

Статистичну обробку отриманих даних проводили методом Стьюдента — t_d [1]. Силу впливу досліджуваних факторів визначали із застосуванням дисперсійного аналізу за критерієм Плохінського — η^2 . Варіювання біологічних чинників оцінювали за відношенням дисперсії рухливості сперміїв

у дослідних зразках до загальної — η^2_A , а технологічних — за дисперсією залежно від етапів кріоконсервування — η^2_B [1, 2, 7].

Результати та обговорення

Дані оцінювання впливу індивідуальних особливостей деконсервованих (та нативних) спермій на запліднювальну здатність ікри коропа й ефективності кріоконсервування наведені в таблиці. Ефективність кріоконсервування спермій (W_p) оцінювали через відношення вірогідності запліднення ікри коропа (P) деконсервованою спермою до нативної. Перехід до відносних показників дав змогу знизити вплив початкового стану спермій та яйцеклітин коропа, умов проведення запліднення та культивування більш ніж у два рази, визначити ефективність обраного способу кріоконсервування за показником відносної запліднювальної здатності — 46–51%. Оцінюючи складові етапів обраного способу кріоконсервування за показником ефективності, встановили, що величини від’ємності між групами, які мають різну вихідну якість еякуляту, виявились удвічі меншими, ніж для збереженості.

Вплив різноманітної рухливості деконсервованих (нативних) спермій на запліднювальну здатність ікри коропа (P) та оцінку ефективності їх кріоконсервування (W_p)

Збереженість деконсервованої (нативної) сперми, %	Кількість ембріонів/кількість ікринок	Вірогідність запліднення ікри, %			
		$P \pm m$	ΔP	$W_p \pm m$	ΔW_p
50,0±3,7* (80,0±3,6*)	18/64 (35/57)	31,2±5,6* (61,4±6,5)	10,5 (12,9)	50,8±6,7	5,0
40,0±3,8* (70,0±3,5*)	11/60 (28/55)	18,3±5,0* (50,9±6,7)		45,8±6,5	

* Величини, які відрізняються з вірогідністю не менше 0,95.

Для встановлення сили впливу біологічних (різна кількість спермій та ооцитів) та технологічних (етапи кріоконсервування: температурна адаптація спермій, врівноваження з кріопротектором, заморожування-відтаювання, запліднення яйцеклітин та культивування) факторів на стан ембріонів коропа проведено двофакторний дисперсійний аналіз. Для аналізу впливу початкового стану спермій коропа на їх збереженість використовували дані, одержані нами раніше

[6]. Різниця усереднених показників збереженості порівнюваних груп з початковою рухливістю 80±3,6% та 66,3±3,5% становила 14% для 4 еякулятів у першій групі та 3 — у другій, відповідно. Розбіжність збереженості між групами на кожному з тестованих етапів — температурної витримки, використання кріоконсерванта, вибору режиму заморожування-відтаювання склала від 13 до 17%, а за показником відносної збереженості — ефективності 1–9%.

Дисперсійний аналіз одержаних результатів збереженості показав, що варіація стану біологічного об’єкта (різна якість спермій та ооцитів) здійснює вплив силою $\eta^2_A = 0,31$ на одержання потомства, тоді як вплив технологічних операцій (етапи кріоконсервування: температурна адаптація спермій, врівноважування з кріоконсервантом, заморожування-відтаювання, запліднення яйцеклітин та культивування) у два рази вищий — $\eta^2_B = 0,61$. Аналізуючи результати показників ефективності, виявили значний вплив тільки технологічного фактора $\eta^2_B = 0,98$, який з переходом до відносних показників збільшив силу впливу на 36%, тимчасом як сила впливу $\eta^2_A = 0,01$ біологічного фактора зменшилась на 32%, з рівнем достовірності $P < 0,05$.

Порівняльний аналіз значень ефективності різних етапів кріоконсервування спермій коропа свідчить, що в кожному конкретному випадку одержані величини більшою мірою залежать від умов проведення експерименту аніж від початкової рухливості спермій. Перехід до відносних величин дає змогу визначити вплив кожного з досліджуваних факторів на збереженість спермій з можливістю подальшої оцінки процедури кріоконсервування на різних етапах зі скороченням кількості дослідів приблизно удвічі.

Підвищення рівня збереженості статевих клітин пов’язано з необхідністю комплексного аналізу й оптимізації циклу кріоконсервування. Для поліпшення відтворюваності та забезпечення зіставлення результатів, одержаних за різних методів проведення експерименту, доцільно використовувати запропоновані показники, які визначають ефективність етапів кріоконсервування. Дослідження початкового стану сперматозоїдів, яйцеклітин тварин та особливостей технологічних факторів, які впливають на збереженість біоб’єкта в циклі низькотемпературного консервування, є актуальним завданням, вирішення якого дозволить встановити закономірності низької відтворюваності результатів експерименту та нау-

ково обґрунтувати нові підходи до створення ефективних способів кріоконсервування.

Таким чином, перехід до відносних показників збереженості біоб'єкта дає можливість знизити вплив індивідуальних властивостей сперміїв та яйцеклітин коропа більш ніж у два рази. Ефективність обраного способу кріоконсервування сперміїв коропа, оціненого за показником відносної запліднювальної здатності, становила 46–51%.

Отже, використання запропонованого критерію оцінки ефективності кріоконсервування сперміїв дало змогу більш ніж у два рази знизити вплив індивідуальних властивостей сперміїв і яйцеклітин коропа та умов проведення запліднення і культивування при оцінюванні вибраного способу кріоконсервування.

Встановлено значний вплив індивідуальних властивостей сперміїв та яйцеклітин коропа на показники запліднення. За допомогою дисперсійного аналізу було визначено, що варіація стану біологічного об'єкта (різна якість сперміїв та ооцитів) здійснила вплив силою $\eta^2_A = 0,31$ на здатність клітин до запліднення, тоді як вплив технологічних операцій (етапи кріоконсервування: температурна адаптація сперміїв, врівноваження їх у кріоконсерванті, заморожування-відтаювання, запліднення яйцеклітин та культивування) — $\eta^2_B = 0,61$. З переходом до відносних показників сила впливу технологічного фактора збільшилась на 32% — $\eta^2_A = 0,01$, при $P < 0,05$.



Відбір сперміїв коропа *Cyprinus carpio* L. з метою подальшої кріоконсервації та запліднення ооцитів деконсервованою спермою

ЛІТЕРАТУРА

1. Лакін Б. Ф. Биометрия. — М.: Высшая школа, 1990. — 254 с.
2. Горбунов Л. В., Бучацький Л. П. Вплив різної якості еякуляту на оцінку ефективності реалізації складових етапів кріоконсервування сперміїв коропа // Рибне господарство. — Наука України. — 2007. — Вип. 1. — С. 32–35.
3. Бибенко О. В., Копейка Е. Ф. Влияние кріоконсервации спермы карпа *Cyprinus carpio* на эмбриогенез // Сб. науч. тр. «Консервирование репродуктивных клеток и эмбрионов». — ИПКиК АН УССР, 1992. — С. 3–8.
4. Копейка Е. Ф. Инструкция по низкотемпературной консервации спермы карпа. — М., 1986. — 9 с.
5. Цветкова Л. И., Савушкина С.И., Титарева Л.Н. и др. Методическое пособие по кріоконсервации спермы карпа, лососевых и осетровых рыб. — М.: ВНИИПРХ, 1997. — 11 с.
6. Горбунов Л. В., Бучацький Л. П. Кріоконсервация половых клеток и эмбрионов. — К.: Издательско-полиграфический центр «Киевский университет», 2005. — 325 с.
7. Горбунов Л. В., Безуглый Н. Д., Салина А. С. Воспроизводимость результатов кріоконсервирования эмбрионов млекопитающих // Биотехнологія. — 2010. — Т. 3, № 1. — С. 46–51.

**ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ
ОПЛОДОТВОРЕНИЯ ООЦИТОВ
ДЕКОНСЕРВИРОВАННЫМИ
СПЕРМИЯМИ КАРПА (*Cyprinus carpio* L.)**

*Л. В. Горбунов*¹
*В. Ю. Филипов*²
*Л. П. Бучацкий*²

¹Институт животноводства УААН, Харьков

²Институт рыбного хозяйства, Киев

E-mail: liveroff@gmail.com

Для оценки выбранного способа криоконсервирования спермиев карпа предложен способ повышения воспроизводимости результатов оплодотворения ооцитов. Это дало возможность более чем в два раза снизить влияние индивидуальных свойств спермиев и яйцеклеток карпа, условий проведения оплодотворения и культивирования при оценке способа криоконсервирования. С помощью дисперсионного анализа установлено, что разное качество спермиев и ооцитов имеет силу влияния $\eta^2_A = 0,31$ на способность клеток к оплодотворению, в то время как этапы криоконсервирования, в частности температурная адаптация спермиев, уравнивание их в криоконсерванте, замораживание–оттаивание, оплодотворение яйцеклеток и культивирование, — $\eta^2_B = 0,61$.

Ключевые слова: криоконсервирование–деконсервирование спермиев, икра, производители, сохранность половых клеток, воспроизводимость.

**REPRODUCIBILITY OF THE RESULTS
OF OOCYTES IMPREGNATION
BY DECONSERVED CARP SPERM
(*Cyprinus carpio* L.)**

*L. V. Gorbynov*¹
*V. Y. Filipov*²
*L. P. Buchatsky*²

¹Institute of Stock-Raising of Ukrainian Academy of Agricultural Sciences, Kharkiv

²Institute of Fish Economy, Kyiv

E-mail: liveroff@gmail.com

For estimation of the chosen method of cryopreservation of carp reproductive cells, a method of the results reproducibility increasing of oocyte impregnation was offered. It gave a possibility to reduce influence of individual properties of reproductive cells and carp ovules, terms of conducting of impregnation and cultivation more than twice upon estimating the cryopreservation method. It was determined by dispersion analysis that different quality of reproductive cells and oocytes had force of influence $\eta^2_A = 0,31$ on impregnation cage ability, while cryopreservation stages particularly temperature adaptation of reproductive cells, their self-control in cryopreservation, freezing-thawing, impregnation of ovules and cultivation was $\eta^2_B = 0,61$.

Key words: cryoconservation–deconservation of sperms, oocyte, producers, safety of gametes, reproducibility.