

Для визначення запліднювальної здатності спермійів відразу після розморожування сперми визначають їх початкову енергію ( $E_0$ ). Одночасно з вимірюванням, другий зразок цієї ж сперми помішають у водяний термостат при  $t^\circ=38^\circ\text{C}$ . Через дві години проводять повторне вимірювання енергії спермійів цього зразка, аналогічно попередньому ( $E_2$ ). На основі одержаних даних обчислюють середню енергію спермійів за формулою:

$$E_c = \frac{E_0 + 2E_2}{3},$$

де  $E_c$  – середня енергія спермійів, ум. од.;

$E_0$  – початкова енергія спермійів, ум. од.;

$E_2$  – енергія спермійів через 2 години, ум. од.

Енергетичні показники розмороженої сперми мають високі коефіцієнти кореляції із запліднюваністю телиць після осіменіння цією спермою ( $r=+0,75\pm 0,125$ ). За даними енергетичних показників якість розмороженої сперми розділяють на 4 градації: низька – із запліднювальною здатністю менше 55%, понижена – 55-65%, середня – 65-75% і висока – понад 75%.

Виробничу перевірку способу оцінки запліднювальної здатності спермійів за їх енергетичними показниками проводили на 30 серіях кріоконсервованої сперми різної якості шляхом осіменіння 1560 телиць в господарствах Київської і Полтавської областей. Перевірка підтвердила високу достовірність ( $P>0,99$ ) критерію відповідності ( $\chi^2=2,76$ ) теоретичної запліднювальної здатності спермійів, розрахованої за їх енергетичними показниками, фактичній заплідненості телиць від першого осіменіння цією спермою.

Таким чином, розроблений метод контролю замороженої сперми бугаїв-плідників за показником “запліднювальна здатність спермійів” дає диференційовану оцінку її якості і може бути введений до нового Державного стандарту України на заморожену спермопродукцію.

УДК 591.15.16

М.Д.БЕЗУГЛИЙ<sup>1</sup>, Л.В.ГОРБУНОВ<sup>2</sup>, І.А.МОРОЗОВА<sup>2</sup>

**ВИЗНАЧЕННЯ ЗАЛЕЖНОСТІ КРИТИЧНОЇ ЗОНИ**

**ПОЗАКЛІТИННОГО КРИСТАЛОУТВОРЕННЯ ВІД КОНЦЕНТРАЦІЇ  
ПРОНИКАЮЧИХ ТА НЕПРОНИКАЮЧИХ КРІОПРОТЕКТОРІВ У  
ДІАПАЗОНІ ВИСОКИХ І НАДВИСОКИХ ШВИДКОСТЕЙ  
ОХОЛОДЖЕННЯ ТА ВІДТАЮВАННЯ**

<sup>1</sup> Інститут тваринництва УААН

<sup>2</sup> Харківський біотехнологічний центр УААН

Використання непроникаючих кріопротекторів у вітрифікаційних розчинах дозволяє суттєво знизити згубний вплив як осмотичного, так і токсичного ефектів, зумовлених їх високими концентраціями (М.Д.Безуглий, 1986, В.В.Ісаченко, 1994). Суттєве зниження концентрації кріопротектора реалізується у випадку застосування надвисоких швидкостей ( $B \geq 5 \cdot 10^3$  °C/хв) заморожування-відтавання (Л.В.Горбунов, М.Д.Безуглий, І.А.Морозова, 1998). Проте, проблема визначення імовірності кристалоутворення у широ-

кому діапазоні швидкостей заморожування-відтавання, встановлення мінімальної концентрації кріоконсерванту, а також його властивості не дозволяють повною мірою оптимізувати технологію вітрифікації біооб'єктів у даний час.

Метою даної роботи було встановити мінімальну концентрацію розчину гліцерину і цукрози, яка призводить до ефекту вітрифікації середовища залежно від обраної швидкості заморожування-відтавання.

На першому етапі роботи проведені експерименти, які дозволили визначити здатність до склування розчинів цукрози у комплексі з гліцерином за ступенем кристалоутворення різних їх об'ємних співвідношень (1:3; 1:2; 2:3) при швидкостях заморожування  $V_3=25^{\circ}\text{C}/\text{сек}$  та  $V_3=250^{\circ}\text{C}/\text{сек}$ . Наявність або відсутність зростання кристалів виявляли візуально. Різних швидкостей заморожування контейнерів досягали, розташовуючи їх у парах рідкого азоту, безпосередньо в рідкому азоті та в попередньо охолоджену до температури  $-196^{\circ}\text{C}$  приладі, виконаному у вигляді двох паралельних мідних пластин, які збігаються разом. Швидкості відтавання реалізували розміщенням контейнерів у водяну баню, яку нагрівали у температурному діапазоні від 40 до  $95^{\circ}\text{C}$ .

Отримані результати вказують на те, що при збільшенні частки гліцерину у розчинах кріоконсерванту за різних швидкостей заморожування-відтавання має місце тенденція фазового зрушення у бік низьких концентрацій. Ступінь вітрифікації розчину прямо пропорційний частці гліцерину в розчині та більше залежить від швидкості відтавання, ніж заморожування за умови приблизної рівності їх величин. На основі отриманих даних запропонована формула для оцінки мінімальної концентрації кріоконсерванту, який включає у себе ряд кріопротекторів, що мають неоднакову здатність до склування при різних швидкостях:

$$C_{\min}(B) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n C_i(B),$$

де,  $n$  – кількість видів кріопротекторів, які входять до складу кріоконсерванта;

$C_i(B)$  – мінімальна концентрація розчину кріопротектору за зазначеної швидкості відтавання ( $B$ ).

Ці величини для розчинів гліцерину та цукрози були розраховані з рівнянь, отриманих за використання регресійного аналізу:

$$C_G(B) = a_0 + a_1 B^{a_2},$$

де,  $a_0=46,95$ ;  $a_1=-2,368$ ;  $a_2=0,4238$  ( $R=0,999$ ).

$$C_{\text{SUC}}(B) = a_0 B^2 - a_1 B + a_2,$$

де,  $a_0=1,989 \times 10^{-4}$ ;  $a_1=0,1567$ ;  $a_2=68,72$  ( $R=0,999$ ).

Одержані математичні вирази дозволяють прогнозувати як поза-, так і внутріклітинну імовірність кристалоутворення та визначити мінімальну концентрацію поза- та внутріклітинного кріопротектора з метою отримання високого рівня збереженості деконсервованих ембріонів ссавців, заморожених у широкому діапазоні швидкостей охолодження.