



УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **83803**

(13) **U**

(51) МПК

**G01N 33/48** (2006.01)

**G01N 15/14** (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**

<b>(21)</b> Номер заявки: <b>u 2013 05510</b>	<b>(72)</b> Винахідник(и): <b>Копейка Євген Федорович (UA),</b> <b>Пуговкін Антон Юрійович (UA),</b> <b>Буцький Кирило Ігорович (UA)</b>
<b>(22)</b> Дата подання заявки: <b>29.04.2013</b>	
<b>(24)</b> Дата, з якої є чинними права на корисну модель: <b>25.09.2013</b>	<b>(73)</b> Власник(и): <b>ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І</b> <b>КРІОМЕДИЦИНИ НАЦІОНАЛЬНОЇ</b> <b>АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ,</b> вул. Переяславська, 23, м. Харків, 61015 (UA)
<b>(46)</b> Публікація відомостей про видачу патенту: <b>25.09.2013, Бюл.№ 18</b>	

**(54) СПОСІБ ОЦІНКИ ЯКОСТІ СПЕРМИ КОРОПА**

**(57) Реферат:**

Спосіб оцінки якості сперми коропа включає інкубацію клітин у гіпотонічному розчині, визначення динаміки пошкодження сперматозоїдів і їх осмотичної резистентності. При цьому при інкубації сперматозоїдів у гіпотонічному розчині за допомогою фотоелектроколориметра реєструють залежність світлопропускання суспензії клітин від часу, звідки отримують динаміку пошкодження сперматозоїдів, час пошкодження 50 % клітин визначає осмотичну резистентність сперматозоїдів.

**UA 83803 U**



Корисна модель належить до галузі кріобіології і може бути використана при розробці середовищ кріоконсервування сперматозоїдів коропа для збереження генофонду промислових риб, а також у рибному господарстві.

Якість сперми можна визначається як здатність сперматозоїдів запліднити яйцеклітини та привести до розвитку нормальних ембріонів. Визначення якості сперми включає оцінку параметрів руху сперматозоїдів, морфологічний та біохімічний аналіз клітин.

Відомий спосіб оцінки якості сперми риб за відотною кількістю сперматозоїдів, що рухаються. Для цього певну кількість сперми розмішують в активуючому розчині і за допомогою мікроскопу візуально визначають відношення кількості сперматозоїдів, що рухаються, до загальної кількості сперматозоїдів у полі зору [1].

Відомий спосіб оцінки якості сперми риб, в якому визначають час рухливості сперматозоїдів в активуючому середовищі [2].

Значним недоліком зазначених способів є їх суб'єктивність, що обумовлює значну похибку визначення кількості рухливих сперматозоїдів. Також кількість рухливих сперматозоїдів залежить від того, в якому шарі в активуючому розчині вони знаходяться, тобто на різній глибині можуть бути різні показники рухливості, що так само призводить до похибки в оцінці якості сперми.

Відомий спосіб оцінки якості сперми риб за показником швидкості руху сперматозоїдів в активуючому середовищі. Він визначається за допомогою комп'ютерної обробки відеозаписів руху клітин [1, 2].

Недоліком цього способу є також неточність оцінки через залежність рухливості клітин від глибини в активаторі, на якій вони знаходяться.

Як найближчий аналог вибрано спосіб оцінки якості сперми коропа, який базується на визначенні резистентності мембран до осмотичного шоку [3]. Осмотичну резистентність клітини визначає час, за який пошкоджується певна частина клітин, або навпаки, деякий відсоток пошкоджених клітин за визначений час.

Згідно зі способом, сперму розбавляють фізіологічним розчином до концентрації  $10^8$  сперм./мл. Далі у відношенні 1:100 інкубують у гіпотонічному розчині хлориду натрію, що містить 50 мкг/мл барвника proridium iodide (PI), і за допомогою спектрофлуориметра визначають залежність інтенсивності флуоресценції PI, що зв'язується з ДНК, від часу, тобто динаміку пошкодження сперматозоїдів, яка свідчить про їх осмотичну резистентність. На її основі роблять висновок про якість сперми.

Недоліком цього способу є необхідність використання дорогих лабораторного приладдя і реактивів, що обмежує його використання у сільському господарстві.

В основу корисної моделі поставлено задачу створити більш доступний для використання на практиці спосіб оцінки якості сперми коропа.

Ця задача вирішується тим, що в відомому способі оцінки якості сперми, який включає інкубацію клітин у гіпотонічному розчині, визначення динаміки пошкодження сперматозоїдів і їх осмотичної резистентності, згідно з корисною моделлю, при інкубації сперматозоїдів у гіпотонічному розчині за допомогою фотоелектроколориметра (ФЕК) реєструють залежність світлопропускання суспензії клітин від часу, звідки отримують динаміку пошкодження сперматозоїдів, при цьому час пошкодження 50 % клітин визначає осмотичну резистентність сперматозоїдів коропа.

Використання більш доступного приладу (ФЕК) без застосування реактиву розширює можливість застосування заявленого способу в сільському господарстві.

Спосіб здійснюють таким чином.

Сперму поміщують у кювету з гіпотонічним розчином і постійно перемішують суспензію. За допомогою ФЕК реєструють залежність світлопропускання з часом та фіксують на папері з використанням самописця. Потім проводять її апроксимацію при значеннях часу, менших значення часу характерного перегибу кривої, та екстраполюють визначену функцію на значення часу, більші за значення характерного перегибу. Далі вказану залежність коригують у відповідності до реєстрованої залежності світлопропускання, обидві залежності виражають в термінах оптичної щільності та знаходять різницю оптичних щільностей та нормують її на 1. Таким чином, отримують криву, що характеризує зменшення концентрації непошкоджених сперматозоїдів у суспензії, тобто динаміку пошкодження сперматозоїдів, обумовлену осмотичним шоком.

Приклад

Сперму коропа (*Cyprinus carpio*) отримували у чистий сухий посуд. Під час проведення досліджень зберігали при температурі 15-18 °C у закритому посуді. Вимірювання проводили при температурі 18-20 °C.

В процесі вимірювання кювету (внутрішній розмір 10×10×44 мм) за допомогою мікродозатора наповнювали дистиллятом (3,6 мл) та занурювали мішалку, виставляли значення світлопропускання на відмітці 100 %, потім вмикали самописець.

5 Сперму за допомогою мікродозатора (54 мкл) додавали у кювету, швидко розмішували протягом 1-2 с та переміщували у кюветне відділення ФЕК. Вимірювання проводили при довжині хвилі світла 610 нм.

Як тільки зміна світлопропускання припинялась, вимірювання закінчували та ретельно промивали кювету.

10 Отримана крива є суперпозицією двох процесів - процесу набухання клітини, що відображується в зменшенні оптичної щільності, і процесу зменшення кількості непошкоджених клітин, що також призводить до зменшення оптичної щільності суспензії.

У першому наближенні криву зміни кількості клітин з часом можна отримати, знаючи різницю функцій оптичної щільності  $D_0(t)$  і  $D(t)$  від часу. При цьому,  $D(t)$  - динаміка оптичної щільності, що отримана експериментально та враховує вклад як набухання, так і зміни концентрації розсіювачів (фіг. 1), а  $D_0(t)$  - динаміка оптичної щільності суспензії, що отримана екстраполяцією  $D(t)$  при  $t < t_0$ , де  $t_0$  - час, при якому починають пошкоджуватися клітини, тобто динаміка, що враховує тільки набухання клітин. Різниця  $D_0(t) - D(t) = \Delta D_0(t) = C_0(t)\varepsilon l$ , тобто пропорційна концентрації частинок у середовищі, коефіцієнту екстинкції і ширині кювети. Вважаючи, що ширина кювети та коефіцієнт екстинкції незмінні,  $\Delta D(t)$  відображає зміну

20 кількості непошкоджених клітин.

Обробку результатів проводили наступним чином. Вводили значення світлопропускання суспензії  $T$  у таблицю на ПК через кожні 10 с інкубації (таблиця 1). За допомогою програми OriginPro проводили апроксимацію отриманих значень при  $t < 180$  с функцією виду  $T_0 = A - B \exp(-kt)$ , у якій в даному випадку коефіцієнти  $A$  і  $B$  мають зміст граничного значення

25 світлопропускання та діапазону його зміни, а коефіцієнт  $k$  - швидкості зміни світлопропускання.

Згідно з формулою  $D = \lg(1/T)$  розраховували відповідно  $D$  і  $D_0$ , звідки знаходили  $\Delta D = D_0 - D$  і  $C_0 = \Delta D_i / \Delta D_e \cdot 100\%$  ( $\Delta D_i$  - значення різниці оптичної щільності в кожний момент часу  $t_i$ ,  $\Delta D_e$  - значення різниці оптичної щільності в кінцевий момент часу  $t_e$ , - в даному прикладі при  $t = 480$  інкубації).

30 Отримані в першому наближенні значення  $C_0(t)$  містять відносно незначну помилку (декілька відсотків), пов'язану з тим, що отримана екстраполяцією функція  $T_0(D_0)$  змінюється при постійних значеннях  $T(t)$  ( $D(t)$ ), тобто згідно з моделлю  $T_0(D_0)$  визначає набухання 100 % клітин навіть тоді, коли відбувається їхнє пошкодження.

Для усунення вищезазначеного, у другому наближенні, враховується те, що величина зміни  $T_0(D_0)$  сперматозоїдів залежить від концентрації клітин у кюветі. Так, при  $t > t_0$ , зі зменшенням кількості непошкоджених клітин, величина зміни світлопропускання або оптичної щільності суспензії, отримана екстраполяцією  $D(t)$ , має зменшуватись відповідно. В результаті перетворювань маємо різницю  $D_1(t) - D(t) = \Delta D_1(t) \sim C_1(t)$ . Нормована крива, яка відображає динаміку пошкодження клітин, наведена на фіг. 2. Експериментальні значення апроксимували

40 функцією виду

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{(x-x_0)/dx}} + A_2.$$

( $A_{1,2}$  - початкове і кінцеве значення  $\Delta D_1(t)$ ,  $x_0$  - абсциса центра,  $dx$  - константа часу).

У таблиці 2 наведені дані, що демонструють перетворення функції  $D_0(t)$  до функції  $D_1(t)$ .

Спочатку знаходили  $\Delta D_R(t) = D_0(t_0) - D_0(t)$  при  $t > t_0$ . Ця залежність характеризує набухання 100 % непошкоджених клітин. Далі знаходили  $\Delta D_{RC}(t)$  як таблично задану функцію за наступним співвідношенням:

45

$$\Delta D_{RC}(t_i) = \Delta D_{RC}(t_{i-1}) + [\Delta D_R(t_i) - \Delta D_R(t_{i-1})] \frac{D(t_i) - D(t_e)}{D(t_0) - D(t_e)}$$

за умови  $\Delta D_{RC}(t_0) = 0$ .

Залежність  $\Delta D_{RC}(t)$  вже характеризує набухання тільки непошкоджених клітин у кожний

50 окремий момент часу.

Потім отримували  $D_1(t_i) = D_0(t_0) - \Delta D_{RC}(t_i)$ , звідки остаточно знаходили  $D_1(t) - D(t) = \Delta D_1(t)$  та  $C_1 = \Delta D_{1i} / \Delta D_{1e} * 100\%$ .

- 5 Вищезазначені перетворення ілюструють процес обробки експериментальної кривої світлопропускання суспензії інкубованих сперматозоїдів коропа та отримання кривої, що відображає динаміку пошкодження клітин.

Таблиця 1

t, c	T, %	T <sub>0</sub> , %	D	D <sub>0</sub>	ΔD	C <sub>0</sub> , %
0	15,2	15,39	0,8182	0,8128	-0,0054	0
10	17,7	17,77	0,7520	0,7502	-0,0018	0
20	20,2	20,00	0,6946	0,6990	0,0044	0
-	-	-	-	-	-	-
200	42,1	42,10	0,3757	0,3757	0,0000	0
210	42,8	42,70	0,3686	0,3696	0,0010	0,45
220	43,7	43,26	0,3595	0,3639	0,0044	2,00
230	44,3	43,78	0,3536	0,3587	0,0051	2,33
240	45,5	44,26	0,3420	0,3539	0,0120	5,42
-	-	-	-	-	-	-
350	76,2	47,87	0,1180	0,3199	0,2019	91,46
360	78,2	48,08	0,1068	0,3180	0,2112	95,69
370	79,5	48,28	0,0996	0,3162	0,2166	98,13
380	80,6	48,47	0,0937	0,3146	0,2209	100,08
390	81,3	48,64	0,0899	0,3130	0,2231	101,09
-	-	-	-	-	-	-
480	82,7	49,75	0,0825	0,3032	0,2207	100,00

Таблиця 2

t, c	D	D <sub>0</sub>	C <sub>0</sub> , %	ΔD <sub>R</sub>	ΔD <sub>RC</sub>	D <sub>1</sub>	AD <sub>1</sub>	C <sub>1</sub> , %
210	0,3686	0,3696	0,45	0,0000	0,0000	0,3696	0,001	0,40
220	0,3595	0,3639	2,00	0,0056	0,0056	0,3639	0,004	1,75
230	0,3536	0,3587	2,33	0,0108	0,0107	0,3588	0,005	2,09
240	0,3420	0,3539	5,42	0,0156	0,0152	0,3544	0,012	4,92
-	-	-	-	-	-	-	-	-
350	0,1180	0,3199	91,46	0,0496	0,0353	0,3343	0,216	86,03
360	0,1068	0,3180	95,69	0,0516	0,0355	0,3341	0,227	90,44
370	0,0996	0,3162	98,13	0,0533	0,0356	0,3340	0,234	93,25
380	0,0937	0,3146	100,08	0,0550	0,0356	0,3339	0,240	95,59
390	0,0899	0,3130	101,09	0,0565	0,0357	0,3339	0,244	97,07
-	-	-	-	-	-	-	-	-
480	0,0825	0,3032	100,00	0,0663	0,0357	0,3338	0,251	100,00

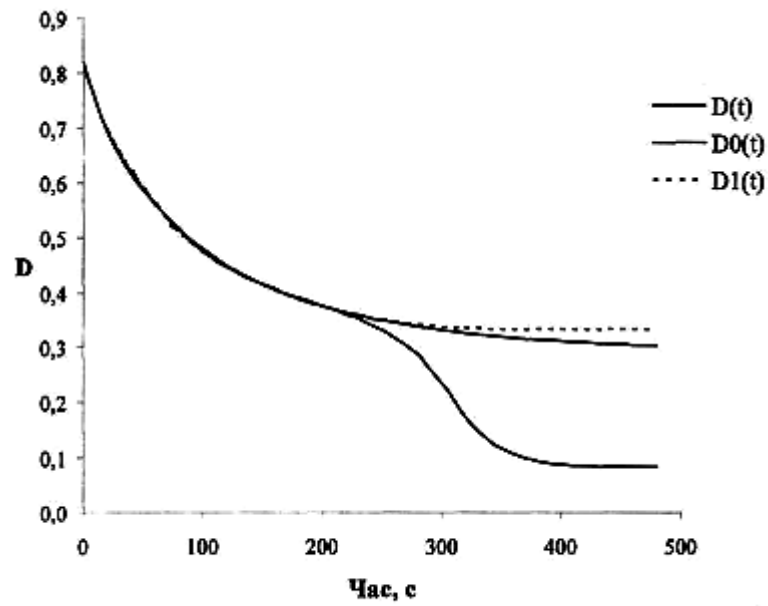
Джерела інформації:

- 10 1. Bobe J., Labbe C. Egg and sperm quality in fish // General and Comparative Endocrinology, 2010. - № 165. - P. 535-548.  
 2. Fauvel C. Evaluation of fish sperm quality / C. Fauvel, M. Suquet, J. Cosson // Appl. Ichthyol.- 2010. - V. 26. - P. 636-643.  
 15 3. Marian T., Krasznai Z. Hypo-osmotic shock induces an osmolality-dependent permeabilization and structural changes in the membrane of carp sperm // The Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 1993. - № 41 (2). - P. 291-297.

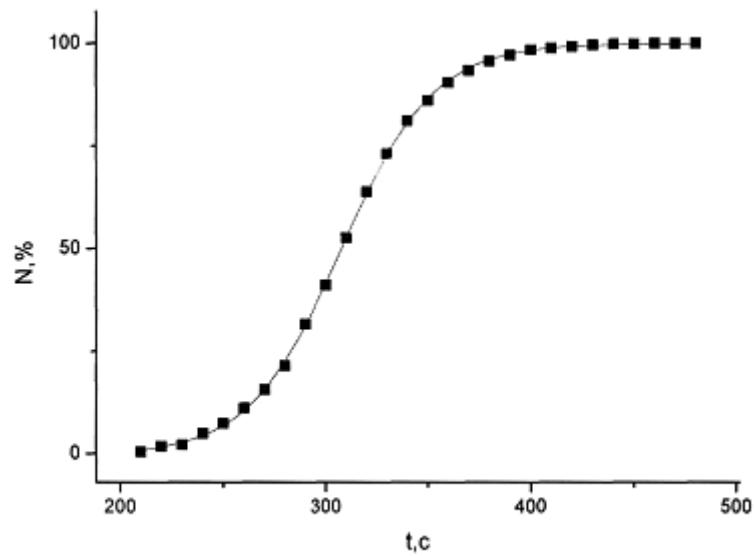
#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 20 Спосіб оцінки якості сперми коропа, який включає інкубацію клітин у гіпотонічному розчині, визначення динаміки пошкодження сперматозоїдів і їх осмотичної резистентності, який **відрізняється** тим, що при інкубації сперматозоїдів у гіпотонічному розчині за допомогою фотоелектроколориметра реєструють залежність світлопропускання суспензії клітин від часу,

звідки отримують динаміку пошкодження сперматозоїдів, при цьому час пошкодження 50 % клітин визначає осмотичну резистентність сперматозоїдів.



Фиг. 1



Фиг. 2

---

Комп'ютерна верстка М. Мацело

---

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

---

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601