

УДК 57.086.13

ВЛИЯНИЕ АКУСТИКО-МЕХАНИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НА РЕПРОДУКТИВНЫЕ КАЧЕСТВА СПЕРМЫ ОСЕТРОВЫХ РЫБ ПРИ КРИОКОНСЕРВАЦИИ

© 2022 г. Е. Н. Пономарева^{1,2}, М. М. Белая^{1,*}, А. В. Фирсова¹, А. А. Красильникова^{1,2}

Представлено академиком РАН Г.Г. Матишовым

Поступило 28.04.2022 г.

После доработки 09.05.2022 г.

Принято к публикации 09.05.2022 г.

Применение различных видов стимуляции сперматозоидов рыб с целью повышения выживаемости дефростированных клеток является перспективным направлением в области низкотемпературного консервирования. В статье впервые исследовано применение акустико-механического воздействия на сперму осетровых рыб, в частности, стерляди. Приведены технические характеристики собранной экспериментальной установки для акустико-механического воздействия на сперму рыб. В результате проведенных работ подобраны оптимальные параметры воздействия для повышения сохранения дефростированных репродуктивных клеток.

Ключевые слова: криоконсервация, репродуктивные клетки рыб, осетровые, акустико-механическое воздействие

DOI: 10.31857/S2686738922040126

Сохранение и поддержание численности популяций многих видов рыб в настоящее время возможны только с помощью искусственного воспроизводства, особенно это касается рыб с длинным циклом развития, таких как осетровые.

К настоящему времени на предприятиях по воспроизводству, восстановлению природных популяций рыб и фермах по товарному производству создают маточные стада, проводят искусственное оплодотворение икры и выращивают молодь, которую затем выпускают в естественные водоемы или используют для дальнейшего выращивания товарного продукта. Однако использование ограниченного количества производителей из маточного стада приводит к инбридингу (близкородственному скрещиванию) и негативным образом влияет на получаемое потомство.

В связи с этим перспективным направлением на сегодняшний день остается криоконсервация

репродуктивных клеток рыб с последующим использованием их в целях искусственного воспроизводства видов. Наличие криобанка репродуктивных клеток рыб позволяет сократить расходы на содержание недоброкачественных производителей, дает возможность использовать репродуктивные клетки в любое удобное время, а также проводить обмен образцами генетического материала между предприятиями.

В настоящее время разработаны методики низкотемпературного консервирования репродуктивных клеток, в частности спермы, достаточно большого количества рыб. Однако не всегда удается получать стабильные результаты по выживаемости дефростированных сперматозоидов, что указывает на необходимость проведения дальнейших исследований в этой области и определяет перспективность этого направления.

Одним из вариантов улучшения качества криоконсервированных репродуктивных клеток является воздействие на них в процессе низкотемпературного консервирования факторов различной природы (механических, химических, физических). В результате улучшается проникновение протекторов внутрь клеток, повышается их защитное действие, и, в конечном итоге, увеличивается процент выживаемости спермиев.

Большинство работ, направленных на использование различных воздействий на сперму для улучшения ее репродуктивных качеств, проведе-

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки “Федеральный исследовательский центр Южный научный центр Российской академии наук”, Ростов-на-Дону, Россия

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Донской государственный технический университет, Ростов-на-Дону, Россия

*e-mail: mashabogat@gmail.com



Рис. 1. Экспериментальная установка для акустико-механического воздействия на сперму рыб.

но на сельскохозяйственных животных. А.Н. Калгин (2008) [1] предлагает использовать одиночный кратковременный электроимпульс напряжением 1.5 В; Н.П. Кунденко (2012) [2] описывает установки на основе открытых резонаторов, образованных сферическим и плоским зеркалами, которые используются для воздействия акустическими колебаниями на микрообъекты животных перед их криоконсервацией; разработаны способ криоконсервации биологических образцов под давлением и устройство для его осуществления [3]. Ряд работ [4–6] посвящены воздействию ультразвуковых волн для оптимизации условий низкотемпературного консервирования спермы сельскохозяйственных животных.

В 2021 г. Южный научный центр Российской академии наук совместно с Донским государственным техническим университетом начал исследования по акустико-механическому воздействию на сперму рыб с использованием пьезоактуаторов.

Пьезоактуаторы – это специальные сверхпрецизионные короткоходные линейные электроприводы. Они преобразуют электрическую энергию в небольшое, но крайне точно контролируемое линейное перемещение с высоким развиваемым усилием. В основе принципа их действия лежит обратный пьезоэлектрический эффект, т.е. механическая деформация кристалла (пьезокерамики) при воздействии на него электрического поля. При этом осуществляется возвратно-поступательное движение или другие его виды.

Нами впервые предложено применение акустико-механического воздействия на замораживаемый материал, что, как мы считаем, позволит увеличить сохранность клеток во время двойного температурного шока. Это позволит ускорить проникновение криозащитных веществ через клеточные мембраны, предположительно снизив период эквilibрации, тем самым уменьшив вре-

мя взаимодействия клеток с токсичными криопротекторами, и повысить выживаемость. Биологические эффекты акустико-механических воздействий, проводимых в период эквilibрации, обусловлены, вероятно, изменением проницаемости мембран клеток сперматозоидов рыб, увеличивается скорость диффузии раствора криопротектора внутрь клеток, поток ионов K^+ из клетки вовне в результате облегчения пассивной диффузии и смещение глобул белков, расположенных на поверхности мембран.

Пьезоактуатор [7, 8] представляет собой круглую пластину диаметром 0.02 м. Пластина приклеена с внешней стороны по центру ко дну стандартного стеклянного лабораторного низкого градуированного стакана В-1-50 ХС. Стакан имеет следующие размеры: объем 50 мл, диаметр 38 ± 1.0 мм, высота 70 ± 2 мм.

Суспензия заполняет стакан примерно на одну треть его высоты и имеет температуру около $4^\circ C$. Эксперимент проводится при комнатной температуре (рис. 1).

Рабочим элементом пьезоактуатора является пьезоэлемент из пьезокерамики PZT-4 толщиной 0.003 м, предварительно поляризованный по толщине. Лицевые поверхности пьезоактуатора электродированы способом вжигания серебра и к ним подведены электрические провода. Толщины нанесенных электродов пренебрегаем ввиду их малости. Внешняя поверхность электродов покрыта эпоксидной смолой толщиной 0.001 м, выполняющей роль защитного слоя.

По электрическим проводам на электроды подается переменная разность потенциалов по гармоническому закону с амплитудой V_0 .

Дно стакана и пьезоэлемент образуют полупассивный биморф, поэтому приложение переменной разности потенциалов на электроды пьезоэлемента приводит к поперечным колебаниям дна емкости. Это вызывает установившиеся колебания пьезоактуатора и соответственно стакана. Создаваемое акустическое поле в суспензии в свою очередь приводит к акустическому воздействию на репродуктивные клетки рыб. При этом рабочей частотой является первая частота изгибных колебаний дна емкости.

В качестве объекта исследований использовали репродуктивные клетки самцов стерляди (*Acipenser ruthenus* Linnaeus, 1758) Биоресурсной коллекции редких и исчезающих видов рыб ЮНЦ РАН № 73602.

После получения половых продуктов самцов рыб и доставки их в лабораторию оценивают качество спермы. Для этого на предметное стекло помещают каплю спермы и смешивают с речной водой в соотношении 1 : 200. Под микроскопом оценивают процентное соотношение сперматозоидов с поступательным и колебательным дви-

жением по шкале Г.М. Персова, а также устанавливают время подвижности спермиев с помощью секундомера. Затем приступают к процессу криоконсервации: разбавление спермы криосредой в соотношении 1 : 1, эквilibрация в течение 40 мин, замораживание с применением программируемого замораживателя, хранение образцов в жидком азоте, размораживание и оценка качества дефростированного материала [9, 10].

При проведении экспериментальных работ перед эквilibрацией проводилось акустико-механическое воздействие с заданными параметрами.

Экспериментальная установка, предназначенная для возбуждения акустических волн в жидкостях, состоит из следующих элементов: пробирка с наклеенным на нее пьезоэлектрическим преобразователем, функциональный генератор сигналов Tektronix AFG 3022B, усилитель сигнала на основе пьезодрайверов и осциллограф LeCroy Wavesurfer 422. С помощью функционального генератора формируется синусоидальная волна с заданной частотой и амплитудой. Затем этот сигнал подается на усилитель и далее на пьезопреобразователь. Преобразователь представляет собой диск, изготовленный из пьезоэлектрического материала, который за счет пьезоэлектрического эффекта позволяет преобразовывать электрический сигнал в механические колебания. Последние, в свою очередь, передаются пробирке и жидкости, находящей внутри нее. Между преобразователем и усилителем подключен в параллель осциллограф, позволяющий контролировать выходные характеристики усиленного сигнала.

В экспериментах использовали следующие параметры акустико-механического воздействия на икру стерляди: 20 Гц (А), 500 Гц (В), 5.8 кГц (С), напряжение 10–15 В, время воздействия составило 1 мин. В результате улучшается проникновение криопротектора внутрь половых клеток и в конечном итоге после дефростирования качество спермы значительно повышается. Результаты представлены на рис. 2.

В результате акустико-механического воздействия на сперму стерляди отмечено, что разные параметры времени, частоты и длины волны могут оказывать как положительное, так и отрицательное влияние на репродуктивные качества дефростированных спермиев. Отмечено, что при увеличении времени воздействия выше 2 мин и частоты до 5 кГц и изменение длины волны приводит к высоким повреждениям клеток после дефростации.

Новый методологический подход к низкотемпературному консервированию репродуктивных клеток рыб с применением акустико-механического воздействия открывает большие возможности для создания новых эффективных методов глубокого замораживания.

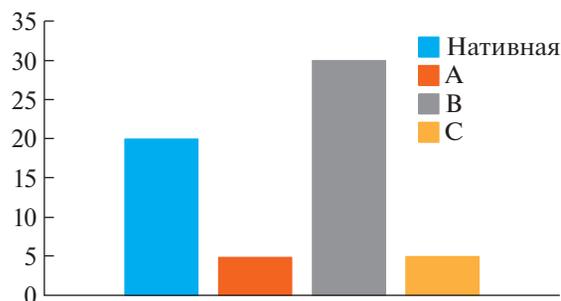


Рис. 2. Подвижность дефростированных сперматозоидов стерляди, %, 20 Гц (А), 500 Гц (В), 5.8 кГц (С), напряжение 10–15 В, время воздействия – 1 мин.

Таким образом, акустико-механическое воздействие можно применять для улучшения репродуктивных качеств спермы осетровых рыб, однако полученные результаты можно считать предварительными, требуется дальнейшее проведение исследований по оценке оплодотворяющей способности клеток после дефростации.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работы выполнены с использованием Биоресурсной коллекции редких и исчезающих видов рыб ЮНЦ РАН № 73602 при финансовой поддержке гранта РФ № 21-16-00118.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Калгин Д.Н. Эффективность активации подвижности спермиев рыб с помощью физико-химических стимуляторов в дефростированной семенной жидкости // Ветеринарная патология. 2008. № 2. С. 149.
2. Кунденко Н.П. Анализ характеристик открытого резонатора для измерения диэлектрической проницаемости жидких биологических веществ // Вісник національного технічного університету "ХІП". 2012. Вип. № 26/2012. С. 50–55.
3. Кобелев А.В., Пеньков Н.В., Гольтяев М.В., Бирюков С.В., Гагаринский Е.Л., Каурова С.А., Швирст Н.Э., Уграицкая С.В., Шишова Н.В., Фесенко Е.Е. Способ криоконсервации биологических образцов под давлением и устройство для его осуществления / Патент РФ на изобретение. 2018.
4. Шишова Н.В., Ескин Г.В., Комбарова Н.А., Пашовкин Т.Н., Федорова Е.В. Влияние ультразвуковой обработки на стабильность лактозо-глицерино-желточного разбавителя спермы и выживаемость сперматозоидов быка при криоконсервации // Проблемы биологии продуктивных животных. 2011. 4, спецвыпуск. С. 164–169.
5. Пиротти Е.Л., Михайлова Л.Н. Исследования проблемы воздействия ультразвуковых волн в процессе криоконсервации // Энергосбережение. Энергетика. Энергоаудит. 2012. № 11 (105). С. 62–65.

6. Кунденко Н.П., Михайлова Л.Н. Влияние низкоинтенсивных акустических колебаний в процессе криоконсервации // Энергосбережение. Энергетика. Энергоаудит. 2014. № 1 (119). С. 58–63.
7. Shevtsov S.N., Soloviev A.N., Parinov I.A., Cherpakov A.V., Chebanenko V.A. Piezoelectric Actuators and Generators for Energy Harvesting. Springer, 2018. P. 151–154.
8. Choi S.-B., Han Yo-M. Piezoelectric actuators: control applications of smart materials. CRC Press, 2010. P. 77–81.
9. Цветкова Л.И., Савушкина С.И., Титарева Л.Н., Докина О.Б., Пронина Н.Д. Методическое пособие по криоконсервации спермы карпа, лососевых и осетровых видов рыб. М.: ВНИИПРХ, 1997. 11 с.
10. Богатырева М.М. Оптимизация методов криоконсервации спермы для сохранения генофонда осетровых рыб: автореф. дис. канд. биол. наук: 03.02.06 / Астраханский государственный технический университет. Астрахань, 2010. 20 с.

INFLUENCE OF ACOUSTIC-MECHANICAL IMPACT ON THE REPRODUCTIVE QUALITIES OF STURGEON SPERM DURING CRYOPRESERVATION

E. N. Ponomareva^{a,b}, M. M. Belaya^{a,#}, A. V. Firsova^a, and A. A. Krasilnikova^{a,b}

^a Federal State Budgetary Institution of Science “Federal Research Centre The Southern Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences”, Rostov-on-Don, Russian Federation

^b Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education Don State Technical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

#e-mail: mashabogat@gmail.com

Presented by Academician of the RAS G.G. Matishov

The use of various types of stimulation of fish spermatozoa in order to increase the survival of defrosted cells is a promising direction in the field of low-temperature preservation. In the article, for the first time, the use of acoustic-mechanical effects on the sperm of sturgeons, in particular, sterlet, was studied. The technical characteristics of the assembled experimental setup for acoustic-mechanical effects on fish sperm are given. As a result of the work carried out, the optimal parameters of exposure were selected to increase the preservation of defrosted reproductive cells.

Keywords: cryopreservation, reproductive cells of fish, sturgeon, acoustic-mechanical impact