



УКРАЇНА

(19) UA (11) 60740 (13) U
(51) МПК (2011.01)
A61D 19/00
A61D 19/02 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ПРИСКОРЕНОЇ ОЦІНКИ ЯКОСТІ ЗАМОРОЖЕНО-ВІДТАЯНОЇ СПЕРМИ БУГАЇВ

1

(21) u201014999
(22) 13.12.2010
(24) 25.06.2011
(46) 25.06.2011, Бюл.№ 12, 2011 р.
(72) САВЕЛЬЄВА МАРИНА СЕРГІЇВНА, СУШКО
ОЛЕКСІЙ БОРИСОВИЧ
(73) ІНСТИТУТ ТВАРИННИЦТВА НАЦІОНАЛЬНОЇ
АКАДЕМІЇ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ

2

(57) Спосіб прискореної оцінки якості заморожено-відтаяної сперми бугаїв, що включає інкубування зразка у біологічному ультратермостаті та періодичне визначення рухливості сперми, який **відрізняється** тим, що при інкубації використовується температура 45 °С, а інтервали часу між визначенням рухливості складають 10 хвилин.

Корисна модель відноситься до галузі сільськогосподарства, а саме до відтворення великої рогатої худоби, та може використовуватись при оцінюванні якісних показників заморожено-відтаяної сперми бугаїв-плідників. В подальшому може використовуватись при штучному осіменінні корів.

Поширеним способом визначення якості глибоко замороженої сперми є встановлення її основних характеристик після деконсервації та інкубації при температурі тіла тварини, тобто 38°C. Сутність способу заключається у візуальній або комп'ютерній (програмній) оцінці сперми за допомогою мікроскопа у розплющеній краплині. При цьому визначають рухливість безпосередньо після відтавання, тобто процент сперміїв з прямолінійно-поступовим рухом [Осташко Ф.И. Харьковская технология асептического взятия и криоконсервации спермы быков-производителей: / НПС „Эмбрион” - Харьков, под ред. доктора биол. наук Осташко Ф.И., 1990. - 47 с.].

Недоліком цього методу є те, що показники сперми необхідно перевіряти кожну годину, рухливість протягом часу інкубації з певними інтервалами (1-2 години) між оцінкою. Після цього виводять показник абсолютної виживаності (сума множень показників рухливості сперматозоїдів на інтервал часу в годинах між дослідженнями до повної їх загибелі, виражена в умовних одиницях). Рухливість та виживаність є якісними показниками деконсервованої сперми, що визначається шляхом їх дослідження через кожні 60 хвилин за температури інкубування тіла тварини, тобто 38°C.

Найбільш близьким до заявленого матеріалу є спосіб визначення показнику якості деконсервованої

сперми - виживаність, як величини загального часу після відтавання, протягом якого сперма є життєздатною. Ці показники мають взаємозв'язок із результативністю штучного осіменіння, тому їх визначення передбачено нормативними документами (державними стандартами) [ГОСТ 26030-83 Сперма быков замороженная. Технические условия]. Перевірка зразка проходить наступним чином: деконсервують заморожено-відтаяну сперму у водяному термостаті за температури 38°C. Переносять краплину сперми до мікроскопу та перевіряють показник виживаності через кожну годину.

Недоліком цього методу є довготривалість визначення показників; (кілька годин) і сама процедура являється трудомісткою маніпуляцією. Причому визначення часу до повної загибелі сперміїв (виживаності) є найбільш тривалим процесом, але необхідним, так як даний критерій тісно пов'язаний з запліднюючою здатністю.

Критерієм придатності, згідно з методом найближчого аналога, є мінімальна виживаність деконсервованої сперми - 5,0 годин (300 хвилин).

В основу корисної моделі поставлено завдання - прискорити визначення якісних характеристик спермопродукції бугаїв з метою оцінки відповідності біоматеріалу вимогам для закладки на зберігання у кріобанк або використання для штучного осіменіння корів і телиць.

Поставлене завдання вирішується вдосконаленням методу оцінки якості сперми, що включає інкубування зразка у біологічному ультратермостаті та визначення рухливості сперми, причому при інкубації, згідно з корисною моделлю, використовується температура 45°C, а інтервали часу між визначенням рухливості складають 10 хвилин.

(19) UA (11) 60740 (13) U

Таким чином, з підвищенням температури інкубування з 38°C до 45°C, відбувається прискорення метаболічних процесів, що проходять в клітинах. На відміну від більш високих (47°C і вище) температур при гіпертермії 45°C не відбувається денатурації білків у клітині і миттєвої загибелі спермій, а лише наближується момент апоптозу (природної запрограмованої загибелі клітин). Такий підхід дає змогу диференціювати придатну до використання сперму від непридатної.

При запропонованому способі оцінки якості сперми виконуються ряд маніпуляцій. Спермодозу (облицьовану) відтаюють при температурі 38°C. Для подальших маніпуляцій з зразком сперми використовують термостатований шприц (фіг. 1). Термостатований шприц складається з наступних елементів: зовнішній циліндр (1), внутрішній циліндр (2), поршень (3), кришка зовнішнього циліндра (4), манжета (5), корка внутрішнього циліндра (6). Порожнина між зовнішнім та внутрішнім циліндром заповнена водою (водяна сорочка) (7). Сперма (8) розміщується в порожнині шприца.

Сперму набирають у попередньо підігрітий до температури 45°C шприц. При натискуванні на поршень, краплина сперми наноситься на предметне скло та переноситься до мікроскопа з підігрівальним столиком для першої оцінки. Повертають шприц зі спермою до ультратермостата з температурою 45°C та через кожні 10 хвилин послідовно здійснюють оцінку якості сперми. При маніпуляціях термостатований шприц не дає змоги спермі охолонути до кімнатної температури, коли біоматеріал виносять із ультратермостату для оцінки.

Оцінка сперми здійснюється при 150-кратному збільшенні. При цьому в практичній роботі оцінка може бути як візуальною (тобто з певною похибкою, пов'язаною з суб'єктивним фактором) так і за допомогою програмного забезпечення, наприклад програми «SpermVision» [Аппаратно-Програмный Комплекс ВидеоТест-Сперм, регистр. удостовер. № 29/20010702/6102-04].

В першому випадку якість деконсервованого зразка сперми оцінюють у балах (10 % спермій з прямолінійно-поступовим рухом дорівнює 1 балу), у другому - у відсотках. При застосуванні запропонованого методу прискореної оцінки, придатна для подальшого використання сперма, повинна мати показник мінімальної виживаності 50 хвилин, що відповідає 5 годинам за стандартною методикою. Як додатковий комплексний показник може бути

визначено показник абсолютної виживаності, який визначається за нижченаведеною формулою (1). Показник абсолютної виживаності визначений, за даною формулою при запропонованій методиці повинен становити не менше 6,0 умовних одиниць для деконсервованої сперми, придатної при подальшому використанні та штучному осіменінні корів і телиць.

$$Sa = a_0 \cdot \sum a_1 \cdot 0,17 + a_2 \cdot 0,17 \dots a_n \cdot 0,17 \quad (1)$$

де Sa - показник абсолютної виживаності

a_0 - рухливість сперми після деконсервації виражена в балах

a_1, a_2, a_n - активність сперми після інкубації при температурі 45°C через кожні 10 хвилин

0,17 - постійний коефіцієнт перерахунку з температури 45°C до температури 38°C

* при визначенні рухливості у відсотках, слід зробити перерахунок в бали за формулою (2)

$$a_{\text{бали}} = 0,1 \cdot a_{\text{проценти}} \quad (2)$$

Порівняльні випробування стандартного методу (найближчий аналог) і запропонованого показали, що він скорочує тривалість аналізу при визначенні за принципом альтернативності (придатна - непридатна) в 6 разів, а при визначенні показників виживаності до повної загибелі спермій в середньому у 4,7 рази (таблиця 1).

Нижче наведено графіки (фіг. 2), в яких показано динаміку зниження рухливості деконсервованих зразків сперми при інкубації за температури 38°C (найближчий аналог) та 45°C (запропонований метод).

Випробування запропонованого способу оцінки заморожено-відтаяної сперми було здійснено та використовується на експериментально-методичному племпідприємстві Інституту тваринництва УААН України, ДП «Сумському селекційному центрі». Перевірку деконсервованих зразків сперми, що попередньо були заготовлені за Харківською технологією асептичного отримання та кріоконсервації сперми бугаїв, що зберігалась в зрідженому азоті сперми бугаїв, проводили з використанням візуального методу та з застосуванням комп'ютеризованої системи Sperm Vision.

Як показали випробування, запропонований спосіб є технологічним у виконанні. Він дозволяє протягом робочого дня провести перевірку значної кількості спермопродукції (біля 100 серій), та може застосовуватися на племпідприємствах в якості експрес-тесту.

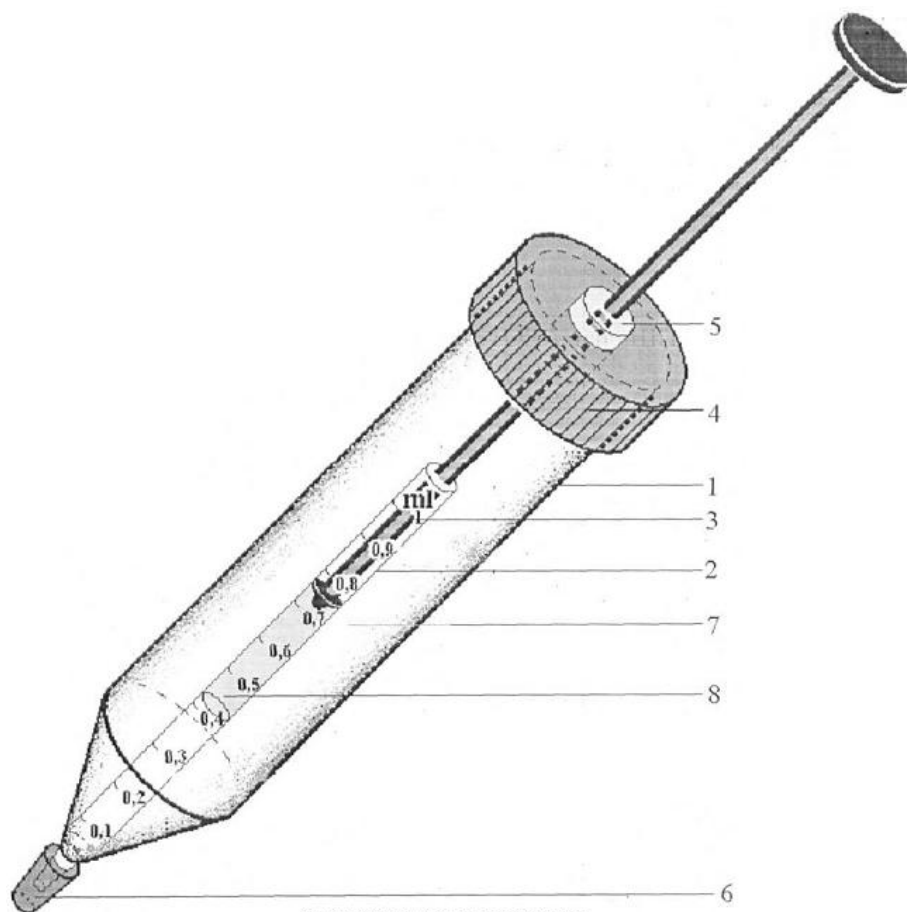
Таблиця 1

Придатність деконсервованої сперми до використання при штучному осіменінні за найближчим аналогом та запропонованим методам

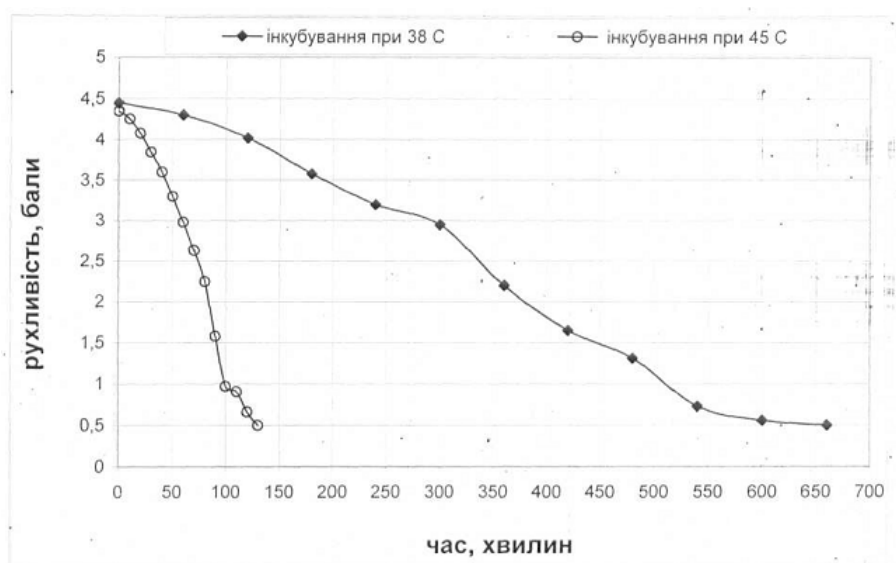
№ бугая	Кличка бугая	(найближчий аналог)		(заявлений метод)	
		Вживаність, при 38°C хвилин	Придатність сперми до подальшого використання	Вживаність сперми при 45°C, хвилин	Придатність сперми до подальшого використання
850	Козак	540	+	100	+
8116	Масив	600	+	140	+
0061	Сигнал	600	+	130	+
137	Лазар	480	+	100	+
065	Чирик	420	+	90	+
0061	Сигнал	660	+	120	+
065	Чирик	540	+	100	+
	Ліміт	660	+	130	+
8116	Масив	540	+	110	+
137	Лазар	540	+	120.	+
0061	Сигнал	180	-	20	-
0061	Сигнал	240	-	30	-
850	Козак	200	-	20	-

«+» - сперма, придатна до використання

«-» - сперма не придатна до використання



Фіг. 1. Термостатований шприц.



Фіг. 2. Вживаність деконсервованої сперми бугаїв при запропонованому та прототипному методах оцінки якості.