

Винахід відноситься до галузі сільського господарства, зокрема до штучного осіменіння тварин і може бути використано на племінних підприємствах, в біологічній промисловості і медицині.

Відоме кріопротективне середовище для сперми та спосіб його виготовлення (патент України № 13138) яке складається із 11%-ного розчину вуглеводу, гліцерину, яєчного жовтка і розчину перекису водню, як антисептика, а спосіб його виготовлення включає паралельне приготування маточного розчину середовища і розчину перекису водню, які змішують у реакторі в рівних об'ємах, герметизують в ампулах, прогрівають до 60-65°C, витримують 20-10 хвилин відповідно, охолоджують до кімнатної температури і зберігають до моменту використання, що забезпечує стерильність і довготривале зберігання середовища.

Недоліком відомого технічного рішення є складність процесу виготовлення середовища, додаткові затрати, що обумовлено введенням в нього розчину антисептика - перекису водню і необхідністю використання спеціального дорогого кошового реактора для забезпечення протікання реакції розпаду перекису і окислення атомарним киснем мікроорганізмів та їх знезараження.

Крім того, в процесі зберігання перекису водню він може знижувати свою антимікробну активність, що ускладнює точне його дозування за цими вимогами. При недостатці активності не забезпечується стерильність розбавлювача, а при передозуванні утворюються перекисні сполуки, які діють токсично на статеві клітини і знижують їх виживаність і запліднювальну здатність.

Поряд з цим при відомому способі виготовлення середовища, нераціонально використовується упаковка, що призводить до додаткових затрат під час зберігання і транспортування, а наявність в середовищі значної кількості води не дає можливості транспортувати середовища при температурах нижче -8°C, що обумовлено кристалізацією води і розтріскуванням скляних ампул з середовищем та його вибракуванням.

В основу винаходу поставлена задача удосконалити кріопротективне середовище для сперми і спосіб його виготовлення, в якому, зменшуючи кількість складових, забезпечується спрощення технологічного процесу з покращанням санітарної якості і запліднювальної здатності статевих клітин, збільшенням строку зберігання та зниженням матеріальних затрат.

Поставлена задача вирішується тим, що в кріопротективному середовищі для сперми і способі його виготовлення, виключаючому приготування розчинів і змішування компонентів: жовтка, вуглеводу та гліцерину, згідно винаходу, виключаючи приготування окремих розчинів вуглеводу та антисептика в реакторі, порошок вуглеводу вводять безпосередньо у жовток і додають, перемішуючи, гліцерин при наступному співвідношенні компонентів (в %):

Жовток	- 58-62,
Вуглевод	- 28-30,
Гліцерин	- 10-12.

Отриману концентровану суспензію розфасовують і герметизують в ампули, піддають термічній обробці при +80°C, охолоджують і зберігають до використання, а безпосередньо перед використанням суспензію додатково розріджують нагрітою до +80°C бідистильованою водою до рівня осомолярності стандартного середовища.

Такий склад середовища і спосіб його виготовлення забезпечує ефективну стерилізацію розбавлювача, його зберігання до 5 років і усунення токсичної дії на статеві клітини при консервуванні.

Це пояснюється тим, що основні компоненти середовища такі, як цукроза і гліцерин у високих концентраціях діють на мікроорганізми бактеріостатично, що базується на осмотично-дифузійному процесі, який призводить до зневодження бактеріальних клітин і порушення у них метаболічних реакцій, що призупиняє подальший ріст і розмноження мікроорганізмів, а додаткова обробка концентрованих середовищ високими температурами в свою чергу проявляє корисну синергічну бактерицидну дію, і як наслідок - отримання стерильних середовищ, що забезпечує довготривалий їх строк зберігання, без додаткових матеріальних затрат.

Крім того цукроза і гліцерин у високих концентраціях виконують роль антифризів, що значно знижує температуру кристалізації суспензії розбавлювача і підвищує температурну точку денатурації жовтка. Це створює ідеальні умови для довготривалого зберігання концентрованого кріопротективного середовища.

Приклади конкретного виконання.

Приклад 1.

Згідно винаходу для виготовлення 1000мл середовища взяли 250мл. нативного жовтка і додали до нього 120гр дисахариду цукрози в порошок. Розмішали компоненти до повного розчинення цукрози у жовтку і утворення гомогенної суспензії. При цьому концентрація цукрози у жовтку склала 30%. В отриману суміш внесли 50мл гліцерину, концентрація якого в суміші склала 18,5%. Отриману концентровану суспензію об'ємом 420 мл розфасовували у скляні ампули, які запаяли на полум'ї газової горілки і прогріли у водяній бані при +80°C на протязі 10 хвилин. Ампулу охолодили до кімнатної температури, зберігали в цих умовах на протязі 5 років.

Після такого строку зберігання, до 420мл концентрату додали 580мл. дистильованої води і розділили суспензію до потрібної концентрації компонентів у 1000 мл, яка відповідала концентрації їх у стандартному кріопротективному середовищі для консервування сперми бугаїв, тобто:

жовток	- 250мл,
цукроза	- 120г,
гліцерин	- 50мл,
вода дистильована	- 580мл.

Приклад 2.

Контрольне середовище готували згідно прототипу. Взяли навіску лактози – 69,3г, засипали її в мірний циліндр і розчинили до об'єму 130мл бідистильованою водою. До отриманої суміші додали 300мл нативного жовтка, 70мл гліцерину, змішали і одержали 500мл розчину №1. Паралельно з цим в другий мірний циліндр залили бідистильовану воду об'ємом 500мл і додали до неї 1мл 33%-го розчину перекису водню, як антисептика. Отримані розчини залили послідовно в спеціальний реактор для розпаду перекису водню і санації розбавлювача. Через 1 годину отриманий розбавлювач об'ємом 1 літр розфасували у скляні ампули, які запаяли на полум'ї газової горілки і прогріли у водяній бані при 65°C на протязі 10 хвилин. Після цього ампули з середовищем охолодили до кімнатної температури і зберігали у цих умовах паралельно з дослідною партією розбавлювача.

В процесі зберігання середовища визначали такі показники: об'єм середовища підлеглого зберіганню і транспортуванню споживачу, ступінь концентрації розбавлювача, потреба в ампулах для зберігання і транспортування розбавлювачів використане обладнання і реактиви для виготовлення, затрати часу на використання, температура кристалізації розбавлювачів, строки придатності до використання, виживаність сперми при її глибокому заморожуванні у розбавлювачі та запліднювальну здатність деконсервованої сперми.

Результати використань наведені у таблиці.

Таблиця

Показники	Винахід	Прототип	Різниця
1. Об'єм середовища	420	1000	580
2. Ступінь концентрування	2,3	0	2,3
3. Потреба в ампулах для зберігання і транспортування (шт.)	8,4	20	11,6
4. Додаткове обладнання для виготовлення реактивів	-	Реактор+перекис водню	-
5. Затрати часу на виготовлення 1 л середовища	10	60	50
6. Температура кристалізації середовища	-20°C	-8°C	12°C
7. Термін придатності середовища, роки	5	2	3
8. Виживаність спермій при кріоконсервації у середовищі, %	50	42	8
9. Заплідненість корів при штучному осіменінні спермою законсервованою у кріопротективному середовищі (після першого осіменіння, %)	82	65	17

Таким чином, запропоноване кріопротективне середовище для консервування сперми плідників та спосіб його приготування і використання у порівнянні з прототипом має наступні переваги:

- відпадає необхідність у придбанні і використанні антисептика перекису водню і спеціального реактора;
- в 2,5 рази скорочуються затрати на придбання скляних ампул а також на зберігання і транспортування виготовлених середовищ при зниженні затрат праці;
- виключається можливість порушення герметичності скляних ампул з середовищем (розтріскування) за рахунок зниження точки кристалізації розбавлювача;
- досягається збереження початкових санітарних і біологічних властивостей середовища протягом п'яти років (цей ефект досягнуто вперше);
- підвищується виживаність і запліднююча здатність спермій на 17% за рахунок усунення токсичного і мікробного факторів;
- підвищується температурна точка денатурації жовтка, що дає можливість використовувати більш високі температури для стерилізації середовища і забезпечити надійну стерилізацію.