

Винахід відноситься до штучного осіменіння сільськогосподарських тварин, а саме до способів заморожування сперми і може використовуватись на племпідприємствах.

Найбільш близьким по технічній суті до заявляемого способу є спосіб заморожування сперми тварин.

Відомий спосіб заключається в розбавленні свіжоодержаної сперми кріоконсервантом, еквілібрації і заморожуванні в парах рідкого азоту на фторопластовій пластині.

Суттєвим недоліком відомого способу є те, що спосіб не забезпечує високий вихід замороженовідтятих клітин, тобто клітини мають недостатню для цього способу стійкість до заморожування (кріорезистентність). Ця низька кріорезистентність виявляється в тому, що в процесі заморожування і відтаювання гине значна частина клітин (30-70%), порушуються їх мембранні структури, знижуються показники рухливості і виживаємості відтятих сперми І, що саме важливе, П запліднююча здатність.

Винахід вирішує задачу - підвищення кріорезистентності спермій при кріоконсервації сперми сільськогосподарських тварин.

Задача вирішується тим, що сперму на стадії еквілібрації чи заморожування, або послідовно на стадіях еквілібрації і заморожування обробляють електромагнітним випромінюванням міліметрового діапазону радіохвиль (КВЧ-випромінювання) безперервної або імпульсної генерації. Тобто КВЧ-обробка сперми може бути одноразовою, охолодженою до +2°C (при еквілібрації) чи замороженою при -196°C, або дворазовою - спочатку при еквілібрації перед заморожуванням, а потім відразу після заморожування в рідкому азоті.

КВЧ-випромінювання діє безпосередньо на спермії, їх мембрани, характерною особливістю його є "резонансний" характер дії. В медицині КВЧ-випромінювання застосовується для терапевтичної корекції фізіологічного стану організму при деяких патологічних змінах. При кріоконсервації сперми відбуваються деструктивні зміни мембранного апарату клітин як на клітинному, так і на молекулярному рівні. При використанні КВЧ-опромінення "резонансними" для спермій частотами відбувається корекція деяких кріогенних порушень, в результаті чого біологічний ефект проявляється як підвищення їх кріорезистентності (тобто стійкості до заморожування). Так, після відтаювання сперми, замороженої заявляемым способом (з використанням КВЧ-опромінення), спостерігається підвищення, порівняно з прототипом, рухливості спермій на 20-30%, їх життєздатності, яка оцінюється показниками виживаності - на 30-50% і запліднюючої здатності - на 10,7%.

Заявляемый спосіб здійснюється таким чином:

Розбавлену сперму охолоджують до температури +2-4°C і витримують в холодильнику до 5 годин. В процесі еквілібрації сперму обробляють КВЧ-випромінюванням в режимі безперервної чи імпульсної генерації, а потім заморожують і залишають на зберігання або розбавлену і охолоджену загальноприйнятим способом сперму заморожують і відразу обробляють КВЧ-випромінюванням в режимі безперервної чи імпульсної генерації, а потім залишають на зберігання, або розбавлену сперму охолоджують і обробляють КВЧ-випромінюванням в режимі постійної чи імпульсної генерації, потім заморожують і знову обробляють КВЧ-випромінюванням в тому ж режимі, а потім залишають на зберігання.

Обробку сперми КВЧ-випромінюванням здійснювали апаратом для КВЧ-терапії "Електроніка - КВЧ 101", який розроблений в НПО "Сатурн" і назначений для реалізації безмедикаментозної КВЧ-терапії цілого ряду соматичних захворювань людини шляхом локальної дії на рецепторні поля, рефлексогенні зони або точки акупунктури низькоінтенсивним (менше 10 мВт/кв.см) електромагнітним випромінюванням (ЕМІ) надвисоких частот (КВЧ).

Технічна характеристика

Робота на фіксованій частоті ЕМІ КВЧ-діапазону в режимі безперервної генерації (БГ), ГГц	-60,1+2,1
Робота на фіксованій частоті ЕМІ КВЧ-діапазону в режимі імпульсної генерації (ІГ) з частотою проходження імпульсів, Гц	- 5 або 45
Робота на фіксованій частоті ЕМІ КВЧ-діапазону в режимі БГ чи ІГ з часовою маніпуляцією, с	- 6 до 11
Електроживлення, В, Гц	- 220, 50
Електроспоживання, ВА	- не більш 10
Маса, кг	- менш 3,5

Приклади конкретного виконання

Дослідження проводили на спермі бугаїв-плідників чорно-рябої породи, які належать Київському обплемпідприємству. Взяття і оцінку якості сперми проводили згідно "Инструкции по организации и технологии работы станций и предприятий по искусственному осеменению с /х животных" (М., "Колос", 1981) ИДЕСТ 20909.4-75. Сперма быков неразбавленная. Метод биологических исследований. - М. Изд-во стандартов, 1975, с. 12-22; ДЕСТ 23745-79. Сперма быков неразбавленная, свежеполученная. - М. Изд-во стандартов, 1979, с. 3; ДЕСТ 26030-83. Сперма быков замороженная. - М. Изд-во стандартов, 1984, с. 4.

Приклад 1, Свіжевідбрану сперму розбавляли кріозахисним лактозогліцериножовтковим (ЛГЖ) середовищем і в пеніцилінових флакончиках ставили в холодильник при +2-4°C на еквілібрацію. Під час

еквілібрації сперму обробляли КВЧ-випромінюванням безперервної генерації з часом маніпуляції 11 сек (БГ - 11 сек) на відстані 4-5 см від верхнього рівня сперми, Після еквілібрації проби сперми заморожували в формі необлицьованих гранул в парах рідкого азоту і потім залишали на зберігання. Паралельно, розділені еякуляти тих же бугаїв охолоджували і заморожували відомим способом - контроль. В відтаяній спермі визначали рухливість і виживаємість спермій, як основні показники, що виражають П життєздатність. Результати представлені в табл. 1.

Приклад 2. Свіжевідібрану сперму розбавляли кріоконсервантом (ЛГЖ-середовище) поміщали в пеніцилінові флакони. Розбавлену сперму охолоджували в холодильнику при $t +2-4^{\circ}\text{C}$ протягом 5 годин. Під час еквілібрації проводили обробку КВЧ-випромінюванням імпульсної генерації

з частотою Імпульсу - 5 Гц і часом модуляції 11 сек (ІГ - 11 сек - 5 Гц). Час обробки становив 40 сек. Після еквілібрації сперму заморожували в формі гранул і залишали на зберігання.

В відтаяній спермі визначали рухливість і виживаємість сперми. Результати розміщені в табл. 1.

Приклад 3. Свіжевідібрану сперму розбавили кріозахисним середовищем, охолодили в холодильнику до $+2-4^{\circ}\text{C}$ протягом 5 годин і заморожили в парах рідкого азоту в формі необлицьованих гранул об'ємом 0,2 мл. Заморожені гранули поміщали в чашки Петрі діаметром 90 мм і в рідкому азоті (висота азоту над гранулами 10-20 мм) обробляли КВЧ-випромінюванням. КВЧ-обробку проводили при допомозі рупору, розміщеного на висоті 110 мм від заморожених гранул. Результати обробки замороженої сперми КВЧ-опроміненням імпульсної генерації (ІГ-11 сек - 5 Гц) розміщені в таблиці 2.

Приклад 4. Свіжеодержану сперму бугаїв розбавляли ЛГЖ-середовищем, охолоджували в холодильнику до $+2-4^{\circ}\text{C}$. В процесі охолодження (еквілібрації) проводили КВЧ-обробку розбавленої сперми. Після 5 годинної еквілібрації сперму заморожували в необлицьованих гранулах і гранули знову обробляли КВЧ-випромінюванням. Результати аналізу на рухливість і виживаємість спермій розміщені в табл. 2.

Також була проведена перевірка запліднюючої здатності сперми, замороженої заявляємим і відомим способами.

Дослідження проводились на телицях, які належать радгоспу "Вишеньківський" Бориспільського району Київської області. Заморожування і КВЧ-обробку сперми проводили на Київському племпідприємстві.

При заморожуванні еякулят бугая "Зайчик" ділили на дві частини: I частина - контроль, заморожували відомим способом; II частина - дослід - заморожували заявляємим способом (з дворазовою обробкою КВЧ-випромінюванням в режимі ІГ - 11 сек - 5 Гц). Після оцінки і карантину сперма доставлялась в господарство, де була використана для штучного осіменіння телиць. Всього було осіменено 153 телиці, із них контрольною спермою 80 голів і дослідною - 73 голови. Запліднюваність телиць визначали за результатами ректальних досліджень через 90-120 днів після осіменіння. В контрольній групі запліднилось 55 голів (68,7%), в дослідній - 58 голів (79,4%).

Викладені в прикладах результати свідчать про те, що обробка КВЧ-опроміненням сперми, яка знаходиться в стані часткового ($+2-4^{\circ}\text{C}$) або повного (-196°C) анабіозу значно підвищує кріорезистентність сперми. Це проявляється таким чином:

1. В більш високій рухливості відтаяних спермій на 20-30% (табл. 1; 2) при статистично значимій різниці ($p < 0,05$), що свідчить про більш високу їх стійкість до процесів заморожування і відтаювання.

2. В підвищеній життєздатності відтаяних спермій. Так, виживаємість спермій, заморожених заявляємим способом вища на 1,5 години в порівнянні з спермою, замороженою відомим способом (табл. 2). Абсолютний показник виживаємості підвищується в цьому випадку на 50-62% ($p < 0,02$).

3. В підвищеній запліднювальній здатності сперми, замороженої заявляємим способом в порівнянні з прототипом на 10,7%.

Таким чином, заявляємий спосіб кріо-консервації виявляється більш ефективним в порівнянні з прототипом.

Т а б л и ц я 1

Якість заморожено-відтаяної сперми при її КВЧ-обробці на стадії еквілібрації

Режим КВЧ-обробки	Якість сперми		
	Рухливість, бали	Вживаємість	
		час, годин	абсол. показник ум. один.
Контроль (без обробки)	$4,0 \pm 0,298$	$5,0 \pm 0,788$	$16,5 \pm 3,21$
БГ - 11 сек	$5,2 \pm 0,354$	$6,4 \pm 0,749$	$23,0 \pm 3,18$
Різниця до контролю %	+30	+28	+39
ІГ - 11 сек - 5 Гц	$5,0 \pm 0,366$	$5,6 \pm 0,489$	$20,0 \pm 3,17$
Різниця до контролю. %	+20	+8	+12

Т а б л и ц я 2

Якість заморожено-відтаяної сперми бугаїв при використанні КВЧ-обробки

Технологічні етапи обробки	Якість сперми		
	Рухливість, бали	Вживаємість, годин	Абсол. показник вживаємості, ум. один.
Контроль (без обробки)	$3,75 \pm 0,214$	$2,83 \pm 0,28$	$7,83 \pm 0,98$
Одноразова обробка на етапі за- морожування	$4,5 \pm 0,218$	$3,67 \pm 0,615$	$11,67 \pm 1,05$
Різниця до контролю, %	+20	+30	+50
Дворазова обробка (при еквілібрації і заморожуванні)	$4,8 \pm 0,190$	$4,17 \pm 0,470$	$12,68 \pm 1,34$
Різниця до контролю, %	+32	+47	+62