



УКРАЇНА

(19) UA (11) 12861 (13) U
(51) МПК (2006)
A61D 19/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ КАПАЦИТАЦІЇ СПЕРМИ

1

2

(21) u200504387

(22) 10.05.2005

(24) 15.03.2006

(46) 15.03.2006, Бюл. № 3, 2006 р.

(72) Мадіч Алла Всеволодівна, Гевкан Іван Іванович, Штапенко Оксана Всеволодівна, Сливчук Юрій Іванович

(73) ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ТВАРИН УКРАЇНСЬКОЇ АКАДЕМІЇ АГРАРНИХ НАУК

(57) Спосіб капацитації сперми, що включає розморожування сперми в середовищі Тіроде, відмивання від розріджувача, кріопротекторів та деструктивних елементів центрифугуванням в середовищі TALP, флотацію з 2-разовим центрифугуванням у тому ж середовищі протягом 10 хвилин при 1000 об/хв. після витримки у термостаті

при $t=38,5^{\circ}\text{C}$ з 5 % CO_2 протягом 1 години та визначення концентрації спермій, який **відрізняється** тим, що відмивання розмороженої сперми перед флотацією здійснюють у великому (до 5 мл) об'ємі середовища TALP, поділяють одержаний центрифугат на 4 флотаційні об'єми і центрифугують кожний з них в аналогічному режимі і після видалення супернатантів піддають флотації в термостаті з наступним центрифугуванням об'єднаних в одній пробірці верхніх шарів рідини з живими рухомими сперміями, при цьому одержаний центрифугат з додаванням середовища TALP витримують в термостаті для розправлення спермій протягом 10 хвилин, центрифугують і визначають концентрацію спермій підрахунком у камері Горяєва.

Корисна модель належить до галузі репродуктивної біотехнології, зокрема, до технології запліднення ооцитів in vitro при одержанні ранніх ембріонів тварин, а саме до способів підвищення активності і запліднюючої здатності сперми. Спосіб може бути застосований у біотехнологічних і селекційно-генетичних центрах, у господарствах з різними формами власності для використання in vitro-технологіях.

Відомий спосіб капацитації сперми для запліднення in vitro ооцитів тварин [Parrish J.J., Susko-Parrish J.L., Leifried-Rutledge M.L., Critser E.S., Eyestone W.H., First N.L. Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen //Theriogenology. - 1986. - V25. -P. 591-600], полягає у нашаровуванні середовища TALP на розморожені і змішанні в один об'єм 2 гранули сперми, флотації спермій (процедура swim-up ґрунтується на піднятті активної сперми у верхні шари середовища) протягом 1 години у термостаті при $t=38,5^{\circ}\text{C}$ і 5% CO_2 та дворазовим центрифугуванням.

Недоліком цього способу є те, що розморожена сперма без очищення піддається процедурі флотації і лише через 1 годину центрифугується, а це в свою чергу приводить до наявності у фракції спермій зі зниженою активністю. Найбільш близьким по суті до способу, що заявляється, є спосіб капацитації сперми [Schneider C.S., Ellington J.E., Wright R.W.Jr. Relationship between bull field fertility

and in vitro embryo production using sperm preparation in vitro embryo production using sperm preparation methods with and without somatic cell coculture //Theriogenology. -1999. -V51. -N6. -P.1085-1098.], який полягає у попередньому 2-разовому відмиванні розморожених гранул еякуляту від розбавника та мертвих спермій і клітинних уламків центрифугуванням при 1000об/хв протягом 10 хвилин, флотацією сперми протягом 1 години та центрифугуванням в аналогічному режимі після флотації.

Недоліком цього способу є те що, очищену від уламків клітин та мертвих сперматозоїдів сперму піддають процедурі флотації в малому об'ємі середовища, що недостатньо для високого ступеня очистки та одержання сперми високої активності.

Заявлений нами спосіб усуває недоліки найближчого аналогу і дозволяє підвищити активність капацитованої сперми та досягти високого ступеня її очистки.

В основу корисної моделі поставлено завдання розробити спосіб капацитації сперми, спрямований на отримання сперми з високою активністю та достатнім ступенем очистки.

Технічний результат досягають тим, що відмивання розмороженої сперми перед флотацією здійснюють у великому (до 5мл) об'ємі середовища, при цьому одержаний центрифугат поділяють на 4 флотаційні об'єми і центрифугують кожний з

(19) UA (11) 12861 (13) U

них в аналогічному режимі, а після видалення супернатантів піддають флотації в термостаті з наступним центрифугуванням об'єднаних в одній пробірці верхніх шарів рідини з живими рухомими сперміями, при цьому одержаний центрифугат з додаванням середовища TALP витримують в термостаті для розправлення спермій протягом 10 хвилин, центрифугують і визначають концентрацію спермій підрахунком в камері Горяєва.

Збільшення об'єму середовища для відмивання сперми від еякуляту, розбавника, кріопротекторів та деструктивних елементів забезпечує більш якісне очищення сперматозоїдів від мертвих клітин та їх уламків.

Розділення одержаного центрифугату на 4 флотаційні об'єми здійснює більш повне очищення сперми від слаборуслих та нежиттєздатних спермій. Розправлення спермій забезпечення внесення проб у термостат на 10 хвилин після центрифугування Визначення концентрації спермій в камері Горяєва дозволяє більш точно визначити їх кількість та якість.

Отже, використання зазначеного способу капітації, модифікованого за рахунок удосконалення методичних прийомів, дозволяє отримати фракцію сперми для *in vitro* запліднення, яка за показниками рухливості й активності не поступається нативній і містить до 90% живих спермій.

Відомості, що розкривають суть корисної моделі.

При проведенні патентно-інформаційного пошуку заявником і авторами знайдено технічне рішення [Schneider C.S., Ellington J.E., Wright R.W.Jr. Relationship between bull field fertility and *in vitro* embryo production using sperm preparation methods with and without somatic cell co-culture //Theriogenology. -1999.-V51. -N6. -P. 1085-1098], що містить найбільшу кількість суттєвих ознак, спільних із заявленим рішенням розморожування сперми в середовищі Тіроде, відмивання від розбавника, кріопротекторів та деструктивних елементів центрифугуванням в середовищі TALP, флотацією дворазовим центрифугуванням в тому ж середовищі протягом 10хв при 1000об/хв після витримки в термостаті протягом 1 години при температурі 38,5°C та визначення концентрації спермій.

Однак, наявність зазначених, спільних з найближчим аналогом суттєвих ознак недостатньо для одержання технічного результату, який забезпечує заявлений спосіб. Технічних рішень, які б за сукупністю ознак повністю співпадали з заявленим технічним рішенням - не виявлено. Це дозволяє зробити висновок про відповідність заявленого технічного рішення критерію корисної моделі - "новизна".

В патентній і науково-технічній інформації не знайдено технічних рішень, в яких були б описані відомості про ознаки, що відрізняють заявлений спосіб від найближчого аналогу і забезпечують досягнення технічного результату: відмивання розмороженої сперми перед флотацією здійснюють у великому (до 5мл) об'ємі середовища TALP, розділяють одержаний центрифугат на 4 флотаційних об'ємі, центрифугують кожний з них в ана-

логічному режимі і після видалення супернатантів піддають флотації в термостаті і наступному центрифугуванню об'єднаних в одній пробірці верхніх шарів рідини з живими рухомими сперміями, при цьому одержаний центрифугат з додаванням середовища TALP витримують в термостаті для розправлення спермій протягом 10 хвилин, центрифугують в стандартному режимі і визначають концентрацію сперми підрахунком в камері Горяєва.

Заявлений спосіб здійснюють наступним чином:

1. До розмороженої сперми баранів (2 гранули) загальним об'ємом 0,440мл додавали 5мл TALP і центрифугували 10 хвилин при 1000об/хв для відмивання спермій від розбавника еякуляту, кріопротекторів та деструктивних елементів.

2. До центрифугату (1/3 об'єму V=2мл) додають 4мл TALP і розділяють весь об'єм на 4 флотаційні об'єми - ($V_1=V_2=V_3=V_4=1,5\text{мл}$) і центрифугують в другий раз в аналогічному режимі.

3. Супернатант видаляють, до центрифугату (1/3 об'єму V=0,5мл) додають 1мл середовища для капітації TALP і витримують у термостаті при 38,5°C 1 годину для флотації активних спермій під час якої відбувається їх капітація.

4. З кожної пробірки обережно відбирають верхній шар рідини (2/3 об'єму, тобто 1мл середовища) з живими рухливими сперміями.

5. Всі проби змішують в одній пробірці (Vзаг=4мл) і центрифугують 10 хвилин при 1000об/хв.

6. До центрифугату 1мл додають 1мл TALP і витримують у термостаті при t=38,5°C з 5% CO₂ 10 хвилин для "розправлення" спермій.

7. Після цього в пробірку вносять ще 4мл TALP (Vзаг=6мл) і центрифугують 10 хвилин при 1000об/хв. Супернатант видаляють. До центрифугату, який є суспензія капітивованої сперми (1/3 об'єму V=2мл) додають 50мл середовища для запліднення ооцитів (Vзаг=50мл) і визначають концентрацію сперми у камері Горяєва.

Приклади конкретного використання способу.

Для перевірки технології та підтвердження переваги заявленого способу перед відомими нами досліджено вплив різних способів капітації сперми з визначенням їх ефективності.

Дослід проведено в умовах лабораторії репродуктивної біотехнології Інституту біології тварин УААН на розмороженій спермі баранів породи саффордк спермосховища Грядя.

В якості контролю (аналог) використовували спосіб капітації сперми за [Parrish I.J. et al 1986], який полягає у послідовних процедурах:

1. На розморожену сперму (2 гранули), змішану в одному об'ємі, зверху обережно нашарували 1мл розчину для капітації TALP (розчин Тіроде + 0,11мкг/мл Na-піруват + 0,06г/мл BSA (5-та фракція) + Са-лактату + 47мкг/мл гепарину).

2. Проводили флотацію і капітацію сперми у термостаті протягом 1 години при t=38,5°C з 5% CO₂ у повітрі.

3. Верхній шар з живими сперміями (0,7мл, тобто 1/2 об'єму) відбирали мікродозатором, додавали 4мл середовища TALP та центрифугували 10 хвилин при 1000об/хв. Видаляли супернатант,

додавали 5мл TALP і знову центрифугували при 1000об/хв протягом 10 хвилин.

4. Видаляли супернатант. До центрифугату, який є суспензія капацированої сперми (1/3 об'єму V=2мл) додають 50мл середовища для запліднення ооцитів (Vзаг=50мл) і визначають концентрацію сперми у камері Горяєва.

Як найближчий аналог у 1-ій дослідній групі використовували спосіб капацизації сперми за [Schneider C.S., Ellington J.E., Wright R.W.Jr. Relationship between bull field fertility and in vitro embryo production using sperm preparation in vitro embryo production using sperm preparation methods with and without somatic cell co-culture //Theriogenology. -1999. -V51. -N6. -P. 1085-1098], згідно з яким сперму обробляли по наступній схемі:

1. Сперму (2 гранули) розморожували у теплом середовищі Тіроде в одній центрифужній пробірці, додавали 5мл середовища для капацизації TALP та центрифугували 10 хвилин при 1000об/хв для відокремлення еякуляту від розбавника, кріопротекторів та деструктивних елементів.

2. До центрифугату (2мл, тобто 1/3 об'єму) додавали 4мл свіжого TALP і проводили друге центрифугування в аналогічному режимі.

3. Супернатант видаляли, а до центрифугату (2мл, тобто 1/3 об'єму) додавали 1мл середовища для капацизації TALP і витримували у термостаті 1 годину при t=38,5°C з 5% CO₂ у повітрі для флотації.

4. З пробірки обережно відбирали верхній шар рідини (2мл, тобто 2/3 об'єму) з живими рухливими сперміями і центрифугували 10 хвилин при 1000об/хв.

5. До центрифугату (0,7мл, тобто 1/3 об'єму) додавали 1мл TALP і витримували 10 хвилин у термостаті при t=38,5°C з 5% CO₂ у повітрі для "розправлення" спермій.

6. Додавали 4мл TALP (Vзаг=6мл) і центрифугували. Супернатант видаляли. До центрифугату, який є суспензія капацированої сперми (1/3 об'єму V=2мл) додають 50мл середовища для запліднення ооцитів (Vзаг=50мл) і визначають концентрацію сперми у камері Горяєва.

У 2-й дослідній групі (новий спосіб) сперму обробляли згідно модифікованої нами схеми капацизації, що полягала у 2-кратному попередньому відмиванні розмороженої сперми від розбавника еякуляту, кріопротекторів та деструктивних еле-

ментів, збільшенні об'єму флотаційного середовища у 4 рази за рахунок подрібнення проб:

1. До розмороженої сперми баранів (2 гранули) загальним об'ємом 0,440мл додавали 5мл TALP і центрифугували 10 хвилин при 1000об/хв для відмивання спермій від розбавника еякуляту, кріопротекторів та деструктивних елементів.

2. До центрифугату (1/3 об'єму V=2мл) додають 4мл TALP і розділяють весь об'єм на 4 флотаційні об'єми (V₁=V₂=V₃=V₄=1,5мл) і центрифугують в другий раз в аналогічному режимі.

3. Супернатант видаляють, до центрифугату (1/3 об'єму V=0,5мл) додають 1мл середовища для капацизації TALP і витримують у термостаті при 38,5°C 1 годину для флотації активних спермій під час якої відбувається їх капацизація.

4. З кожної пробірки обережно відбирають верхній шар рідини (2/3 об'єму, тобто 1мл середовища) з живими рухливими сперміями.

5. Всі проби змішують в одній пробірці (Vзаг=4мл) і центрифугують 10 хвилин при 1000об/хв.

6. До центрифугату 1мл додають 1мл TALP і витримують у термостаті при t=38,5°C з 5% CO₂ 10 хвилин для "розправлення" спермій.

7. Після цього в пробірку вносять ще 4мл TALP (Vзаг=6мл) і центрифугують 10 хвилин при 1000об/хв. Супернатант видаляють. До центрифугату, який є суспензія капацированої сперми (1/3 об'єму V=2мл) додають 50мл середовища для запліднення ооцитів (Vзаг=50мл) і визначають концентрацію сперми підрахунком у камері Горяєва.

Результатами досліджень встановлено, що попереднє центрифугування, фракціонування загального об'єму розмороженої сперми на 4 флотаційні об'єми у 2-й дослідній групі дозволяє здійснити 2-разове центрифугування флотаційних проб та збільшити об'єм середовища для флотації і капацизації сперми. За рахунок цих методичних прийомів спермії скоріше і легше піднімаються у верхні шари середовища, що забезпечує високий ступінь очистки сперми і веде до збільшення кількості рухливих спермій (табл. 1).

Порівняння результатів досліджень способів капацизації розмороженої сперми заявленого модифікованого способу з традиційними способами свідчить про те, що найбільш ефективним виявився заявлений спосіб капацизації сперми.

Таблиця 1

Результати капацизації розмороженої сперми баранів трьома способами, n=3.

Групи	Концентрація спермій в 1 мл (x 10 ⁶)			
	Дослід 1	Дослід 2	Дослід 3	M±m, n=3
Контрольна (аналог)	3,175	3,350	3,125	3,220±0,077
Дослідна 1 (найближчий аналог)	4,067	3,750	4,300	4,039±0,193
Дослідна 2 (новий спосіб)	4,575	4,562	4,575-	4,571±0,006

Попереднє дворазове центрифугування розмороженої сперми з наступним розподілом загального об'єму на 4 флотаційних об'єми (2-га дос-

лідна група) дозволяє відокремити мертву сперму та клітинні уламки на початку обробки сперми до здійснення процедури флотації і проводити капа-

цитацію вже очищеної життєздатної сперми. Дво-разове центрифугування флотованої сперми підвищує якість її очистки. Ці методичні прийоми дозволяють підвищити кількість живих спермій з

$3,220 \pm 0,077 \times 10^6$ у контрольній до $4,571 \pm 0,006 \times 10^6$ у 2-й дослідній (новий спосіб).