



УКРАЇНА

(19) UA (11) 24696 (13) A
(51)6 A 61 D 7/00ДЕРЖАВНЕ
ПАТЕНТНЕ
ВІДОМСТВООПИС ДО ПАТЕНТУ
НА ВІНАХІДбез проведення експертизи по суті
на підставі Постанови Верховної Ради України
№ 3769 XII від 23 XII 1993 рПублікується
в редакції заявника

(54) СЕРЕДОВИЩЕ ДЛЯ ЗБЕРІГАННЯ СПЕРМИ БУГАІВ

1

(21) 97126056
(22) 16 12 97
(24) 04 08 98
(46) 30 10 98 Бюл. № 5
(47) 04 08 98
(72) Мельничук Сергій Дмитрович, Мельничук Дмитро Олексійович, Кругляк Андрій Петрович, Смірнова Ольга Ігорівна, Журавель Михайло Петрович, Кругляк Павло Андрійович, Маренець Микола Володимирович
(73) Національний аграрний університет

(57) Середовище для зберігання сперми бугаїв, яке включає глюкозу медичну безводну, натрій лимоннокислий трьохзаміщений п'ятиводний, жовток курячих яєць і дистильовану

2

вану воду, яке відрізняється тим, що воно додатково містить бікарбонат натрію і діоксид вуглецю в такому співвідношенні компонентів, мас. %

Глюкоза медична безводна	2 404-2 406
Натрій лимоннокислий трьохзаміщений п'ятиводний	1,122-1 123
Жовток курячих яєць	16,029-16,039
Натрій двовуглекислий	0,202-0 269
Діоксид вуглецю	0,028-0,034
Вода дистильована	Решта,

при цьому рН розбавленої сперми складає 6,6-6,8, а температура її зберігання становить +2...+15°C

Винахід належить до штучного осіменіння сільськогосподарських тварин.

Відоме глюкозо-цитратно-жовткове середовище для зберігання сперми бугаїв при температурі 2-15°C, яке складається з глюкози медичної безводної, натрію лимоннокислого трьохзаміщеного п'ятиводного, жовтка курячих яєць і дистильованої води, мас. %

Глюкоза медична безводна	2,412
Натрій лимоннокислий трьохзаміщений п'ятиводний	1,125
Жовток курячих яєць	16 077
Вода дистильована	Решта

[Инструкция по организации и технологии работы станций и предприятий по искусственному осеменению сельскохозяйственных животных - М. Колос, 1981 - С. 68]

Недоліком даного середовища є те, що термін зберігання в ньому сперматозоонами нормального прямолінійно-поступального руху і запліднювальної здатності становить не більше 72 годин, тобто отриману від плідника і розбавлену цим середовищем сперму потрібно використати для осіменіння самок протягом трьох діб. Короткий термін збереження сперми не забезпечує 100%-го її використання та призводить до зайвих витрат реактивів на

(19) UA (11) 24696 (13) A

приготування середовища. За виробничими даними сперма, розбавлена відомим середовищем, використовується на 70% її об'єму.

Суть винаходу полягає у подовженні строку збереження сперматозоонами бугаїв прямолінійно-поступальних рухів та високого рівня запліднювальної здатності протягом 120 годин, розширенні діапазону температур збереження сперми від 2 до 15°C за рахунок зниження активності метаболічних процесів у сперматозоонах шляхом внесення в середовище додаткових речовин – бікарбонату натрію та газоподібного діоксиду вуглецю і встановлення певного рівня концентрації водневих іонів (рН 6,6–6,8) у середовищі. В основу винаходу поставлено задачу розробити середовище для зберігання сперми бугаїв, що забезпечує гальмування активності метаболічних процесів сперматозоонів в умовах плюсових температур, подовжує термін зберігання ними високого рівня запліднювальної здатності протягом 120 годин (5 діб) шляхом добавки у відоме середовище (прототип) натрію двовуглекислого та діоксиду вуглецю у співвідношеннях, що утримують концентрацію водневих іонів у ньому на рівні 6,6–6,8, забезпечити технічний результат продовження терміну використання сперми до 5 діб, умови збереження її при плюсових температурах (2...15°C) та підвищити долю використання сперми до 100%.

Вказаний технічний результат досягається тим, що в середовище для розбавлення сперми бугаїв, яке містить глюкозу медичну безводну, натрій лимоннокислий трьохзаміщений п'ятиводний, жовток курячих яєць і дистильовану воду, додатково вводять бікарбонат натрію і газоподібний діоксид вуглецю при такій кількості компонентів, мас. %:

Глюкоза медична безводна	2,404–2,406
Натрій лимоннокислий трьохзаміщений п'ятиводний	1,122–1,123
Жовток курячих яєць	16,029–16,039
Натрій двовуглекислий	0,202–0,269
Діоксид вуглецю	0,028–0,034
Вода дистильована	Решта,

при цьому рН розбавленої сперми складає 6,6–6,8, а температура її зберігання становить 2–15°C.

Середовище готують так. У стерильну колбу вносять наважки глюкози, цитрату натрію і бікарбонату натрію за рецептом, додають прокип'ячену дистильовану воду і

перемішують до повного розчинення компонентів. Середовище охолоджують до кімнатної температури і додають жовток курячих яєць за рецептом. Після чого середовище насичують газоподібним діоксидом вуглецю до концентрації водневих іонів 6,6–6,8 і розбавляють сперму з таким розрахунком, щоб в 1 мл сперми було 25–30 млн. сперматозоонів з прямолінійним рухом. Розбавлену сперму якомога швидше розфасовують у стерильний скляний посуд, який заповнюють на 2/3 місткості і щільно закривають корком. Сперму зберігають при температурі 2–15°C.

Порівняно з прототипом запропоноване середовище додатково містить газоподібний діоксид вуглецю, який гальмує метаболічні процеси в спермі. Ця властивість вуглекислого газу давно відома, і тому багато вчених у різний час пропонували його в складі розріджувачів для сперми: Іллінойський розріджувач, бікарбонатно-фосфатний та ін. (Смирнов І.В., Зорін І.Г., Невада В.Ю., Бахмет К.О. Довідник по штучному осіменінню сільськогосподарських тварин. – К.: Урожай, 1971. – С. 191–192).

Але в усіх цих середовищах автори не звертали уваги на надмірну кількість діоксиду вуглецю, яка призводить до ацидозу і загибелі сперматозоонів. Солі вугільної кислоти застосовувались тільки для хімічної реакції, в результаті якої утворювався вуглекислий газ.

Оптимізація запропонованого середовища проходила одночасно за трьома факторами: кількості бікарбонату натрію, концентрації водневих іонів і кількості газоподібного діоксиду вуглецю. Зрозуміло, що ці фактори мають тісну взаємозалежність. Крім того, рН відомого середовища (прототип) становить 7,1–7,2, тоді як у нативній спермі бугая стандартної якості концентрація водневих іонів дорівнює 6,6–6,7.

У результаті проведених досліджень встановлено, що при введенні в запропоноване середовище бікарбонату натрію в кількості 0,202–0,269 мас.% і діоксиду вуглецю такої кількості, що вирівнює концентрацію водневих іонів у ньому до 6,6–6,8 і при збереженні розбавленої ним сперми при $t = 2-15^{\circ}\text{C}$ значно подовжується сперматозоонами придатність до використання (на 36 годин) за рахунок підтримання їх гіпобіотичного стану під час зберігання, а також підвищується запліднювальна здатність на 7,7% (табл. 1).

При температурах збереження нижче 2°C виживаність сперматозоонів дещо зменшувалась, а при вищих (16°C і вище) – концентрація водневих іонів знижувалась,

що приводило до зменшення виживаності клітин.

Сперму від 16 бугаїв-плідників голштинської породи розділили на 5 частин: одну розбавили відомим середовищем (прототип), а другу, третю, четверту і п'яту – пропонованим середовищем, приготовленим за рецептами (табл. 2, № 1–4). Концентрація сперматозоонів в усіх частинах становила 25–30 млн/мл. Сперму зберігали при температурі 2–15°C до появи поодиноких рухливих гамет. Дослідні зразки сперми зберігалися в скляних щільно закритих флаконах, заповнених на 2/3 місткості. В усіх зразках рухливість сперматозоонів перевірялась двічі на добу під мікроскопом при температурі 38°C. Відмічалось зниження рухливості сперматозоонів у пропонованих зразках з наступним її відновленням після нагрівання препарату до 38°C.

П р и к л а д 1. Виживаність гамет у 20 першій і другій частині сперми була однаковою – 180 годин. Це можна пояснити тим, що надмірна кількість вуглекислого газу в середовищі, приготовленим за рецептом № 1 (табл. 2), при такій кількості бікарбонату натрію (0,135 мас. %) викликала спочатку глибокий гіпобіоз статевих клітин, а потім їх руйнування.

П р и к л а д 2. Третю частину сперми розбавили середовищем, приготовленим за рецептом, який наводиться в рецепті № 2. Виживаність сперматозоонів у дослідних зразках становила порівняно з контрольними на 24 години більше. Цей результат викликаний тим, що рівень рН ближчий до природного, а підвищена кількість бікарбонату натрію (0,202 мас. %) гальмує руйнівні процеси в спермі під впливом вуглекислого газу.

П р и к л а д 3. Четверта частина сперми, яку розбавили середовищем № 3, досліджувалась так само, як і перші три. Виживаність сперматозоонів у ньому становила 216 годин, порівняно з прототипом – 180 годин. Руйнівна дія кислот тут також стримувалась буферними властивостями бікарбонату натрію.

П р и к л а д 4. П'ята, остання, частина сперми була розбавлена середовищем, склад якого наведено у рецепті № 4. Рівень рН цього середовища був нейтральний (7,0) і, таким чином, наближався до рівня рН прототипу (7,1–7,2). Виживаність гамет у цій частині була найнижчою – 96 годин, що пояснюється суттєвим підвищенням концентрації водневих іонів.

Т а б л и ц я 1

Зміна показників якості сперми після розбавлення її пропонованим середовищем

Середовища	Рухливість сперматозоонів у нативній спермі, бал.	Рухливість сперматозоонів через 2 год. після розбавлення, бал.	Тривалість зберігання сперматозоонів, придатних для використання, год.	Запліднювальна здатність сперматозоонів, %
Прототип	8,0	8,0	72	74,0
Пропоноване	8,0	3,0	120	81,7

Т а б л и ц я 2

Рецепти пропонованих середовищ та прототипу і ефективність їх використання

№ п/п рецепту середовища*	Глюкоза медична безводна, мас %	Натрій лимонно- кислий трихзаміщений, мас. %	Жовток курячих яєць, мас %	Натрій дво- вуглекис- лий, мас %	Діоксид вуглецю, мас %	pH	Виживаність сперматозоонів в середовищах при тем- пературі 2-15°C, год
1	2,407	1,123	16,050	0,135	0,035	6,4	180
2	2,406	1,123	16,039	1,202	0,034	6,6	214
3	2,404	1,122	16,029	0,269	0,028	6,8	216
4	2,403	1,123	16,020	0,336	0,022	7,0	96
Прото- тип	2,412	1,125	16,077	-	-	-	180

*У кожному варіанті: вода дистильована – решта.

Упорядник

Техред М Келемеш

Коректор М Самборська

Замовлення 4603

Тираж

Підписне

Державне патентне відомство України,
254655, ГСП, Київ-53, Львівська пл, 8

Відкрите акціонерне товариство "Патент", м. Ужгород, вул Гагаріна, 101