



СОЮЗ СОВЕТСКИХ СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ РЕСПУБЛИК  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ ПО ИЗОБРЕТЕНИЯМ И ОТКРЫТИЯМ  
ПРИ ГОСУДАРСТВЕННОМ КОМИТЕТЕ СССР ПО НАУКЕ И ТЕХНИКЕ  
(ГОСКОМИЗОБРЕТЕНИЙ)

## СВИДЕТЕЛЬСТВО

№

I690736

На основании полномочий, предоставленных Правительством СССР, Госкомизобретений выдал настоящее свидетельство на изобретение:

"Способ криоконсервации спермы"

Заявитель: ИНСТИТУТ БИОХИМИИ ИМ. А. В. ПАЛЛАДИНА И  
УКРАИНСКАЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ АКАДЕМИЯ

Автор (авторы): Гулая Надежда Максимовна, Волков Георгий  
Леонидович, Высоцкий Михаил Владимирович, Мельничук  
Дмитрий Алексеевич и Иваненко Федор Викторович.

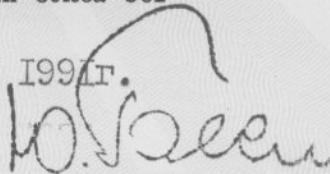
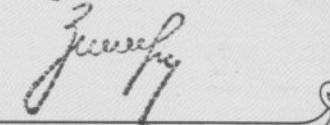
Заявка № 4221514 Приоритет изобретения 1 апреля 1987г.

Зарегистрировано в Государственном реестре  
изобретений Союза ССР

15 июля 1991г.

Председатель Комитета

Начальник отдела



ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ  
ПО ИЗОБРЕТЕНИЯМ И ОТКРЫТИЯМ  
ПРИ ГИИТ СССР

# ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

## К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

- 1
- (21) 4221514/15
  - (22) 01.04.87
  - (46) 15.11.91. Бюл. № 42
  - (71) Институт биохимии им. А.В. Палладина и Украинская сельскохозяйственная академия
  - (72) Н.М. Гулая, Г.Л. Волков, М.В. Высоцкий, Д.А. Мельничук и Ф.В. Иваненко
  - (53) 591.391.1(088.8)
  - (56) Инструкция по организации и технологии работы станций и предприятий по искусственному осеменению животных. М.: Колос, 1981, 36 с.
  - (54) СПОСОБ КРИОКОНСЕРВАЦИИ СПЕРМЫ
  - (57) Изобретение относится к сельскому хозяйству, в частности к технологии искусственного осеменения сель-

2

скохозяйственных животных и птиц. Целью изобретения является повышение выживаемости и оплодотворяющей способности семени. Способ заключается в использовании в качестве криопротектора соединения, которое относится к классу N-ацилэтанолламинов: N-пальмитоилэтанолламина и/или N-стеароилэтанолламина, который предварительно смешивают с липофильным компонентом защитной среды в соотношении 1:1000. Затем полученную смесь вводят в разбавленную сперму из расчета 50-100 мкг на 1 млрд спермиев. Выживаемость спермиев достигает 8,5 ч, а оплодотворяющая способность спермы 64,8%, 1 з.п.ф.-лы, 2 табл.

Изобретение относится к сельскому хозяйству, в частности к технологии искусственного осеменения сельскохозяйственных животных и птиц.

Целью изобретения является повышение выживаемости и оплодотворяющей способности семени.

Способ заключается в использовании в качестве криопротектора соединения, которое относится к классу N-ацилэтанолламинов: N-пальмитоилэтанолламина (ПЭА) и/или N-стеароилэтанолламина (СЭА), представляющих собой поверхностно-активные вещества.

Фармакологическое действие этих препаратов изучено, например, ПЭА как фармацевтический препарат импульсин применяется в Чехословакии

для лечения острых респираторных заболеваний вирусной природы.

Способ осуществляют следующим образом.

10 мг ПЭА и/или СЭА растворяют при тщательном перемешивании в 10000 мг липофильного компонента защитной среды. Свежеотобранную сперму оценивают согласно известному базовому способу и в зависимости от концентрации спермиев в нее вводят защитную среду, а затем добавляют криопротекторную смесь 50-100 мкг на 1 млрд спермиев и перемешивают, эквilibрируют при 0-(+5)° в течение 4-5 ч и замораживают в парах жидкого азота до температуры (-196)°С.

Пример 1. Приготавливают криопротекторную смесь для 20 проб.

10 мг ПЭА смешивают с 10000 мг яичного желтка (в соотношении 1:1000). Цельную сперму разбавляют в защитной среде из расчета 10 млн активных спермиев в одной оттаянной спермодозе при следующем составе среды:

Лактоза, г	11,5
Желток куриных яиц, мл	20,0
Глицерин, мл	5,0
Спермосан - 3 тыс. ед.	50,0
Вода дистиллированная, мл	100,0

В разбавленную сперму вводят смесь с криопротектором из расчета 75 мг смеси на 1 млрд спермиев. Затем обработанную сперму охлаждают в холодильнике до 5°C в течение 5 ч (эквilibрация) и замораживают в виде гра-  
нул на фторопластовой пластине в парах жидкого азота. Замороженную сперму хранят в жидком азоте при (-196)°C. Одновременно параллельные пробы тех же эякулянтов обрабатывают по базовому способу, которые служат контролем.

Биологическую полноценность спермы, обработанной базовым и предлагаемым способами, оценивают по показателям подвижности и выживаемости спермиев согласно ГОСТу 20909,4-75. Результаты проведенных исследований изложены в табл.1.

Примеры 2-6. Сначала готовят криопротекторную смесь ПЭА и/или СЭА в глицерине (1:1000) в следующих количествах на 1 млрд спермиев;

пример 2. 50 мг смеси (50 мкг ПЭА в 50 мг глицерина);

пример 3. 75 мг смеси (75 мкг ПЭА в 75 мг глицерина);

пример 4. 75 мг смеси (75 мкг СЭА в 75 мг глицерина);

пример 5. 75 мг смеси (37,5 мкг ПЭА + 37,5 мкг СЭА в 75 мг глицерина);

пример 6. 100 мг смеси (100 мкг СЭА в 100 мг глицерина).

Цельную сперму разбавляют защитной средой из расчета 10 млн активных спермиев в одной оттаянной спермодозе при следующем составе защитной среды:

Лактоза, г	11,5
Желток куриных яиц, мл	20,0
Глицерин, мл	5,0
Спермосан (3 тыс. ед.)	50,0

Вода дистиллированная, мл 100,0

Пример 7. Определяли биологическую полноценность спермы, полученной при применении предлагаемого способа, путем искусственного осеменения коров и телок на небольшом поголовье в колхозах "Зоря" и "Здобуток Жовтня" Житомирского района Житомирской области УССР. Контролем служила сперма быков-производителей, замороженная по базовому способу. Зависимость оплодотворяющей способности спермы от способа ее криоконсервации приведена в табл.2. Контроль оплодотворения осуществляли ректальным исследованием.

Анализ полученных результатов свидетельствует о преимуществах нового способа по сравнению с известными, которые выражаются в более высокой биологической полноценности спермы. Подвижность спермиев увеличивается на 59,5% при статистически значимой разнице в сравнении со способом-прототипом. Значительно увеличивается абсолютный показатель выживаемости (на 85%) при одинаковом времени выживаемости спермиев.

Кроме того, высокий процент оплодотворяемости коров (64,8%) и телок (90,2%) спермой быков-производителей, замороженной предлагаемым способом, против базового (48,7% и 76,9% соответственно, табл.2) свидетельствует о биологической полноценности спермиев при обработке спермы животных предлагаемым способом.

#### Ф о р м у л а и з о б р е т е н и я

1. Способ криоконсервации спермы, включающий разбавление спермы защитной средой, содержащей липофильный компонент и обработку криопротектором, эквilibрацию, замораживание в парах жидкого азота и оттаивание, отличающийся тем, что, с целью повышения выживаемости и оплодотворяющей способности семени, в качестве криопротектора используют N-пальмитоилэтаноламин и/или N-стеароилэтаноламин, который предварительно смешивают с липофильным компонентом защитной среды в соотношении 1:1000, а затем полученную смесь вводят в разбавленную сперму

из расчета 50-100 мкг на 1 млрд спермиев.

пофильного компонента используют глицерин или яичный желток.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что в качестве ли-

5

Т а б л и ц а 1

Пример	Способ обработки	Подвижность, балл	Выживаемость при 38°С	
			Время, ч	Абсолютная
1 n = 15	Предлагаемый	8,26±0,119	8,19±0,533	44,31±1,923
	Базовый	4,66±0,124	5,63±0,168	22,11±1,487
	Повышение, %	77,25	45,47	100,41
2 n = 20	Предлагаемый	6,82±0,168	7,69±0,235	36,24±2,177
	Базовый	4,66±0,124	5,63±0,168	22,11±1,487
	Повышение, %	46,35	36,59	63,91
3 n = 20	Предлагаемый	8,23±0,207	8,42±0,369	43,92±2,615
	Базовый	4,66±0,124	5,63±0,168	22,11±1,487
	Повышение, %	76,61	49,56	98,64
4 n = 20	Предлагаемый	8,08±0,268	8,31±0,490	44,07±2,708
	Базовый	4,66±0,124	5,63±0,168	22,11±1,487
	Повышение, %	73,39	47,60	99,32
5 n = 20	Предлагаемый	8,37±0,194	8,21±0,367	44,00±0,193
	Базовый	4,66±0,124	5,63±0,168	22,11±1,487
	Повышение, %	79,61	45,83	99,00
6 n = 20	Предлагаемый	6,17±0,113	7,53±0,281	35,97±2,238
	Базовый	4,66±0,124	5,63±0,168	22,11±1,487
	Повышение, %	32,40	33,75	62,69

П р и м е ч а н и е. Введение смеси в количестве 10-40 мкг на 1 млрд спермиев увеличивает абсолютную выживаемость всего на 30-40%, а введение 200-500 мкг - не увеличивает ее более, чем на 60-63%.

35 |

Т а б л и ц а 2

Способ обработки спермы	Осеменено голов	Оплодотворено от первого осеменения	
		голов	%
Предлагаемый	коровы	54	35
	телки	41	37
Базовый	коровы	76	37
	телки	117	90

Составитель И.Марченко

Редактор М.Васильева

Техред А.Кравчук

Корректор М.Самборская

Заказ 4619

Тираж

Подписное

ВНИИПИ Государственного комитета по изобретениям и открытиям при ГКНТ СССР  
113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5

Производственно-издательский комбинат "Патент", г.Ужгород, ул. Гагарина, 101