



ÚŘAD PRO VYNALEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENÍU

231796
(11) (B1)

(51) Int. Cl.³
A 61 D 7/02

[22] Prihlásené 26 01 83
[21] (PV 527-83)

[40] Zverejnené 14 05 84

[45] Vydané 15 12 86

(75)

Autor vynálezu

HORVÁTH AMBRÓZ ing., BRATISLAVA, BOCZ JURAJ ing., KOMÁRNO

(54) Spôsob zmrazovania kančej spermy

1

Podstatou spôsobu zmrazovania podľa vynálezu je, že odobratý ejakulát sa po ekvilibračnej dobe odstraňuje pri otáčkach 2800 až 3000 min.⁻¹ po dobu 5 min., po ktorých sa semenná plazma oddelí, predriedi riedidlom a ochladí sa na 5 °C. Do riedidla sa pridajú 2 % glycerínu a týmto sa po vychladení predriedenej spermy doriedi. Po doriedení sa zmrazuje v suchom ľade a v tekutom dusíku, pričom pred insemináciou sa rozpustí v rozmrazovacej tekutine.

Vynález je možné využiť na uchovanie kančej spermy pre insemináciu ošípaných bez časového a priestorového obmedzenia tak, ako je to u hovädzieho dobytku.

2

Vynález rieši spôsob konzervácie a uskladnenia kančej spermy pre neobmedzené časové a priestorové použitie.

Doterajšie spracovanie a konzervácia kančej spermy sa uskutočňuje pri bežných fyziologických teplotách, čo neumožňuje jeho konzerváciu a uskladnenie pre neobmedzené časové použitie. Tieto metódy v podstate predstavujú len riedenie čerstvej kančej spermy s možnosťou použitia do 5 dní po jeho odobratí od plemenníkov. Sú známe pokusy zmrazovania kančieho spermatu prispôbením metódy zmrazovania býčieho spermatu. Pri tomto spôsobe sa dosiahli dosť dobré výsledky v motilitě 25 až 30 %, avšak zabrezávanie bolo veľmi nízke 20 až 25 %. Je známa i metóda zmrazovania kančieho spermatu v polyamidových trubičkách. Pri tejto metóde sa získalo zabrezávanie 38 %, motilita 30 až 35 %, a 55 až 60 percent normálnych akrozomov. Uvedené metódy konzervácie kančej spermy majú nevýhody v nízkej prasnosti a plodnosti prasníc, čoho dôsledkom je nízka efektívnosť pri zabezpečovaní reprodukcie v chove ošípaných, čo bráni využívaniu v širokej plemenárskej praxi.

Uvedené nedostatky odstraňuje spôsob zmrazovania kančej spermy podľa vynálezu, ktorého podstatou je, že prefiltrovaný a odstáty ejakulát sa odstredí pri otáčkach 2800 až 3000 min.⁻¹ po dobu 5 min., po ktorých sa oddelí semenná plazma a čistá koncentrovaná sperma sa predriedi riedidlom, pripraveným homogenizáciou vaječného žltka, TES — N — TRIS pozostávajúceho z hydroxymetylu, metyl-2-aminoetanu, kyseliny sírovej, THIS pozostávajúceho z aminoetanu a hydroxymetylu, glukózy, glycerínu a natriumlaurylsulfátu s redistilovanou vodou, riedidlo sa odstredí pri otáčkach 10 000 min.⁻¹ a pridáva sa v množstve 5 ml na 1 inseminačnú dávku, ochladí sa na 5 °C, pričom sa do riedidla pridá glycerín s podielom 2 % hm. a týmto sa dorieďuje po kvapkách v množstve 5 ml na 1 inseminačnú dávku za stáleho miešania, po ktorom sa zmrazuje v suchom ľade a tekutom dusíku.

Množstvo riedidla na predriedenie koncentrovanej spermy sa vypočíta podľa vzťahu

$$R = \frac{(O \times A \times K) - P}{5}$$

pričom

R — počet dávok

O — objem čerstvého ejakulátu použitého na odstredenie

A — aktivita v % čerstvého ejakulátu

K — koncentrácia v tis. spermíí čerstvého ejakulátu

P — percento patologických spermíí

Zmrazovanie sa vykonáva na suchom ľade, v ktorom sa predtým vyhlbili jamky na pilulky, pričom nakvapkávanie sa vykonáva

na veľkosť 0,2 ml. Po zmrazení sa pilulky presypú do tekutého dusíka, kde môžu byť skladované neobmedzene dlhú dobu.

Pred použitím sa pilulky rozmrazia v rozmrazovacej tekutine, ktorá sa pripraví rozpustením chelatonu IV, glukózy, hydrouhličitanu sodného a citrátu sodného v redistilovanej vode pri 38 °C. Na rozmrazenie jednej inseminačnej dávky, t. j. 50 piluliek sa použije 70 ml rozmrazovacej tekutiny 50 °C teplej.

Výhodou navrhovaného spôsobu podľa vynálezu je, že umožňuje spracovanie, konzerváciu a uskladnenie kančej spermy s možnosťou rozmrazovania pri výkone inseminácie prasníc, čo umožňuje využívať insemináciu ošípaných bez časového a priestorového obmedzenia tak, ako je to u hovädzieho dobytku. Pritom dosiahnuté výsledky plodnosti zmrazenou spermou predstihujú výsledky plodnosti dosiahnuté čerstvou spermou. Zmrazovanie spermy umožňuje podstatné zdokonalenie realizácie priparovania a tým i uplatnenie dosiaľ nemožných metód plemenitby a šľachtenia ošípaných.

V nasledujúcej časti je vynález objasnený príkladom prípravy ejakulátu pred zmrazovaním a insemináciou, ktorým sa samozrejme jeho rozsah nevyčerpáva, ani inak neobmedzuje.

Príklad prevedenia

Ejakulát odobratý ručnou metódou do 500 ml skleneného odberného valca umiestneného v umelej vagíne vytemperovanej teplou vodou v plášti vagíny na 37 °C sa preleje cez dvojitý filter sterilnej gázy do odmerného valca o obsahu 500 ml.

Z množstva získaného ejakulátu sa odberie 10 ml pre účely laboratórneho vyšetrenia. Sperma v odmernom valci sa ponechá odstáť 30 až 60 min., čo je ekvilibračná doba, pri laboratórnej teplote. Počas tejto doby sa prevedie laboratórne vyšetrenie ejakulátu. Zistí sa pH acidimetrom, pričom hodnoty majú byť v rozmedzí 6,8 až 7,2. Aktivita sa zistí mikroskopicky, najnižšia hodnota 70 %. Koncentrácia sa zistí fotokolorimetricky, alebo na Bürgerovej komôrke; najnižšia hodnota 250 tis. na ml. Morfológické zmeny sa zistia metódou podľa Farellyho, prípustné morfológické zmeny sú do 20 %, z toho nezrelých spermíí s protoplazmatickou kvapkou do 10 %.

Ďalej sa pripraví riedidlo, ktoré pozostáva z

TES—N—TRIS (hydroxymetyl, metyl-2-aminoetan, kyselina sírová) v množstve 1,1 g TRIS (hydroxymetyl, aminoetan) v množstve 2,2 g

glukózy 3,2 g

glycerolu 3 %, t. j. 3,3 g

vaječného žltku 22 ml

natrium-lauril-sulfátu 0,5 ml

natriumlaurylsulfátu 0,5 ml

Riedidlo sa pripraví tak, že vaječný žltok po pridaní 10 ml redestilovanej vody sa homogenizuje mixerom po dobu 5 min. Medzi tým sa ďalšie komponenty: TES—N—TRIS, TRIS a glukóza rozpustia v 50 ml redestilovanej vody 40 °C teplej. Po rozpustení komponentov a dôkladnej homogenizácii sa žltok vleje do rozpustených častí riedidla. Po premiešaní sa obsah doplní redestilovanou vodou 35 °C teplou na 100 ml. V ďalšom sa pridá 0,5 ml natriumlaurylsulfátu a 3,3 ml glycerínu. Takto pripravené riedidlo sa odstreďuje v skúmavkách s obsahom 8 mililitrov na odstredivke po dobu 8 min. pri otáčkach 10 000 min.⁻¹. Po odstredení sa tekutý obsah riedidla preleje do odmerného valca s obsahom 150 ml, sediment sa zo skúmaviek odstráni a v ďalšom sa nepoužíva.

Po uplynutí ekvilibračnej doby sa ejakulát v odmernom valci premieša a rozdelí sa do skúmaviek s obsahom 12 ml a odstreďuje sa na odstredivke bežne používanej pri zisťovaní tukovosti mlieka pri otáčkach 1375 min.⁻¹ po dobu 20 min. Môžu sa použiť i otáčky 2800 až 3000 min.⁻¹ po dobu 5 min. Po odstredení sa semenná plazma zo skúmaviek odsaje a v skúmavke ostane čistá koncentrovaná sperma. Teplota spermy sa prispôsobí i teplota riedidla, ktoré sa do jednotlivých skúmaviek pridá po kvapkách za stáleho miešania v množstve vypočítanom podľa vzorca

$$R = \frac{(O \times A \times K) - P}{5}$$

Na jednu inseminačnú dávku sa použije 5 ml riedidla.

Po ukončení predriedenia sa predriedená sperma vleje do flakonu určeného pre insemináciu ošípaných a takto pripravená sa vloží do vodného kúpeľa tak, aby teplota kúpeľa a predriedenej spermy bola rovnaká. Schladzovanie prebieha postupne v

chladničke, ktorá je nastavená na teplotu +5 °C. Schladzovanie na uvedenú teplotu trvá 90 až 120 min. Zároveň sa pripraví z ostávajúcej časti riedidla množstvo na doriedenie po schladení. Použijú sa tie množstvá riedidla, ktoré boli použité na predriedenie. Do pripraveného množstva riedidla sa pridá glycerín podielom 2 % hm., t. j. 3,3 ml a dobre premiešané sa vloží do chladničky k schladeniu na +5 °C.

Po schladení predriedenej spermy a riedidla sa pristúpi k doriedovaniu, ktoré sa robí postupne po dvoch až troch kvapkách pomocou pipety za stáleho miešania. Na jednu inseminačnú dobu sa použije 5 ml riedidla na doriedenie. Po doriedení sa ihneď zmrazuje.

Zmrazovanie prebieha v suchom ľade, v ktorom sa vyhlbili jamky na pilulky. Nakvapkávanie sa vykonáva pipetou na veľkosť 0,2 ml. Zmrazovanie na suchom ľade trvá 7 min. Po zmrazení sa pilulky presypú cez lievik do masťoviek, v ktorých je tekutý dusík. Takto zmrazená sperma sa uskladňuje v kontajneroch, kde môže byť skladovaná v tekutom dusíku neobmedzenú dobu.

K rozmrazovaniu piluliek pred insemináciou sa použije rozmrazovacia tekutina, ktorá sa pripraví rozpustením chelatonu IV v množstve 1,2 g, glukózy v množstve 60 g, hydrouhličitanu sodného v množstve 0,40 g a citrátu sodného v množstve 1,5 g v 1000 mililitrov redestilovanej vody pri teplote 38 °C.

Jedna inseminačná dávka predstavuje 50 piluliek, ktoré sa vyberú z kontajnera a nechajú sa odpariť po dobu 60 až 90 sek. Po odparení sa pilulky postupne vysypú do rozmrazovacej tekutiny ohriatej na 50 °C a obsahu 70 ml. Rozmrazovacia tekutina je ohrievaná priamo vo flakone vo vodnej kúpeli. Takto pripravená inseminačná dávka sa ihneď použije k inseminácii.

PREDMET VYNÁLEZU

Spôsob zmrazovania kančej spermy v tekutom dusíku vyznačujúci sa tým, že sa odobratý ejakulát pri teplote 37 °C prefiltruje, nechá sa odstáť na dobu 30 až 60 min, po ktorej sa rozdelí do skúmaviek a odstreďuje sa pri otáčkach 2800 až 3000 min.⁻¹ po dobu 5 min, po ktorých sa semenná plazma oddelí a čistá koncentrovaná sperma sa predriedi riedidlom, pripraveným homogenizáciou vaječného žltka, TES—N—TRIS pozostávajúceho z hydroxymetylu, metyl-2-aminoetanu, kyseliny sírovej, TRIS pozo-

stávajúceho z aminoetanu a hydroxymetylu, glukózy, glycerínu a natriumlaurylsulfátu s redestilovanou vodou, riedidlo sa odstredí pri otáčkach 10 000 min.⁻¹ a pridáva sa v množstve 5 ml na jednu inseminačnú dávku, ochladí sa na 5 °C, pričom sa do riedidla pridá glycerín s podielom 2 % hm. a týmto sa dorieďuje po kvapkách v množstve 5 ml na jednu inseminačnú dávku za stáleho miešania, po ktorom sa zmrazuje v suchom ľade a tekutom dusíku.