



Республика Таджикистан

(19) **TJ** (11) **301**

(51)) **МПК(2006) А 61 К**
35/52

ГОСУДАРСТВЕННОЕ ПАТЕНТНОЕ
ВЕДОМСТВО

(12) **Описание изобретения**

К МАЛОМУ ПАТЕНТУ

1

(21) 0900337

(22) 10.07.2009

(46) Бюл.57 (1), 2010

(71) Шукуров Т. (ТJ); Давлатов Х.К. (ТJ); Икромов Ф.М. (ТJ).

(72) Шукуров Т. (ТJ); Давлатов Х.К. (ТJ); Икромов Ф.М. (ТJ).

(73) Шукуров Т. (ТJ); Давлатов Х.К. (ТJ); Икромов Ф.М. (ТJ).

(54) СПОСОБ ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА АКТИВНОСТИ СПЕРМЫ БЫКА

(56) 1.Н.А. Бочарев, А.В. Бесхлебнов, Я.Г. Губаревич и др. Акушерство, гинекология и искусственное осеменение сельскохозяйственных животных. Под ред. проф. И.А. Бочарова, Изд. "Колос", Ленинград. 1967, стр. 563-589.

2. Шукуров Т., Каххоров А.Н., Зоиров П.Т. Применение инфракрасной спектроскопии в меди-

2

цине (Обзор). Ж. Здравеохр. Таджикистан, 2003, №2, стр.19-28.

(57) Изобретение относится к животноводстве, а именно для определения качества активности спермы быка.

Целью изобретения является применение ИК - спектроскопии для определения качества активности спермы быка.

Для достижения поставленной цели, проводится забор спермы, снимается ИК -спектры в диапазоне частот $1300 - 900 \text{ см}^{-1}$. Полученные ИК - спектры сопоставляют с эталонным спектром в качестве, которого используются ИК -спектры спермы, которым используя в животноводстве известными методами были установлены качества активности. При совпадении ИК -спектров спермы, взятого из любого быка с эталонным спектром, устанавливается качества активности.

Изобретение относится к животноводству, а именно к разведению, селекции, генетике и воспроизводства сельскохозяйственных животных.

Известен ряд способов определения качества активности спермы быка. Среди них главными являются следующие: определения процента живых сперматозоидов; оценка спермы по внешним признакам, по цвету, густоте и подвижности; по скорости обесцвечивания метиленовой синьки и др., а в животноводческой практике свежеполученную сперму оценивают по двум показателям: густоте и подвижности. [1].

Известен способ определения качества активности спермы по густоте и подвижности сперматозоидов, исследования необходимо провести при температуре 38 - 40 °С и под микроскопом. Одну каплю свежеполученной спермы пипеткой наносят на поверхности предметной стекле и прикрывают покровным стеклом, вставляют в специальный ящик-термостат. Исследование проводится при температуре 38-40 °С и просматривают под микроскопом, при увеличении 200-400 раз. В случаях, когда сперма очень густая, добавляют раствор двууглекислого натрия, а когда сперматозоид в процессе эякуляции не успевает полностью выйти из состояния неподвижности и проявляет слабые движения, оценку проводят при добавлении 1,5% раствора двууглекислого натрия, подогретого до 38-39° С.

Необходимо отметить, что оценка качества спермы по густоте определяют только у свежеполученной и неразбавленной спермы. При рассмотрении в поле зрения микроскопа полностью заполнено сперматозоидами, между которыми должны быть едва заметны промежутки. При оценке качества спермы по густоте считается пригодным, когда в 1 мл средней спермы содержится от 400 миллионов до 1 миллиарда сперматозоидов.

Недостатком метода является, когда активности сперматозоидов в эякулянте с большой концентрации их (более 1 млрд. в 1 мл) возможно ошибки в точности оценки спермы, так как при большой густоте активные сперматозоиды приводят в движения и мертвых. Определение по густоте также зависит от момента забора и точного соблюдения времени установления заданной температуры; когда сперма густая добавляют двууглекислый натрий подогретого до 38-39° С и по скорости обесцвечивания определяют активность, т. е. также определяют косвенным путем.

Известен также метод оценки качества активности сперматозоидов по подвижности. При оценке качества спермы по подвижности, под микроскопом сперма должна иметь прямолинейно-поступательное движение, только такая сперма способна участвовать в процессе оплодотворения. Оценку сперматозоидов при этом производят по

десятибалльной системе, т. е. в поле зрения под микроскопом все 10 сперматозоидов должны иметь поступательное движение, в данном случае ставят высшую оценку - 1 балл. Если из 10 сперматозоидов прямолинейно-поступательное движение имеет 9, то ставят оценку 0,9 балла и так далее. Пригодным для искусственного осеменения считается, когда сперматозоид быка имеет оценку не ниже 0,6 балла.

Недостатком метода заключается в следующем: оценке качества активности устанавливается косвенным путем и зависит от навыка конкретного человека.

По внешним признакам, цвет должен быть белым или слабо желтоватым, без запаха или запаха парного молока. В случае использования метода определения активности спермы по обесцвечиванию в свежеполученной сперме добавляют метиленовую синьку и по скорости обесцвечивания устанавливают активность [1].

Недостатком метода заключается в том, что зависит от чувствительности конкретного человека к цвету и запахам.

Поэтому нами было предложено использование метода инфракрасной (ИК) - спектроскопии, не требующий разбавления и подогрева спермы, являющийся более простой, информативный, точный, быстрый и надежный способ оценки качества активности спермы быка, посредством более достоверных и наглядных признаков, по ИК спектрам спермы.

Целью настоящего изобретения является, разработка более надежного и достоверного способа оценки качества активности спермы быка производителя, без подогрева и добавление химических разбавителей.

Этот метод является, методом ИК - спектроскопии. Преимущество предложенного способа заключается в следующем: во-первых, определяется при комнатной температуре; во-вторых, не использует химреактивы; в-третьих, для регистрации спектра достаточно одной капли спермы; в-четвертых, для регистрации спектра и установления качества активности спермы требуется около 15 мин; в-пятых, по спектрам можно определить не только качества активности, но также степень активности.

Полученная с использованием данного метода информация, во многих случаях вполне достаточна для решения многих задач животноводства, особенно имеет большие практические значения при искусственной осеменении коров и для повышения поголовья селекционных пород животных. Предлагаемый способ более прост, экономичен, быстро и достоверно позволяет установить качество активности спермы.

зом. У быка производителя по общепринятыми способом производят забор спермы. Затем из полученной спермы берется пипеткой одна капля и наносится на поверхности оптической подложки из монокристалла KRS - 5(6) и используя методику получения тонкой пленки описанной в работе [2], записывается ИК -спектр. Необходимо отметить, для записи ИК спектра достаточно очень малая количество спермы. Регистрация спектров осуществляется на стандартном двухлучевом ИК -спектрофотометре в диапазоне частот 1750-900 см⁻¹. Запись спектров осуществляется при комнатной температуре. Полное время для получения спектра и установления качества активности спермы составляет около 25 мин.

Для определения качества активности спермы, необходимо спектральные критерии по которым можно было сопоставляя установить качество активности любой новополученной спермы, т. е. эталонный ИК спектр. С этой целью были осуществлены 12 забора спермы в разны период, у 4 быков производителей и проведены оценка качества активности, используя общепринятым способом в животноводстве методами. Когда качества активности спермы соответствовали значению, от

1 до 0,6 баллов, от этих сперм были взяты пробы и осуществлены запись ИК- спектров используя методику получения тонкой пленки.

Запись ИК -спектров осуществлена в диапазоне частот 1750 - 900 см⁻¹. ИК -спектрам эталонной спермы в данной области частот характерны три полосы с четкой интенсивностью, положения частоты максимумов ($\nu_{\text{мак.}}$) и значения интенсивности которых приведены в таблице. При всех расчетах, точность определения положения $\nu_{\text{мак.}}$ составляют ± 5 см⁻¹, а интенсивности $\pm 1,0\%$.

Специально разработанным методом рассчитывается соотношение интенсивности характеристических полос и интегральная интенсивность ИК -спектров в выбранном диапазоне частот. Полученный таким способом численные значения ИК -спектра спермы быка производителя служит, как эталонный критерий качества активности.

В таблице приведены наблюдаемые положения $\nu_{\text{мак.}}$ и интенсивности характеристических ИК полос поглощения спермы при различных качествах активности.

Таблица

Положения $\nu_{\text{мак.}}$ и интенсивности характеристических ИК полос поглощения эталонных сперм при различной качестве активности

1 – балл		0,8 – балл		0,6 – балл		ниже 0,2 – балла	
$\nu_{\text{мак.}}$	интенсивности, %	$\nu_{\text{мак.}}$	интенсивности, %	$\nu_{\text{мак.}}$	интенсивности, %	$\nu_{\text{мак.}}$	интенсивности, %
1405	17	1400	12	1400	9	1395	3,5
1350	6	1325	5	1335	4	сглаживается	
1085	12	1050	10	1050	8,5	1035	1

Для решения поставленной задачи было произведено 24 забора спермы у 8 быков различной породы и в различный период времени. По выше описанному методу были записаны ИК -спектры, и определены положения $\nu_{\text{мак.}}$ и интенсивности характеристических полос поглощения. Полученные значения, сопоставлены со значениями эталонных спектров, которые приведены в таблице.

При сравнительном анализе ИК -спектра спермы любого быка, когда они по положению $\nu_{\text{мак.}}$ и интенсивности характеристических полос поглощения совпадают с эталонными, приведенные в таблице имеют показатели 0,6 и выше балла, можно считать, что по качеству активности они пригодны для использования при искусственном осеменении.

Пример 1. Произведены забор спермы у быка производителя. Проведены оценка качества полу-

ченной спермы по внешним признаками; по цвету белая со слабым запахом парного молока. Брали одну каплю свежеполученной спермы пипеткой наносили на поверхности предметной стекле и прикрывая покровным стеклом, вставляли в специальный ящик-термостат, в которой была установлена температура 38-40 °С и просматривают под микроскопом, при увеличении 280 раз. В поле зрения микроскопа почти полностью заполнено сперматозоидами, между которыми наблюдается незначительные, приблизительно равные 1/4 длине одного сперматозоида. В поле зрения микроскопа сперматозоидам характерны относительно прямолинейные движения, можно использовать для искусственного оплодотворения. Был взята проба для спектрального анализа. В такой сперме, в 1 мл содержится от 800 до 900 млн. сперматозоидов. Был взята проба для спектрального анализа. По

выше описанному методу записаны ИК спектры спермы в диапазоне частот 1750-900 см^{-1} . РЖ спектрам характерны полосы поглощения с $\nu_{\text{макс}}$ при 1405, 1332 и 1065 см^{-1} с интенсивностями

7

301

равными 14, 6 и 10 проценту. Сравнительный анализ ИК спектра показывают, что по форме полос, положению частоты максимума и интенсивности совпадает со спектром эталона, соответствующий 0,8 балл.

Пример 2. Произведены забор спермы у быка производителя. Проведены оценка качества полученной спермы по внешним признакам; по цвету белая со слабыми желтыми оттенками, без запаха. Брали одну каплю свежеполученной спермы пипеткой наносили на поверхности предметной стекле и прикрывая покровным стеклом, вставляли в специальный ящик-термостат, в которой была установлена температура 38-40 °С и просматривают под микроскопом, при увеличении 280 раз. В поле зрения микроскопа между сперматозоидами наблюдается промежутки равные 1/2 длине одного сперматозоида. В такой сперме, в 1 мл содержится около 700-750 млн. сперматозоидов. В поле зрения микроскопа сперматозоидам характерны относительно прямые движения, можно использовать для искусственного оплодотворения. Был взята проба для спектрального анализа. По выше описанному методу записаны РЖ спектры спермы в диапазоне частот 1750-900 см^{-1} . РЖ спектрам характерны полосы поглощения с $\nu_{\text{макс}}$ при 1405, 1332 и 1065 см^{-1} с интенсивностями равными 12, 5 и 9 проценту. Сравнительный анализ РЖ спектра показывают, что по форме полос, положению частоты максимума и интенсивности совпадает со спектром эталона, соответствуют 0,7 баллу, и сперма может быть использована для искусственного оплодотворения.

Пример 3. Произведены забор спермы у быка производителя. Проведены оценка качества полученной спермы по внешним признакам; по цвету белая со слабыми желтыми оттенками, без запаха. Брали одну каплю свежеполученной спермы пипеткой наносили на поверхности предметной стекле и прикрывая покровным стеклом, вставляли в специальный ящик-термостат, в которой была установлена температура 38-40 С и просматривают под микроскопом, при увеличении 280 раз. В поле зрения микроскопа между сперматозоидами наблюдается промежутки равные 1/2 длине одного сперматозоида. В такой сперме, в 1 мл содержится около 700-750 млн. сперматозоидов. В поле зрения микроскопа сперматозоидам характерны относительно прямые движения, можно использовать для искусственного оплодотворения. Был взята проба для спектрального анализа. По выше описанному методу записаны ИК спектры спермы в диапазоне частот 1750-900 см^{-1} . ИК спектрам характерны

полосы поглощения с $\nu_{\text{макс}}$ при 1405, 1332 и 1065 см^{-1} с интенсивностями равными 12, 5 и 9 проценту. Сравнительный анализ ИК спектра показывают, что по форме полос, положению частоты макси-

8

мума и интенсивности совпадает со спектром эталона, соответствуют 0,7 баллу, сперма может быть использована для искусственного оплодотворения.

Пример 4. Произведены забор спермы у быка производителя. Проведены оценка качества полученной спермы по внешним признакам; по цвету мутный с желтыми оттенками, без запаха. Брали одну каплю свежеполученной спермы пипеткой наносили на поверхности предметной стекле и прикрывая покровным стеклом, вставляли в специальный ящик-термостат, в которой была установлена температура 38-40 °С и просматривают под микроскопом, при увеличении 280 раз. В поле зрения микроскопа между сперматозоидами наблюдается промежутки равные 1,2 длине одного сперматозоида. В такой сперме, в 1 мл содержится менее 400 млн. сперматозоидов. В поле зрения микроскопа сперматозоидам характерны круговое движения, нельзя использовать для искусственного оплодотворения. Был взята проба для спектрального анализа. По выше описанному методу записаны ИК спектры спермы в диапазоне частот 1750-900 см^{-1} . ИК спектрам характерны полосы поглощения с $\nu_{\text{макс}}$ при 1390 и 1050 см^{-1} с интенсивностями равными 10 и 4 проценту. Полоса, в области частот 1350 - 1300 см^{-1} не проявляется. Сравнительный анализ ИК спектра со спектром эталонной спермы показывают, что по форме полос, положению частоты максимума и интенсивности не совпадает со спектром эталона. Сперма не пригодна для искусственного осеменения.

Пример 5. Произведены забор спермы у быка производителя. Проведены оценка качества полученной спермы по внешним признакам; по цвету желтый, без запаха. Брали одну каплю свежеполученной спермы пипеткой наносили на поверхности предметной стекле и прикрывая покровным стеклом, вставляли в специальный ящик-термостат, в которой была установлена температура 38-40 °С и просматривают под микроскопом, при увеличении 280 раз. В поле зрения микроскопа между сперматозоидами наблюдается промежутки равные длине большее одного сперматозоида. В такой сперме, в 1 мл содержится менее 400 млн. сперматозоидов. В поле зрения микроскопа сперматозоидам характерны беспорядочные движения, нельзя использовать для искусственного оплодотворения. Был взята проба для спектрального анализа. По выше описанному методу записаны ИК спектры спермы в диапазоне частот 1750-900 см^{-1} . ИК спектрам характерны одна четкая полосы поглощения с $\nu_{\text{макс}}$ при 1390 см^{-1} с интенсивностью равными 8 проценту. Полоса в области частот 1350 - 1300 см^{-1}

не проявляется, а полоса в области 1065 1040 не имеет четкого максимума. Сравнительный анализ ИК спектра показывают, что по форме полос, положению частоты максимума и интенсивности не совпадает со спектром эталона. Сперма не пригодна для искусственного осеменения.

Были проведены забор спермы у 24 быков

9

производителей в разный период времени. Из 24 полученных сперм, 16 по положения $y_{\text{мак}}$ характеристических ИК полос поглощения совпадали со спектром эталонных образцов и имели значения выше 0,6 балла.

При этом важным моментом следует считать стабильное и идентичное повторение показателей спектрограммы, то есть методу присуще достоверное постоянство.

301

Таким образом, предлагаемый способ анализа спермы быка производителя, посредством записи спектров, методом ИК -спектроскопии может служить хорошим критерием для определения качества активности, определяет критерий «новизна», который до настоящего времени не использовался в практике животноводства.

10

Преимущество предлагаемого способа от известных способов определение качества спермы быка заключается в том, что он технически более прост, не требует химреактивов, создание определенной температуры, экономичный, эффективный и более точный. С момента забора спермы, записи ИК спектра и установления качества активности, требуется около 25 минут.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Способ оценки качества активности спермы быка, включающий забор спермы, **отличающийся, тем что** одну каплю пипеткой наносят на поверхность оптической подложки из монокристалла KRS – 5(6), записывают ИК-спектр на стандартном

двухлучевом ИК- спектрофотометре в диапазоне частот $1750 - 900 \text{ см}^{-1}$, полученный спектр сопоставляют с эталонными спектрами и определяют качество активности сперматозоида.

Компьютерный набор: Назарова Дж.Д.

Заказ	Тираж	Подписное
Национальный патентно-информационный центр РТ 734042, г. Душанбе, ул. Айни, 14а.		