



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **115006** (13) **C2**  
(51) МПК (2017.01)

**A01K 61/00**

**A01K 61/10** (2017.01)

**A01N 1/00**

**A01N 1/02** (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО  
ЕКОНОМІЧНОГО  
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ  
УКРАЇНИ

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

<b>(21)</b> Номер заявки: <b>а 2016 10472</b>	<b>(72)</b> Винахідник(и): <b>Пуговкін Антон Юрійович (UA),</b> <b>Кононенко Ірина Сергіївна (UA),</b> <b>Кононенко Руслан Володимирович (UA),</b> <b>Черепнін Валентин Олександрович (UA),</b> <b>Копейка Євгеній Федорович (UA)</b>
<b>(22)</b> Дата подання заявки: <b>17.10.2016</b>	
<b>(24)</b> Дата, з якої є чинними права на винахід: <b>28.08.2017</b>	
<b>(41)</b> Публікація відомостей про заяву: <b>25.04.2017, Бюл.№ 8</b>	<b>(73)</b> Власник(и): <b>ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І</b> <b>КРІОМЕДИЦИНИ НАЦІОНАЛЬНОЇ</b> <b>АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ,</b> вул. Переяславська, 23, м. Харків, 61016 (UA)
<b>(46)</b> Публікація відомостей про видачу патенту: <b>28.08.2017, Бюл.№ 16</b>	<b>(56)</b> Перелік документів, взятих до уваги експертизою: SU 591164 A1, 05.02.1978 RU 2241324 C2, 10.12.2004 RU 2317703 C1, 27.02.2008 Glogowski J., et al. Fertilising rate of Siberian sturgeon (Acipenser baerii, Brandt) milk cryopreserved with methanol // Aquaculture. - 2002. -V. 211. - P. 367-373 Lahnsteiner F., et al. Studies on the semen biology and sperm cryopreservation in the sterlet, Acipenser ruthenus L // Aquaculture Research. - 2004. -V. 35, N 6. -P. 519-528 Пономарева Е.Н. Оптимизация процесса криоконсервации спермы осетровых рыб при использовании различных сред / Е.Н. Пономарева, М.М. Богатырева, Н.А. Антонова, В.П. Осипова // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. -2009. - т. 11, № 1 (2). - С. 132-134

## (54) СПОСІБ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ СПЕРМИ ОСЕТРОВИХ РИБ

### (57) Реферат:

Винахід належить до рибництва і може бути використаний при штучному заплідненні та збереженні генофонду осетрових риб. Заявлено спосіб кріоконсервування сперми осетрових риб, який включає розведення сперми 1:1 кріозахисним розчином, що містить 8,9-10 мМ КНСО<sub>3</sub>, 3,8-7,6 мМ моногідрату креатину, 10,5-11,7 мМ сахарози, 5,0-5,6 мМ фруктози та 3,0-3,75 М метанолу. Розведену сперму заморожують у гранулах від 5 °С до -15 °С зі швидкістю 2-5 °С/хв. з використанням сидингу при -4 °С, від -15 °С до -70 °С зі швидкістю 15-20 °С/хв., з наступним зануренням у рідкий азот.

UA 115006 C2



Винахід належить до рибицтва і може бути використаний при штучному заплідненні та збереженні генофонду осетрових риб.

Відомий спосіб кріоконсервування сперми риб, який включає розведення сперми 1:1 кріозахисним розчином, що містить 65 % 0,2 М трис- $\text{HCl}$ -буфера, 10 % курячого жовтка та 25 % диметилсульфоксиду, і наступне заморожування. Заморожування проводять в ампулах зі швидкістю 0,5-5 °C/хв. до -12...-14 °C, а потім зі швидкістю 20-30 °C/хв. до температури рідкого азоту -196 °C [1].

Недоліком способу є низька запліднююча здатність розмороженої сперми, яка в середньому не перевищує 60 % при використанні якісної сперми.

Відомий спосіб кріоконсервування сперми сибірського осетра, який включає розведення сперми 1:1 кріозахисним розчином, що містить 30 мМ трис-оксиметил-амінометану, 23,4 мМ сахарози, 0,25 мМ  $\text{KCl}$ ,  $\text{HCl}$  до рН 8,0, 10 % метанолу, і заморожування в соломинках об'ємом 1,2 мл. Заморожування проводять зі швидкістю 3,5 °C/хв. від 4 °C до -15 °C з сидингом при -7 °C, переносять на 5 хв. на сухий лід із наступним зануренням у рідкий азот. [2].

Недоліком способу є неможливість використання кріоконсервованої сперми для запліднення великих об'ємів ікри. Після запліднення 1г ікри розмороженою спермою отримують лише  $29,6 \pm 5,0$  % мальків. Це не дозволяє використовувати спосіб в промислових масштабах.

Відомий спосіб кріоконсервування сперми стерляді, який включає розведення 1:1 кріозахисним розчином, що містить 50 мМ  $\text{NaCl}$ , 5 мМ  $\text{KCl}$ , 10 мМ триса (рН 8,5), 7,5 % метанолу, і заморожування в пластикових соломинках шляхом 3 хв. витримки на висоті 3 см над поверхнею азоту з подальшим зануренням у рідкий азот [3].

Недоліком способу є зниження рухливості розморожених сперматозоїдів та неможливість запліднення великих об'ємів ікри: з 2-х г ікри запліднюється  $32,7 \pm 4,4$  %.

Найбільш близьким до заявленого способу є спосіб кріоконсервування сперми осетрових риб, який включає розведення охолодженої до 15 °C сперми 1:1 кріозахисним розчином, що містить компоненти у такому співвідношенні, мас %: 0,05-0,5 сахарози; 0,01-0,15 хлориду калію; 6-12 метанолу; 0,05-5 гліцерину; решта - дистильовану воду. Після 60 хв. еквілібрації сперми при 0-5 °C її заморожують в хлорвінілових ампулах по 1,5 мл зі швидкістю 2-5 °C/хв. від 5 до -15 °C, від -15 до -70 °C зі швидкістю 10-20 °C/хв., потім занурюють в рідкий азот [4].

Недоліком способу є низька рухливість розмороженої сперми. За даними авторів при використанні сперми стерляді запліднюється в середньому 73,8 % малих об'ємів ікри. При використанні сперми сибірського осетра запліднюється в середньому лише 62,2 % ікри при більших об'ємах ікри (100-300 г) і сперми (3-18 мл).

В основу винаходу поставлена задача створити такий спосіб кріоконсервування сперми осетрових риб, який би за рахунок зміни кріозахисного розчину і режиму заморожування забезпечив підвищення рухливості, а також можливість запліднення великих об'ємів ікри.

Ця задача вирішується тим, що в спосіб кріоконсервування сперми осетрових риб, який включає розведення сперми 1:1 кріозахисним розчином, що містить сахарозу і метанол, та заморожування від 5 до -15 °C зі швидкістю 2-5 °C/хв, потім від -15 до -70 °C зі швидкістю 10-20 °C/хв з подальшим зануренням у рідкий азот, згідно з винаходом, в кріозахисний розчин додатково вводять гідрокарбонат калію ( $\text{KHCO}_3$ ), моногідрат креатину і фруктозу, при цьому заморожування від 5 °C до -15 °C проводять з використанням сидингу при -4 °C. Сперму заморожують у вигляді гранул. Компоненти кріозахисного розчину беруть в такому співвідношенні: 8,9-10 мМ  $\text{KHCO}_3$ , 3,8-7,6 мМ моногідрату креатину, 5-5,6 мМ фруктози.

Введення в кріозахисний розчин  $\text{KHCO}_3$ , моногідрату креатину та фруктози дозволяє зупинити активацію сперматозоїдів під час розбавлення кріозахисним розчином та відновити її рухливість під час запліднення. Заморожування сперми в гранулах з використанням сидингу при -4 °C дозволяє отримати ідентичний режим охолодження для всіх гранул. Покращені умови кріоконсервування забезпечують підвищення рухливості розмороженої сперми до 75-80 %, а її запліднюючої здатності в середньому до 85,8 % з використанням в 3 рази меншої кількості сперми при заплідненні великих об'ємів ікри, що на 23,4 % вище, ніж у прототипі.

Приклад здійснення способу.

Для дослідів використовували сперму стерляді, яку охолоджували до 5 °C, розбавляли 1:1 ізотермічним кріозахисним розчином, до складу якого входять 8,9-10 мМ  $\text{KHCO}_3$ , 3,8-7,6 мМ моногідрат креатину, 10,5-11,7 мМ сахарози, 5,0-5,6 мМ фруктози та 3,0-3,75 М метанолу, і автоматичною мікропіпеткою по 100 мкл переносили на пластину в парах азоту при 5 °C. Потім її відразу ж заморожували від 5 °C до -15 °C зі швидкістю 2-5 °C/хв. з сидингом при -4 °C, від -15 °C до -70 °C зі швидкістю 15-20 °C/хв., далі гранули занурювали в рідкий азот. Розморожували у водяній бані і активували у ставковій воді. Рухливість сперми оцінювали візуально під мікроскопом: рухливих клітин було 75-80 %. Для визначення запліднюючої

- здатності отримували ікру масою 25, 40 і 60 г від 3 самок і до кожної порції додавали таку ж масу води та 1 мл сперми і перемішували 3 хв. Потім для попередження склеювання ікри її промивали 0,6 % розчином таніну. Подальшу інкубацію ікри проводили в промислових інкубаційних апаратах. В контролі до ікри додавали свіжу сперму. Запліднюючу здатність сперми оцінювали на стадії 4-х бластомерів. Отримані результати наведені в Таблиці 3. Таблиці видно, що кріоконсервування майже не вплинуло на запліднюючу здатність розмороженої сперми, яка в середньому була на 2 % нижчою ніж в контролі, і на 23,4 % вищою, ніж у прототипі, незалежно від самки та об'єму взятої ікри.

Таблиця

Рухливість та запліднююча здатність сперми до (контроль) та після кріоконсервування

Вид риб	Об'єм ікри, г	Рухливість сперматозоїдів, %	Запліднення, %	Запліднення відносно контролю, %
Заявлений спосіб				
Стерлядь (контроль)	80	95	87,7	
Стерлядь (контроль)	90	95	87,5	
стерлядь	40	75-80	85,6	97,7
стерлядь	60	75-80	87,6	100,0
стерлядь	60	75-80	79,9	91,2
стерлядь	25	75-80	89,2	101,8
Прототип				
стерлядь	1-2	*	82,9	
стерлядь	1-2	*	64,6	
сибірський осетр	100	*	50,0	73,4
сибірський осетр	100	*	69,1	101,4
сибірський осетр	300	*	58,0	76,7
сибірський осетр	300	*	58,7	77,6
сибірський осетр	300	*	75,2	99,4

\* у прототипі дані відсутні

Джерела інформації:

1. А. с. СССР № 591164, А 01 К 61/00, 1978, Бюл. № 5. Способ консервирования спермы рыб.
2. Glogowski J., et al. Fertilising rate of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*, Brandt) milk cryopreserved with methanol // Aquaculture. - 2002. -V. 211. - P. 367-373.
3. Lahnsteiner F., et al. Studies on the semen biology and sperm cryopreservation in the sterlet, *Acipenser ruthenus* L // Aquaculture Research. - 2004. -V. 35, N 6. -P. 519-528.
4. Патент РФ № 2 317 703, А01К 61/00, А01N 1/02, 2008, Бюл. № 8. Способ кріоконсервирования спермы осетровых рыб.

## ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Спосіб кріоконсервування сперми осетрових риб, який включає розведення сперми 1:1 кріозахисним розчином, що містить сахарозу і метанол, та заморожування від 5 °С до -15 °С зі швидкістю 2-5 °С/хв., від -15 °С до -70 °С зі швидкістю 15-20 °С/хв., з подальшим зануренням в рідкий азот, який **відрізняється** тим, що в кріозахисний розчин додатково вводять гідрокарбонат калію, моногідрат креатину і фруктозу, заморожують сперму в гранулах, а заморожування від 5 °С до -15 °С здійснюють з використанням сидінгу при -4 °С.

2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що компоненти кріозахисного розчину беруть в такому співвідношенні:

гідрокарбонат калію	8,9-10 мМ
моногідрат креатину	3,8-7,6 мМ
сахароза	10,5-11,7 мМ
фруктоза	5,0-5,6 мМ
метанол	3,0-3,75 М.

---

Комп'ютерна верстка Л. Бурлак

---

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

---

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601