



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
A01N 1/02 (2019.02)

(21)(22) Заявка: 2018126466, 18.07.2018

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
18.07.2018

Дата регистрации:
01.04.2019

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 18.07.2018

(45) Опубликовано: 01.04.2019 Бюл. № 10

Адрес для переписки:

141821, Московская обл., Дмитровский р-н, пос.
Рыбное, ФГБНУ "ВНИИПРХ",
информационно-аналитический отдел, для
Славиной М.В.

(72) Автор(ы):

Докина Ольга Борисовна (RU),
Ковалев Константин Викторович (RU),
Пронина Наталья Дмитриевна (RU),
Миленко Владимир Алексеевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
научное учреждение "Всероссийский
научно-исследовательский институт
пресноводного рыбного хозяйства" (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2317703 C1, 27.02.2008. SU
591164 A1, 05.02.1978. WO 2018067747 A1,
12.04.2018. US 20060078872 A1, 13.04.2006.

(54) Защитная среда для криоконсервации спермы осетровых рыб

(57) Реферат:

Изобретение относится к рыбной промышленности и может использоваться при искусственном воспроизводстве осетровых рыб, а также для создания низкотемпературных генетических банков с целью сохранения биоразнообразия рыб. Защитная среда для криоконсервации спермы осетровых рыб содержит сахарозу, хлорид калия и криопротекторы метанол и формамид.

Компоненты защитной среды берут в следующем соотношении, мас. %: сахароза 0,1; хлорид калия 0,08; метанол 8; формамид 0,5-1; дистиллированная вода - остальное. Изобретение позволяет повысить сохранность оплодотворяющей способности спермы при криоконсервации за счет более эффективного синергетического состава защитной среды. 3 табл.

RU 2 683 682 C1

RU 2 683 682 C1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC
A01N 1/02 (2019.02)

(21)(22) Application: **2018126466, 18.07.2018**

(24) Effective date for property rights:
18.07.2018

Registration date:
01.04.2019

Priority:

(22) Date of filing: **18.07.2018**

(45) Date of publication: **01.04.2019** Bull. № 10

Mail address:

141821, Moskovskaya obl., Dmitrovskij r-n, pos. Rybnoe, FGBNU "VNIIPRKH", informatsionno-analiticheskij otdel, dlya Slavinoj M.V.

(72) Inventor(s):

**Dokina Olga Borisovna (RU),
Kovalev Konstantin Viktorovich (RU),
Pronina Natalya Dmitrievna (RU),
Milenko Vladimir Alekseevich (RU)**

(73) Proprietor(s):

Federalnoe gosudarstvennoe byudzhetnoe nauchnoe uchrezhdenie "Vserossijskij nauchno-issledovatel'skij institut presnovodnogo rybnogo khoz'ajstva" (RU)

(54) **PROTECTIVE MEDIUM FOR CRYOCONSERVATION OF STURGEON FISH SPERM**

(57) Abstract:

FIELD: fishing and fish farming.

SUBSTANCE: invention relates to fish industry and can be used in artificial reproduction of sturgeon fishes, as well as for creation of low-temperature genetic banks in order to preserve fish biodiversity. Protective medium for cryopreservation of sperm of sturgeon fishes contains sucrose, potassium chloride and cryoprotectors methanol and formamide. Components

of the protective medium are taken in the following ratio, wt%: saccharose 0.1; potassium chloride 0.08; methanol 8; formamide 0.5–1; distilled water – balance.

EFFECT: invention provides higher safety of semen fertilizing capacity during cryopreservation due to more effective synergistic composition of protective medium.

1 cl, 3 tbl

RU 2 683 682 C1

RU 2 683 682 C1

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к рыбной промышленности, а именно, к области биотехнологии аквакультуры, и может использоваться при искусственном воспроизводстве осетровых рыб, а также для создания низкотемпературных генетических банков с целью сохранения биоразнообразия рыб.

Уровень техники

Известно множество способов криоконсервации спермы осетровых рыб, в любом из которых определяющее значение для достижения успешного результата имеет используемая для разбавления спермы защитная среда. Среди исследованных защитных сред наиболее эффективными, т.е. позволяющими сохранить высокую оплодотворяющую способность криоконсервированной спермы осетровых рыб, были следующие среды: 1) водный раствор, содержащий 0,1% сахарозы, 0,08% хлорида калия и 8% метанола, который обеспечивал оплодотворение икры размороженной спермой на уровне 52-81% для сибирского осетра, 62-78% для русского осетра, 49-67% для белуги, 40-62% для стерляди, 73-83% для севрюги (Цветкова Л.И., Докина О.Б., Пронина Н.Д., Миленко В.А., Тансыкбаев А.Н. Криоконсервация спермы осетровых рыб - объектов аквакультуры // Мат-лы III Межд. научно-практ. конф. "Аквакультура осетровых рыб: достижения и перспективы", 22-25 марта 2004, Астрахань, Россия. - Астрахань, 2004. - С. 213-214; Цветкова Л.И., Докина О.Б., Пронина Н.Д., Миленко В.А. Роль низкотемпературных генных банков для развития аквакультуры. // Мат-лы докл. перв. науч.-практ. конф. «Повышение эффективности использования водных биологических ресурсов», Москва, ВВЦ, 1-2 ноября 2006 - М.: изд-во ВНИРО, 2006 - с.130-131); 2) водный раствор, содержащий 8,85 г/л хлорида натрия, 0,2 г/л хлорида калия, 0,4 г/л гидрокарбоната натрия и 12% диметилсульфоксида (ДМСО), обеспечил оплодотворение 84% икры размороженной спермой китайского осетра (*A. Sinensis*) (Liu L., Wei Q., Guo F., Zhang J., Zhang T. Cryopreservation of Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) sperm // J. Appl. Ichthyol. - 2006. - V.22. - P. 384-388; 3) защитный раствор для криоконсервации спермы китайского осетра, содержащий 20-30 ммоль/л трис-НСl, рН 8-8,5, 30-60 ммоль/л сахарозы, 2-10 ммоль/л хлорида калия и метанол (Liu L., Wei Q., Guo F., Zhu Y. Патент на изобретение CN 101084927 Technique and process for frozen-preserving Chinese sturgeon semen under super-low temperature, дата приоритета 15.02.2007); 4) модифицированный сбалансированный солевой раствор Хэнкса, дополняемый 5 или 10% метанола, обеспечил оплодотворение 91-92% икры размороженной спермой белого лопатоноса (Wayman W.R., Looney G.L., Holm R.J., Tiersch T.R. Cryopreservation of sperm from endangered pallid sturgeon // North American Journal of Fisheries Management. - 2008. - V. 28. - P. 740-744); 5) защитный раствор для криоконсервации спермы корейского осетра *Acipenser dabryanus*, содержащий 30-90 ммоль сахарозы, 15-45 ммоль трегалозы (микозы), 20-40 ммоль тригидроксиаминометана (триса), 0,5-2 ммоль хлорида калия, 3,2-9,8 ммоль восстановленного глутатиона и 0,08-0,2 л карбинола (метанола), остальная часть - деионизированная вода (Li Ping, Wei Qiwei, Xi Mengdan, Liu Ling, Guo Wei, Qiao Xinmei, патент № CN104054697, дата приоритета 07.07.2014 г.), обеспечила оплодотворение 45% икры; 6) водный раствор, содержащий 0,2 моль/л глюкозы и 10% метанола, обеспечивал оплодотворение 65-68% икры размороженной спермой белуги (Aramli M.S., Golshahi K., Nazari R.M., Aramli S., Banan A. Effectiveness of glucose - methanol extender for cryopreservation of *Huso huso* spermatozoa // Animal Reproduction Science. - 2015. - V. 162. - P. 37-42); 7) буферный раствор трис-НСl, рН 8, содержащий 23,4 ммоль/л сахарозы, 0,25 ммоль/л хлорида калия, 10 ммоль/л метанола и 10 ммоль/л глутамина, обеспечивал оплодотворение $90 \pm 3,2\%$ икры персидского осетра (Aramli M.S., Golshahi K., Nazari

R.M., Golpour A., Aramli S. Influence of glutamine supplementation on motility and fertilization success of frozen-thawed Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) sperm // *Reprod. Dom. Anim.* - 2016. - Doi: 10, 1111/rda.12704).

Однако применение ДМСО в качестве криопротектора и гипертоничных защитных сред на основе трис-НСI буфера признается нецелесообразным при криоконсервации спермы осетровых рыб (Mims S.D., Tsvetkova L.I., Wayman W.R., Horvath A., Urbanyi B., Gomelsky B. Cryopreservation of Sturgeon and Paddlefish Sperm. In: *Cryopreservation in Aquatic Species*, 2nd Edition. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana. - 2011. P. 366-380). Избыточное содержание сахарозы в защитных растворах снижает их протективное действие, а недостаток хлорида калия не обеспечивает необходимого снижения двигательной активности клеток перед замораживанием. Кроме того, поскольку успех криоконсервации — уровень оплодотворения икры размороженной спермой - в значительной степени зависит от качества икры и нативной спермы, то формальное сравнение достигнутых процентов оплодотворения, приведенных в разных работах, является неправомерным. Имеет смысл лишь сравнение результатов криоконсервации в различных защитных средах, проведенной на одной сперме.

Наиболее близкой защитной средой того же назначения к заявляемому изобретению является водный раствор, содержащий 0,05-0,5% сахарозы, 0,01-0,15% хлорида калия, 6-12% метанола и 0,05-0,5% глицерина, применяемый в способе криоконсервации спермы осетровых рыб (патент на изобретение RU 2317703), использование которого позволяет получить оплодотворение икры криоконсервированной спермой до 92,3% для сибирского осетра, до 62,7% для русского осетра, до 82,9% для стерляди, до 60,8% для белуги, до 75% для севрюги.

Данная среда не позволяла сохранить более высокую оплодотворяющую способность криоконсервированной спермы для таких видов осетровых рыб, как русский осетр, белуга, севрюга, что требует уточнения содержания основных компонентов в защитной среде: сахарозы, хлорида калия и метанола. Использование в ней глицерина в качестве дополнительного криопротектора не оказывало значительного положительного влияния на сохранность и оплодотворяющую способность размороженной спермы.

Раскрытие сущности изобретения

Настоящее изобретение направлено на повышение сохранности оплодотворяющей способности спермы осетровых рыб при криоконсервации за счет более эффективного состава защитной среды. Указанный технический результат достигается тем, что в известном способе криоконсервации спермы осетровых рыб, предусматривающем разбавление спермы перед замораживанием защитной средой, представляющей собой водный раствор сахарозы, хлорида калия и метанола, особенность заключается в том, что в защитную среду в качестве дополнительного криопротектора вводят формамид, при этом компоненты защитной среды берут в следующем соотношении, масс. %: сахароза 0,1; хлорид калия 0,08; метанол 8; формамид 0,5-1; дистиллированная вода - остальное.

Введение в защитную среду дополнительного криопротектора формамида, имеющего очень маленький размер молекул и очень высокую диэлектрическую проницаемость, способного за счет этого легко проникать через мембрану внутрь клетки и обладающего выраженными антифризными свойствами, снижает вероятность повреждения клеток из-за образования внутри их кристаллов льда, тем самым повышает протекторное действие среды.

Использование в защитной среде двух криопротекторов сходного действия (проникающих в клетку через мембрану) - метанола и формамида - позволяет уменьшить

риск повреждения сперматозоидов от температурного шока благодаря синергетическому эффекту снижения температуры кристаллизации внутриклеточной жидкости. Совместное воздействие используемых криопротекторов способствует также продлению защитного действия среды за счет их разной скорости диффузии через мембрану и взаимодействию с разными структурами клетки.

Использование в защитной среде сахарозы и хлорида калия в уточненных концентрациях позволяет получить умеренно гипертонический раствор, обеспечивающий небольшое обезвоживание клеток, исключаяющее вероятность осмотического шока и снижающее риск внутриклеточной кристаллизации. Кроме того, указанный раствор обеспечивает снижение двигательной активности клеток перед замораживанием, что также уменьшает вероятность их повреждения.

Предлагаемый состав защитной среды предотвращает повреждение клеточных структур из-за внутриклеточной кристаллизации, что в совокупном воздействии с тем же режимом замораживания обеспечивает сохранение до 93,4% клеток (в зависимости от качества нативной спермы).

Рекомендуемое содержание компонентов защитной среды установлено в процессе многочисленных экспериментов.

Таким образом, совокупность отличительных признаков описываемой защитной среды обеспечивает достижение указанного технического результата.

Проведенный анализ уровня техники позволил установить, что не обнаружен источник, характеризующийся признаками, тождественными всем существенным признакам заявленного изобретения, следовательно, предлагаемое изобретение соответствует условию «новизна».

Дополнительный поиск известных решений показал, что заявленное изобретение не вытекает для специалиста явным образом из известного уровня техники, поскольку действие защитной среды указанного состава проявляет новые свойства с точки зрения воздействия на биологические объекты. Следовательно, заявленное изобретение соответствует условию «изобретательский уровень».

Осуществление изобретения

Защитную среду для криоконсервации спермы осетровых рыб готовят непосредственно перед применением, растворяя в дистиллированной воде в соответствующих концентрациях, масс. %: сахарозу 0,1; хлорид калия 0,08; метанол 8; формаид 0,5 - 1; дистиллированная вода - остальное.

В остальном способ криоконсервации осуществляют как описано в патенте на изобретение RU 2 317 703.

Сущность изобретения иллюстрируется примерами:

Пример 1.

В лаборатории криобиологии ВНИИ пресноводного рыбного хозяйства проводились опыты по криоконсервации спермы сибирских осетров и стерляди разного качества, полученной на Конаковском заводе по осетроводству, с использованием различных составов защитных сред. Эффективность криоконсервации оценивали по оплодотворению икры размороженной спермой, проводимому в лабораторных условиях на чашках Петри. Зависимость результатов оплодотворения икры размороженной спермой от состава защитной среды представлена в табл. 1.

Таблица 1. Зависимость результатов оплодотворения икры осетровых рыб размороженной спермой от состава защитной среды

№ опыта	Вид рыбы	Содержание криопротекторов в основе защитной среды, % (Основа среды: водный раствор 0,1% сахарозы, 0,08% хлорида калия)			Оплодотворение икры размороженной спермой	
		метанол	глицерин	формамид	средний % оплодотворения	% от контроля
5	сибирский осетр	8	-	-	16,6	18,2
		8	0,7	-	77,6	85,3
		8	-	0,7	91,4	100,4
10	стерлядь	8	-	-	22,7	31,3
		8	0,7	-	14,3	19,7
		8	-	0,7	54,7	75,4
		-	-	8	0	0

продолжение Таблицы 1						
№ опыта	Вид рыбы	Содержание криопротекторов в основе защитной среды, % (Основа среды: водный раствор 0,1% сахарозы, 0,08% хлорида калия)			Оплодотворение икры размороженной спермой	
		метанол	глицерин	формамид	средний % оплодотворения	% от контроля
15	сибирский осетр	8	-	-	29,2	70,4
		8	0,7	-	26,4	63,6
		8	-	0,7	38,7	93,3
20	сибирский осетр	8	-	-	69,3	-
		8	0,7	-	70,8	-
		8	-	0,7	83,4	-
		8	-	1,5	75,0	-
25	сибирский осетр	8	-	-	83,1	-
		8	0,7	-	85,4	-
		8	-	0,7	90,1	-
		8	-	0,5	93,4	-
		8	-	1	92,4	-
		8	0,7	0,7	84,9	-
30	сибирский осетр	8	-	-	25,2	73,0
		8	-	0,5	38,8	112,5
		8	-	0,7	40,8	118,3
		8	-	1	38,6	111,9
		8	-	2	32,6	94,5
		6	-	2	9,5	27,5
		-	-	15	0	0
35	стерлядь	8	-	-	31,2	-
		8	0,7	-	21,2	-
		8	-	0,7	47,4	-

Во всех опытах, где качественный и количественный состав защитной среды соответствовал рекомендуемому в заявляемом изобретении содержанию компонентов, уровень оплодотворения икры криоконсервированной спермой был высоким, иногда даже превышал уровень оплодотворения свежей спермой в контроле, что свидетельствует о высокой эффективности применяемой защитной среды, позволяющей сохранять жизнеспособность и высокую оплодотворяющую способность сперматозоидов.

Опыты №№2, 3, 6, 7 показывают, что преимущество заявляемой среды проявлялось и при криоконсервации спермы невысокого качества.

Пример 2.

В лаборатории криобиологии ВНИИ пресноводного рыбного хозяйства с целью формирования коллекции криобанка проводилась криоконсервация спермы разных видов осетровых рыб, полученной на Конаковском заводе по осетроводству, с

использованием различных составов защитных сред. Проверку оплодотворяющей способности образцов спермы проводили в лабораторных условиях на чашках Петри. Результаты проверки в зависимости от составов защитных сред представлены в табл. 2.

5 Таблица 2. Качество образцов криоконсервированной спермы осетровых рыб, заложенных на хранение в криобанк

№ самца	Вид рыбы	Содержание дополнительных криопротекторов в основе защитной среды, % (Основа среды: водный раствор 0,1% сахарозы, 0,08% хлорида калия, 8% метанола)			Оплодотворение икры размороженной спермой	
		глицерин	формамид	ацетамид	средний % оплодотворения	% от контроля
1	стерлядь	-	0,7	-	60,9	88,0
2		0,7	-	-	28,6	32,7
3		-	0,7	-	68,9	86,1
4		-	-	0,7	37,2	47,3
5		0,7	-	-	41,0	51,7
6		-	0,7	-	60,0	75,7
7		-	-	0,7	45,0	57,0
8		0,7	-	-	28,2	40,9
9		-	0,7	-	40,0	58,0
10		-	0,7	-	62,2	88,1
11	стерлядь	-	0,7	-	38,7	-
12		-	-	0,7	25,5	-
13		0,7	0,7	-	29,4	-
14		-	0,7	-	32,6	-

продолжение Таблицы 2

№ самца	Вид рыбы	Содержание дополнительных криопротекторов в основе защитной среды, % (Основа среды: водный раствор 0,1% сахарозы, 0,08% хлорида калия, 8% метанола)			Оплодотворение икры размороженной спермой		
		глицерин	формамид	ацетамид	средний % оплодотворения	% от контроля	
15	стерлядь	-	-	0,7	29,8	-	
16		0,7	0,7	-	27,1	-	
17		-	0,7	-	34,1	78,4	
18		-	-	0,7	30,9	71,0	
19		-	0,7	-	36,0	93,8	
20		-	-	0,7	31,9	83,1	
21		-	0,7	-	90,5	99,9	
22		-	0,7	-	85,1	93,1	
23		сибирский осетр	-	0,7	-	81,0	99,8
24			-	0,7	-	75,0	83,6
25	-		-	0,7	69,8	77,8	
26	0,7		0,7	-	25,0	27,9	
27	стерлядь	-	-	-	33,8	72,4	
28		0,7	-	-	37,4	80,1	
29		-	0,7	-	48,3	103,4	
30		-	-	0,7	46,7	100,0	
31		-	-	-	36,2	83,6	
32		-	0,7	-	39,7	91,7	
33		-	-	0,7	34,2	79,0	
34		-	-	-	42,8	97,7	
35		стерлядь	0,7	-	-	39,9	91,1
36			-	0,7	-	51,0	116,4
37	-		-	0,7	41,1	93,8	

1	Русский осетр	-	0,7	-	43,4	160,1
---	---------------	---	-----	---	------	-------

Приведенные данные свидетельствуют о том, что для каждого вида осетровых рыб замораживание спермы в заявляемой защитной среде обеспечивало сохранение ее оплодотворяющей способности на уровне нативной спермы в контроле и было в среднем на 20-50% выше по сравнению с другими использованными средами.

Пример 3.

На рыбозаводе «БиоАкустик» проводился опыт по промышленному получению гибрида стерлядь х калуга с использованием спермы калуги, криоконсервированной в заявляемой среде в лаборатории криобиологии ВНИИ пресноводного рыбного хозяйства. Результаты оплодотворения промышленных партий икры в зависимости от количества размороженной спермы представлены в табл. 3.

Таблица 3. Зависимость результатов оплодотворения икры стерляди от количества размороженной спермы калуги

Вариант опыта	Количество икры, г	Количество спермы, мл	Количество активатора (воды), мл	Разбавление спермы активатором	Оплодотворение икры размороженной спермой, %
1	300	9	600	1 : 70	74,7
2	300	12	600	1 : 50	83,4
3	300	15	600	1 : 40	87,0

Близкие значения процентов оплодотворения икры, полученные во всех вариантах опыта, указывают на высокое качество криоконсервированной спермы, обусловленное применением заявляемой среды.

Приведенные примеры иллюстрируют высокую эффективность криоконсервации спермы осетровых рыб в заявляемой защитной среде, обеспечивающей выживаемость и высокую оплодотворяющую способность сперматозоидов.

Таким образом, изложенные выше сведения свидетельствуют о выполнении при использовании заявленного изобретения следующей совокупности условий:

- защитная среда для криоконсервации спермы рыб по заявленному изобретению предназначена для использования в промышленности, в частности, для криоконсервации спермы осетровых рыб, компоненты которой, в указанных концентрациях, в совокупности с известным способом криоконсервации обеспечивают выживаемость и высокую оплодотворяющую способность размороженных сперматозоидов;

- для заявленной защитной среды в том виде, как она охарактеризована в независимом пункте изложенной формулы изобретения, подтверждена возможность ее применения с помощью описанных в заявке средств и методов.

Следовательно, заявленное изобретение соответствует условию «промышленная применимость».

(57) Формула изобретения

Защитная среда для криоконсервации спермы осетровых рыб, содержащая сахарозу, хлорид калия и метанол, отличающаяся тем, что в защитную среду вводят формамид в качестве дополнительного криопротектора, при этом исходные компоненты защитной среды берут в следующем соотношении, мас. %:

сахароза	0,1
хлорид калия	0,08
метанол	8
формамид	0,5-1
дистиллированная вода	остальное