

ШЛЯХИ ПІДВИЩЕННЯ КРІОРЕЗИСТЕНТНОСТІ СПЕРМАТОЗОЇДІВ ОСЕТРОВИХ

I. С. КОНОНЕНКО, кандидат сільськогосподарських наук,
старший викладач кафедри аквакультури,
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3906-3650>
E-mail: kononenko_irina88@ukr.net

P. B. КОНОНЕНКО, кандидат ветеринарних наук,
доцент кафедри аквакультури,
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7818-2583>

Національний університет біоресурсів і природокорис

Анотація. У ситуації, в якій на даному етапі знаходяться осетрові, логічно, що без застосування раціональних підходів та біотехнологічних прийомів буде неможливо подолати проблеми, що виникли щодо питання збереження їх біорізноманіття. Одним із перспективних напрямів вирішення цієї проблеми є кріоконсервування статевих продуктів самців. Проте, не дивлячись на значну кількість досліджень та результатів щодо даного напрямку, низка питань залишається повністю не вирішеними. Уточити потребує удосконалення склад кріозахисного розчину, що застосовується для розведення та заморожування сперми. Саме тому, дослідження, висвітлені в даній роботі, були спрямовані на пошук способів оптимізації процесу кріоконсервування сперми осетрових (на прикладі стерляді) з метою підвищення показників якості розмороженої сперми та рибницько-біологічних результатів запліднення ікри. У процесі дослідження вдалося встановити позитивні результати введення до компонентного складу кріорозчину нових речовин, а також оптимізувати спосіб заморожування сперми, що в сукупності дозволило покращити досліджувані показники. Отримані результати можуть бути перспективними для використання в осетрівництві, а також для створення резерву статевих продуктів рідкісних та зникаючих видів риб у кріобанках.

Ключові слова: кріоконсервування, стерлядь, статеві продукти, кріозахисний розчин, сперматозоїди, метанол, креатин

Актуальність.

Основою раціонального природо-користування та збереження біорізноманіття, у тому числі й осетрових видів риб, є використання біотехно-

логічних підходів [10]. Серед них досить перспективним напрямом є кріоконсервування статевих продуктів самців із наступним їх розморожуванням та використанням для отримання потомства, або ж для збері-

гання заморожених зразків у банках сперми як резерву для відновлення чисельності [2, 5].

Саме тому, більшість досліджень, описаних у літературі [1, 4, 6, 8], спрямовані на оптимізацію складу кріозахисного розчину, пошук нових сполук, які здатні захистити структуру сперматозоїда від пошкоджень у процесі заморожування-розморожування, а також на відновлення рухливості сперматозоїдів після розморожування та оцінку їх запліднювальної здатності.

Аналіз останніх досліджень та публікацій.

На сьогодні заморожування та довготривале зберігання статевих продуктів самців стало невід'ємним етапом біотехнології відтворення промислових та зникаючих видів риб. Достатньо відпрацьовані та успішно застосовуються технології кріоконсервування близько 200 видів риб [7]. Що стосується робіт зі спермою осетрових видів, то не дивлячись на великий обсяг дослідів, досі не вдалося отримати результати збереження якості розмороженої сперми на рівні з нативною. Це викликано низкою специфічних особливостей сперматозоїдів осетрових, що вимагає розробки видоспецифічних технологій заморожування із врахуванням низки факторів [4, 11, 12].

На сьогодні відомо та апробовано на різних біологічних об'єктах більше 100 різноманітних речовин, що мають кріозахисні властивості. Однак, детально вивчена біологічна дія та кріопротекторні властивості лише кількох десятків із них, переважно тих, які широко використовуються у практиці низькотемпературного заморожування.

Більш детального вивчення потребує питання відновлення сперматозоїдами життєдіяльності після розморожування та збереження їх запліднюючої здатності як важливої характеристики якості процесу кріоконсервування. Наведена в літературі інформація [9] містить відомості, що потребують додаткового вивчення та ґрунтовного аналізу.

Мета дослідження полягала в удосконаленні способу заморожування сперми осетрових видів риб (на прикладі стерляді) шляхом оптимізації складу кріозахисного розчину із використанням нових та стандартних складових компонентів, а також оцінка запліднюючої здатності сперматозоїдів після розморожування за показниками запліднення ікри спермою та кількості ембріонів, що розвиваються.

Матеріали та методи дослідження.

Роботи з кріоконсервування статевих продуктів самців стерляді проводили відповідно до рекомендацій Є.Ф. Копейки та інших кріобіологів [3, 11]. Пошук оптимального складу кріозахисного середовища проводили шляхом перевірки впливу різних речовин та їх концентрацій на якість сперми після розморожування. Заморожування статевих продуктів стерляді проводили у пробірках типу «Eppendorf» по 1,5 та 0,5 мл та у гранулах по 0,1 мл. Для розведення сперми використовували чотири кріозахисні розчини (спосіб заморожування): №1 ДМСО – 2,115 М, КСІ – 13,4 мМ, сахароза – 14,6 мМ, гліцин – 74,9 мМ (пробірки по 1,5 та 0,5 мл та гранули 0,1 мл); №2: метанол – 3,73 М, КСІ – 13,4 мМ, сахароза – 14,6

мМ, гліцерин – 20,5 мМ (пробірки 0,5 мл та гранули 0,1 мл); №3: ДМСО – 1,057 М, метанол – 1,86 М, КСІ – 13,4 мМ, сахароза – 14,6 мМ, гліцин – 66,6 мМ (гранули 0,1 мл); №4: метанол – 3,73 М, KHCO_3 – 8,9 мМ, креатин – 3,8 мМ, сахароза – 14,6 мМ (гранули 0,1 мл). Додатково оцінку оптимізації способу заморожування сперми стерляді проводили на основі аналізу результатів запліднюючої здатності розмороженої сперми *in vitro* за показниками запліднення ікри та кількості ембріонів, що розвиваються.

Результати дослідження та їх обговорення. Проведена перевірка кріопротекторних властивостей стандартних середовищ не показала задовільних результатів на спермі стерляді – заморожування сперми викликало повну загибель сперматозоїдів або ж зберігало активними 5–15 % із них. Тому, для підвищення ефективності кріоконсервування статевих продуктів стерляді було проведено оптимізацію компонентного складу кріозахисних середовищ шляхом використання нових речовин та маніпуляцій з їхньою концентрацією. На основі проведених досліджень серед перевіреної кількості кріорозчинів було підібрано чотири, які забезпечували найвищий захист сперматозоїдів від пошкоджуючих факторів кріоконсервування.

Так, розведення сперми кріозахисним розчином №1 на основі ДМСО та заморожування її в пробірках об'ємом 1,5 мл викликало зниження активності розморожених сперматозоїдів до 35–45 % порівняно з нативною. У спермі, замороженій у поліпропіленових пробірках об'ємом 0,5 мл, після розморожування та активації ставовою водою здатності до руху набувало близько 50–60 %

сперматозоїдів. Найвищий показник активності розморожених спермій зберігався у зразках, заморожених у формі гранул – 75–80 %.

Тенденція до зниження якості розморожених зразків зі збільшенням їхнього об'єму була відмічена і за кріоконсервування сперми із захисним середовищем № 2. Рухова активність розморожених спермій із гранул зберігалася на рівні 45–55 %, а за заморожування в пробірках 0,5 мл – 25–30 %.

Заморожування сперми, розведеної кріозахисним середовищем № 3 на основі ДМСО та метанолу не принесло очікуваного результату і викликало значне погіршення якості розморожених зразків сперми, знизивши її активність до 35–45 %, що на 10–15 % нижче порівняно з нативною.

До складу кріорозчину №4 було введено креатин у якості осмолітика, а також проведено заміну КСІ на KHCO_3 . У результаті проведених маніпуляцій показники виживання сперматозоїдів після розморожування сперми становили 60–65 %, що значно вище, ніж дані, отримані нами раніше за використання середовищ на основі метанолу.

Перевірка запліднюючої здатності кріоконсервованої сперми встановила прямий вплив на досліджуваний показник способу заморожування сперми та компонентного складу кріозахисного розчину. Так, показник запліднення ікри розмороженою спермою у досліді коливався від $33,00 \pm 0,80$ до $65,00 \pm 0,49$ %.

Як видно з отриманих результатів, найнижчі показники запліднення ікри відмічалися у тих варіантах, де використовувалася сперма, заморожена в пробірках. Це може бути свідченням недостатнього захисту сперми від пошкоджуючих факторів кріоконсерву-

Ембріональний розвиток стерляді, заплідненої кріоконсервованою та нативною спермою *in vitro* ($M \pm m, n = 3$)

Спосіб кон-сервування	Активність розмороже-них сперма-тозоїдів, %	№ ♀	Запліднення ікри, %	Кількість ембріонів, що розвиваються, %	Відхід ембріонів, %
Кріозахисне середовище №1					
пробірки 1,5 мл	40,00 ± 2,04	20	37,00 ± 1,15***	31,10 ± 0,75***	5,90 ± 1,01
		18	38,30 ± 0,12***	29,60 ± 0,52***	8,70 ± 0,40
пробірки 0,5 мл	56,25 ± 2,39	20	45,0 ± 00,66***	41,90 ± 0,69***	3,10 ± 0,26
гранули 0,1 мл	77,50 ± 1,44		55,00 ± 0,66***	50,70 ± 0,61***	4,30 ± 0,20
контроль		20	85,00 ± 0,12	75,80 ± 0,38	9,20 ± 0,26
		18	79,40 ± 0,44	69,10 ± 0,61	10,30 ± 0,17
Кріозахисне середовище №2					
пробірки 0,5 мл	27,50 ± 1,44	10	33,00 ± 0,80***	28,10 ± 0,55***	4,90 ± 0,51
гранули 0,1 мл	50,00 ± 2,04		65,00 ± 0,49***	55,40 ± 0,38***	9,60 ± 0,87
контроль			83,50 ± 1,18	74,50 ± 0,70	9,10 ± 1,63
Кріозахисне середовище №3					
гранули 0,1 мл	41,25 ± 2,39	20	55,00 ± 1,15***	50,80 ± 0,49***	4,20 ± 0,95
контроль			85,00 ± 0,12	75,80 ± 0,38	9,20 ± 0,26
Кріозахисне середовище №4					
гранули 0,1 мл	63,75 ± 1,25	14	41,00 ± 0,58***	32,90 ± 0,86***	8,10 ± 0,95
контроль			80,70 ± 0,35	73,70 ± 0,55	7,00 ± 0,51

Примітка: різниця достовірна відносно контролю: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$

вання, що і спричинило зниження функціональних властивостей сперматозоїдів після розморожування. Найменший вплив процесу низькотемпературного заморожування на якість сперми відмічено у тих варіантах дослідів, де для запліднення використовувалася сперма із гранул (таблиця 1).

Аналогічна картина відмічалася і за підрахунку кількості ембріонів, що розвиваються. Підрахунок показав, що досліджуваній показник змінювався від 29,60 ± 0,52 до 55,40 ± 0,38 % в залежності від складу кріозахисного розчину та способу заморожування сперми.

Поряд із цим встановлено невисокі показники запліднювальної здатності сперми, замороженої із кріозахисним розчином №4 (41,00 ± 0,58 %), попри доволі високий показник рухової ак-

тивності розморожених сперматозоїдів (63,75 ± 1,25 %). Крім того, встановлено, що, не дивлячись на вищу рухову активність сперматозоїдів у розчинах із ДМСО, їхня запліднююча здатність після розморожування знижується, а в середовищах на основі метанолу – підвищується.

Висновки і перспективи.

Таким чином, у результаті проведених досліджень із розробки оптимального способу заморожування сперми осетрових видів риб вдалося отримати позитивні результати щодо оптимізації складу кріозахисного розчину, що використовувався для розведення сперми стерляді. Зменшення негативного впливу на сперматозо-

їди екстремальних факторів кріоконсервування досягнуто шляхом введення нових складових до кріорозчину та зменшення об'єму заморожуваного зразка до гранул 0,1 мл. Отриманий результат визначає перспективність подальших досліджень.

References

1. Belous, A. M., Gordienko, E. A., Rozanov, L. F. (1987). Biokhimiya membran. Zamorazhivanie i krioprotektsiya. [Membrane biochemistry. Freezing and cryoprotection]. Moscow, Russia: High School, 80.
2. Vepintsev, B. N., Piliev, S. A. (1989). Sokhranit' genofond ryb i vodnykh bespozvonochnykh [To preserve the gene pool of fish and aquatic invertebrates]. Fisheries, 6, 29–32.
3. Kopeyka, E. F. (1986). Instruksiya po nizkotemperaturnoy konservatsii spermy karpa [Instructions on low-temperature preservation of carp sperm]. Moscow: VNIIPRKH, 11.
4. Voinova, N. V. et al. (2003). Ispol'zovanie novykh tekhnologiy v akvakul'ture. Kholodnovodnaya akvakul'tura: start v KhKhI vek: materialy mezhdunarodn. simpoziuma (8–13 sentyabrya 2003 g.) [The use of new technologies in aquaculture. Cold-water aquaculture: a start in the XXI century: materials international. Symposium (September 8–13, 2003)]. St. Petersburg, 78–80.
5. Karnaukhov, V. N. (1994). Problemy i perspektivy sozdaniya geneticheskikh kriobankov dlya tseley sokhraneniya bioraznoobraziya [Problems and prospects of creating genetic cryobanks for the purposes of biodiversity conservation]. Biophysics of living cells, 6, 1–6.
6. Anan'ev, V. I. et al. (2002). Kontseptsiya sokhraneniya i ustoychivogo ispol'zovaniya bioraznoobraziya s primeneniem metodov kriokonservatsii genomov gidrobiontov [The concept of conservation and sustainable use of biodiversity using the methods of cryopreservation of hydrobiont genomes]. All-Russian Research Institute of Freshwater Fisheries. Selected Works. Dmitrov: North Moscow region, 1, I-II, 385-399.
7. Kopeyka, E. F., Anan'ev V. I. (1994). Sostoyanie i nekotorye perspektivy rabot po kriokonservatsii polovykh kletok ryb [State and some prospects of works on cryopreservation of gametes of fish]. Fisheries. Series: Aquaculture, 1, 8–14.
8. Ponomareva, E. N. et al. (2012). Kriokonservatsiya reproduktivnogo materialy ryb: razrabotki Yuzhnogo nauchnogo tsentra Rossiyskoy akademii nauk. Sovremennye rybkhozyaystvennyye i ekologicheskie problemy Azovo-Chernomorskogo regiona: materialy VII mezhdunarodnoy konferentsii (20–23 iyunya 2012 g.) [Cryopreservation of fish reproductive materials: developments of the Southern Scientific Center of the Russian Academy of Sciences]. Modern fisheries and environmental problems of the Azov-Black Sea region: materials of the VIIth International Conference (June 20–23, 2012). Kerch, YugNIRO, 2, 55–58
9. Ponomareva, E. N. et al. (2009). Optimizatsiya protsessa kriokonservatsii spermy osetrovyykh ryb pri ispol'zovanii razlichnykh sred. Izvestiya Samarskogo nauchnogo tsentra Rossiyskoy akademii nauk [Optimization of the cryopreservation process of sturgeon sperm using different media]. Proceedings of the Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, 11, 1 (2), 132–134.
10. Ponomareva, E. N. et al. (2010). Rezul'taty razrabotki metodov formirovaniya matochnykh stad sterlyadi v usloviyakh zamknutogo vodoobespecheniya [The results of the development of methods for the formation of uterine herds of sterlet in the conditions of closed water supply]. Bulletin of ASTU. Series: Fisheries, 1, 86–91.
11. Tsvetkova, L. I. et al. (2001). Tekhnologiya kriokonservatsii i khraneniya v nizkotemperaturnom banke spermy ryb [The technology of cryopreservation and storage in a low-temperature jar of fish sperm].

Collection of scientific, technical and methodological documentation on aquaculture. Moscow: VNIRO, 152–158.

12. Glogowski, J., Kolman, R., Szczepkowski, M., Horvath, A., Urbanyi, B., Siczynski, P., Rze-

mieniecki, A., Domagala, J., Demianowicz, W., Kowalski, R. & Ciereszko, A. (2002). Fertilization rate of Siberian sturgeon (*Acipenser baeri* Brandt) milt cryopreserved with methanol. *Aquaculture*, 211, 367-373.

I. S. Kononenko, R. V. Kononenko (2019). WAYS FOR CRYORESISTANCE INCREASE OF STURGEON SPERM. ANIMAL SCIENCE AND FOOD TECHNOLOGY, 10(1): 5-10.

<https://doi.org/>

Abstract. *A significant decrease in the number and genetic diversity of sturgeons is taking place at the current stage. It is not possible to solve the problems concerning the preservation of their biodiversity without the usage of rational approaches and biotech techniques. One of the promising directions for solving this problem is a sperm cryoconservation. However, despite the significant number of studies in this direction, some research issues still remain completely unresolved. For example, the composition of cryoprotective solution used for sperm freezing need to be optimized. The studies, highlighted in this paper, were aimed at finding the ways to optimize the process of sturgeon (namely sterlet) sperm cryoconservation in order to increase the quality of defrosted product and fish-biological results of the fish egg fertilization. The conducted research allowed us to establish the positive results of introduction of a new substances into the cryoprotective solution. The method of the sterlet sperm freezing was also optimized, allowing to improve the investigated parameters. Obtained results can be promising in sturgeon aquaculture, as well as for the sperm and fish egg deposition of rare and endangered fish species in cryobanks.*

Keywords: *cryoconservation, sterlet, sexual products, cryoprotective solution, sperm, methanol, creatine.*
