

## Криоконсервирование спермы стерляди: оптимизация состава криозащитной среды

А.Ю. Пуговкин<sup>1</sup>, И.С. Кононенко<sup>2</sup>, Р.В. Кононенко<sup>2</sup>,  
К.И. Буцкий<sup>1</sup>, В.А. Черепнин<sup>3</sup>, Е.Ф. Копейка<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

<sup>2</sup>Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, г. Киев

<sup>3</sup>Институт рыбного хозяйства НААН Украины, г. Киев

## Cryopreservation of Sterlet Sperm: Optimization of Cryoprotective Medium Composition

A.Yu. Puhovkin<sup>1</sup>, I.S. Kononenko<sup>2</sup>, R.V. Kononenko<sup>2</sup>,  
K.I. Butskiy<sup>1</sup>, V.A. Cherepnin<sup>3</sup>, E.F. Kopeika<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine  
of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv

<sup>2</sup>National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kiev

<sup>3</sup>Institute of Fisheries of the National Academy of Agricultural Sciences of Ukraine, Kiev

Криоконсервирование спермы является приоритетным методом сохранения биоразнообразия осетровых рыб. Для получения успешных воспроизводимых результатов необходима разработка новых и совершенствование существующих технологий низкотемпературного консервирования спермы. Цель настоящей работы – криоконсервирование спермы стерляди *Acipenser ruthenus*.

Самцов выдерживали в термоконтейнере с искусственным подогревом воды. Температуру на протяжении 21 суток повышали на 0,5°C в сутки, имитируя таким образом природные условия нереста. На момент проведения стимулирующих инъекций и получения половых продуктов температура воды составляла 14,3°C. Качество спермы определяли по уровню подвижности сперматозоидов: нативной спермы, после разбавления ее криозащитным раствором и после отогрева. Сперму криоконсервировали в гранулах (0,05–0,1 мл) и ампулах (0,5 и 1,5 мл) по трехэтапной программе [Копейка Е.Ф., 1986] с использованием сред различного состава.

Высокие показатели выживаемости сперматозоидов (подвижность на уровне 75–80%) были получены при использовании криозащитного раствора, в состав которого входили KCl, сахароза, глицин, ДМСО (конечная концентрация 9%). В связи с установленным негативным влиянием ДМСО на генетический аппарат [Horvath A., 2005] он был заменен на метанол. При использовании среды, содержащей KCl, сахарозу, глицерин, метанол в конечной концентрации 5%, подвижность отогретой спермы составляла 40–45%. При повышении концентрации метанола до 7,5% подвижность увеличилась до 50–55%. Положительный эффект был получен после замены KCl на KHCO<sub>3</sub> и добавления в среду креатина: подвижность достигла 60–65%. Более высокие показатели были отмечены после модификации среды плазмой крови карася, полученной в зимнее время; модификация среды антифризными белками, выделенными из личинки морозостойкого хрущака *Tenebrio molitor*, не оказала заметного влияния. Результаты оплодотворения, оцененные на стадии 2–3-го деления, во всех опытных образцах составили 50–55% и осеменения нативной спермой – 80–85%.

Таким образом, показана целесообразность использования криозащитных сред на основе метанола для низкотемпературного консервирования спермы стерляди.

Cryopreservation of sperm is of importance to preserve the biodiversity of sturgeons. For successful reproducible results it is necessary to develop the new technologies of sperm low-temperature preservation and improve the existing ones. The purpose of this work was to cryopreserve the sperm of *Acipenser ruthenus* sterlets.

The males were kept in the insulated container with artificial heating of water. Over 21 days the temperature was increased by 0.5°C a day, thus mimicking the natural spawning conditions. At the time of stimulating injections and obtaining the sexual products the water temperature was 14.3°C. Semen quality was determined by the level of sperm motility in native sperm, the sperm after diluting with cryoprotectant solution and after thawing. Sperm were cryopreserved in granules (0.05–0.1 ml) and vials (0.5 and 1.5 ml) according to a three-stage program [Kopeika Ye.F., 1986] using the media of various compositions.

High rates of sperm survival (75–80% motility) were obtained using a cryoprotective solution composed of KCl, sucrose, glycine, DMSO (final concentration of 9%). In view of the known DMSO adverse effect on the genetic apparatus [Horvath A., 2005] it was replaced by methanol. When using a medium containing KCl, sucrose, glycerol, methanol at a final concentration of 5%, the motility of frozen-thawed sperm made 40–45%. After increasing the methanol concentration up to 7.5% the motility increased up to 50–55%. Positive effect was obtained after replacing KCl by KHCO<sub>3</sub> and adding creatine into the medium. This resulted in reaching the motility of 60–65%. Higher rates were obtained after supplementing the medium with the crucian carp blood plasma obtained in winter; while modification of the medium with antifreeze proteins isolated from larvae of cold-resistant beetle *Tenebrio molitor* had no noticeable effect. Fertilization assessed at the stage of 2<sup>nd</sup>–3<sup>rd</sup> division in all the tested samples made up to 50–55%; in case of fresh sperm insemination it was 80–85%.

Thus, the expediency of using the cryoprotective media based on methanol for low temperature preservation of sterlet sperm has been shown.

