

УДК: 606:639.212/.3.03:57.086.13

**ОПТИМІЗАЦІЯ КРІОЗАХИСНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ  
ЗАМОРОЖУВАННЯ СПЕРМИ СТЕРЛЯДІ  
(*ACIPENSER RUTHENUS*, L. 1758)**

**І. С. КОНОНЕНКО**, асистент кафедри аквакультури,

*Національний університет біоресурсів та природокористування України*

*E-mail: kononenko\_irina88@ukr.net*

**А. Ю. ПУГОВКІН**,

*Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України*

*E-mail: lima@online.ua*

**Р. В. КОНОНЕНКО**, кандидат ветеринарних наук,

*Національний університет біоресурсів та природокористування України*

*E-mail: ruslan\_kononenko@ukr.net*

**В. О. ЧЕРЕПНІН**,

*Інститут рибного господарства НААН України*

*E-mail: diglador@ukr.net*

**Є. Ф. КОПЄЙКА**, кандидат біологічних наук,

*Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України*

*E-mail: ekopeik@yahoo.com*

***Анотація.** Проведено оптимізацію складу кріозахисного розчину для заморожування статевих продуктів самців стерляді та досліджено вплив компонентного складу кріорозчинів на якість отриманого потомства. Встановлено, що ембріональний розвиток ікри стерляді, заплідненої нативною та кріоконсервованою спермою, достовірних відмінностей у показниках не має. Потомство, отримане в результаті запліднення ікри кріоконсервованою спермою, характеризувалося вищими показниками лінійно-вагового приросту.*

***Ключові слова:** стерлядь, кріоконсервування, запліднення, ембріональний розвиток, креатин, плазма крові карася*

**Актуальність.** Кріоконсервування сперми осетрових видів риб набуло найбільшої актуальності за останні десятиріччя. Проте, не зважаючи на величезну кількість інформації з даного питання, низькотемпературне

заморожування стикається з рядом проблем та перешкод, врахувати і звести до мінімуму негативну дію яких не завжди можливо.

Загальновідомо, що результат кріоконсервування сперми риб залежить від правильного підбору складових компонентів кріозахисного розчину, який забезпечує захист клітин у процесі заморожування – розморожування. Головною вимогою до кріозахисного розчину є збереження специфічної функціональної повноцінності біологічного об'єкту (спермій) за мінімального токсичного впливу компонентів [9]. Правильний підбір оптимального компонентного складу кріозахисного розчину забезпечить зберігання високих показників якості сперми, що, в свою чергу, є необхідною умовою отримання життєстійкого потомства для потреб товарної аквакультури та відновлення чисельності осетрових у природних водоймах.

**Аналіз останніх досліджень та публікацій.** Аналіз даних фахових джерел свідчить, що молодь, отримана за використання розмороженої сперми, за своїми лінійно-ваговими характеристиками не поступається потомству, отриманому стандартним методом.

Дослідженнями, проведеними українськими вченими на спермі коропа, не встановлено різниці між показниками приросту та відсотку виживання молоді експериментальної та контрольної груп. Автори повністю не виключають вплив процесу кріоконсервування на отримані результати, однак, переконані, що, якщо різниця у досліджуваних показниках молоді існує, то вона не є значною, або ж не проявляється в умовах конкретного досліду чи на першому році життя [1].

Дослідами зі статевими продуктами сибірського осетра встановлено переважання за темпом росту молоді, отриманої з використанням кріоконсервованої сперми, над молоддю, отриману від нативної сперми. Крім того, особини, одержані в результаті використання кріоконсервованої сперми, характеризувалися вищою активністю живлення та резистентністю. В результаті подальших робіт із формування маточного стада сибірського осетра і його гібрида не було встановлено різниці у морфо-фізіологічних та

репродуктивних показниках дослідних особин [5, 6]. Аналогічні дослід з вивчення даного питання на спермі коропа підтвердили попередні результати. Автори відмічають не лише вищі лінійно-вагові показники молоді, але й ефективніше використання штучних кормів із меншими затратами [6].

**Мета досліджень** – оптимізувати склад кріозахисного середовища для низькотемпературного заморожування статевих продуктів самців стерляді та дослідити вплив компонентного складу кріорозчинів на якість отриманого потомства.

**Матеріали та методи досліджень.** Дослідження проводилися на базі навчально-науково-виробничої лабораторії рибництва кафедри аквакультури НУБіП України. Об'єкти досліджень – плідники стерляді, їх статеві продукти і молодь, отримана з використанням нативної (контроль) та кріоконсервованої сперми.

Всі маніпуляції із плідниками стерляді (стимулювання дозрівання, отримання статевих продуктів та оцінка їх якості) проводилися згідно з технологіями проведення робіт в осетрівництві [7, 8].

Роботи з кріоконсервування статевих продуктів самців стерляді проводилися згідно загальноприйнятих у кріобіології методик [2]. Заморожування сперми проводили у гранулах, об'ємом 100 мкл. В якості модифікаторів кріозахисних середовищ використовували креатин, фруктозу та плазму крові карася сріблястого (*Carassius gibelio*), який пройшов природну холодову акламацію. Крім того, було здійснено заміну КСІ на  $\text{KHCO}_3$ . Заморожування статевих клітин стерляді проводили з використанням двох кріозахисних середовищ:

№ 1:  $\text{KHCO}_3$  – 8,9 мМ, креатин моногідрат – 3,8 мМ, сахароза – 11,7 мМ, фруктоза – 5,6 мМ, метанол – 3,75 М, дистильована вода (експериментальна група № 1);

№ 2:  $\text{KHCO}_3$  – 8,9 мМ, креатин моногідрат – 7,6 мМ, сахароза – 11,7 мМ, фруктоза – 5,6 мМ, метанол – 3,75 М, плазма крові карася 1:800 (v/v), дистильована вода (експериментальна група № 2).

Якість нативної та розмороженої сперми стерляді визначали методом експрес-оцінювання після активації сперми ставовою водою за відсотковим співвідношенням сперміїв із прямолінійно-поступальним рухом до загальної кількості сперматозоїдів в полі зору мікроскопу.

Оцінку якості процесу кріоконсервування здійснювали за показниками відсотку запліднення ікри (на стадії 4-х бластомерів) та кількості ембріонів, що розвиваються (до стадії гастрული) шляхом порівняння отриманих результатів із контролем.

Оцінку якості отриманого потомства проводили в порівняльному аспекті між контрольною та експериментальною групами за показниками абсолютного приросту маси і довжини тіла протягом 3 місяців вирощування.

**Результати досліджень та їх обговорення.** З метою отримання потомства стерляді використовували самців віком 8-9 років середньою масою  $1,1 \pm 0,02$  кг та довжиною тіла  $57,1 \pm 1,37$  см. Вік самок, що увійшли до нерестової групи, становив у середньому 9 років, показники маси та довжини тіла – відповідно  $1,61 \pm 0,1$  кг та  $69,6 \pm 3,01$  см (табл. 1, 2). Групу плідників становили особини, що вже неодноразово використовувалися за відтворення стерляді у заводських умовах та характеризувалися задовільними репродуктивними показниками.

В результаті проведення ін'єкцій гормональними препаратами плідники 100 % відреагували на стимулювання дозрівання їх статевих продуктів препаратом гіпофізу ляща. Це свідчить про високу продуктивну якість плідників та сприятливі умови їх переднерестового утримування.

Всього від самців було отримано від 25 до 40 мл сперми (табл. 1).

Якість статевих продуктів була оцінена у 5 балів, частка сперміїв з прямолінійно-поступальним рухом знаходилася на рівні 95-100 %. Отримані дані характеризують статеві продукти як такі, що мають високий потенціал рухової активності сперматозоїдів та є фізіологічно повноцінними для використання з метою рибозведення та кріоконсервування.

## 1. Рибоводно-біологічні показники самців стерляді

№ ♂	Вік, років	Маса (W), кг	Довжина (L), см	Об'єм еякуляту, мл
31	8	1,1	55,4	25
15	9	1,15	59,2	25
30	9	1,1	56,7	40
M ± m	8,7 ± 0,41	1,1 ± 0,02	57,1 ± 1,37	31,0 ± 6,61

Від самок було отримано від 120 до 170 г нативної ікри. Аналіз репродуктивних даних самок показав, що їх робоча плодючість знаходилася в межах нормативних величин і становила  $15,5 \pm 1,22$  тис ікринок. Відносна робоча плодючість самок становила в середньому  $9,67 \pm 1,19$  тис ікр./кг. Загальна кількість ікринок в 1 г коливалася від 97 до 117 шт. ( $104,5 \pm 5,02$  шт.) (табл. 2).

## 2. Рибоводно-біологічні показники самок стерляді

№ ♂	Вік, років	Маса (W), кг	Довжина (L), см	Маса ікри, мг	Ікринок в 1 г, шт	РП, тис ікр	ВРП, тис ікр./кг
1	10	1,6	68,4	170	97	16,49	10,3
11	9	1,7	71,6	120	103	12,36	7,27
24	8	1,4	63,0	145	117	16,97	12,12
34	9	1,8	75,3	160	101	16,16	8,97
M ± m	9,0 ± 0,47	1,63 ± 0,1	69,6 ± 3,01	148,4 ± 12,6	104,5 ± 5,02	15,5 ± 1,22	9,67 ± 1,19

Загалом, рибоводно-біологічні та репродуктивні показники плідників свідчать про їх високу якість та відповідають вимогам для використання в умовах штучного відтворення.

Для оптимізації процесу кріоконсервування сперми стерляді було проведено модифікацію кріозахисного середовища та зменшено об'єм заморожуваного зразка до 100 мкл.

У розведеній кріозахисними середовищами № 1 та № 2 спермі активність сперматозоїдів становила відповідно 95 та 80-85 %. Зниження якості сперми, розведеної середовищем № 2, пов'язана, головним чином, зі збільшенням осмотичності кріорозчину. Це пов'язано з подвійною концентрацією креатину, порівняно з середовищем № 1. Після розморожування показник активності спермій, заморожених в обох розчинах, знизився до 75-80 %.

Вплив осмотичного тиску проявився і у разі запліднення ікри, знизивши його показники. Так, розвиток ікри, заплідненої спермою, розведеною кріозахисним розчином № 1, на стадії 4-х бластомерів проходив на рівні з контролем. Ікра, запліднена спермою, кріоконсервованою у кріорозчині № 2, характеризувалася нижчими показниками ембріонального розвитку порівняно із контролем та середовищем № 1. Аналогічні дані отримані після перевірки ікри через 22-24 год після запліднення під час визначення кількості ембріонів, що розвиваються (табл. 3).

### **3. Запліднення ікри та кількість ембріонів, що розвиваються, у варіантах дослідів, $M \pm m$**

Показник	Контроль	Середовище № 1	Середовище № 2
Запліднення ікри, %	87,6 ± 0,14	85,6 ± 3,52	68,0 ± 7,1
Ембріони, що розвиваються, %	79,77 ± 0,47	77,02 ± 3,91	60,46 ± 8,88
Вихід передличинок з інкубації, %	68,7 ± 0,57	63,2 ± 6,09	47,3 ± 7,15

Показники виходу передличинок з ікри, заплідненої спермою кріоконсервованою у розчині № 1, були фактично рівними показникам контрольної партії. В результаті використання сперми, замороженої у кріозахисному розчині № 2, вихід передличинок з інкубаційних апаратів був нижчий на 21 % порівняно з контролем. На нашу думку, зниження показника запліднюючої здатності сперміїв та виходу передличинок можна пояснити вищою осмотичністю середовища за рахунок більшої концентрації креатину та його накопиченням у клітинах сперматозоїдів внаслідок збільшення проникності їх мембран [4].

Аналізуючи результати запліднення ікри спермою, замороженою в кріозахисному розчині № 1, та вплив даного компонентного розчину на статеві клітини самців, можна зробити висновок про кращий захист сперміїв від впливу екстремальних факторів кріоконсервування у вищезгаданому компонентному розчині.

Для кращої оцінки впливу кріоконсервування статевих продуктів самців стерляді на результати вирощування проводився контроль за лінійно-ваговими показниками молоді контрольної та експериментальної груп (табл. 4).

#### 4. Результати лінійно-вагових вимірювань молоді стерляді, $M \pm m$ (n = 50)

Вік молоді	Маса, мг			Довжина, мм		
	Контроль	Група-1	Група-2	Контроль	Група-1	Група-2
2 доби	8,34±0,16	8,72 ± 0,16	8,74 ± 0,16	7,76 ± 0,12	8,46±0,18	8,48±0,14
9 діб	21,20±0,42	21,64±0,36	20,72±0,37	15,90 ± 0,14	16,10±0,13	16,38±0,14
17 діб	67,32±2,62	71,62±2,27	78,94±2,14	22,52±0,34	23,02±0,30	23,66±0,27
31 доба	237,5±9,81	258,18±10,18	277,18±9,94	32,78±0,65	35,4±0,56	36,92±0,50
	Маса, г			Довжина, см		
45 діб	0,91 ± 0,04	1,09±0,05	1,25±0,06	5,01±0,08	5,21±0,07	5,38±0,08
62 доби	1,88 ± 0,09	2,29±0,09	2,50±0,11	5,68±0,07	6,12±0,10	6,55±0,11
77 діб	2,37 ± 0,10	3,02±0,08	3,28±0,09	6,62±0,12	7,11±0,08	7,34±0,08
91 доба	3,96 ± 0,21	4,37±0,21	5,05±0,26	8,39±0,13	8,78±0,13	9,09±0,18

Встановлено тенденцію переважання показників лінійно-вагового росту молоді стерляді, отриманої із використанням кріоконсервованої сперми. Поряд з цим, на етапі переходу на активне живлення (9 доба) експериментальна група риб № 2 характеризувалася вищими показниками маси та довжини тіла, порівняно з першою та контрольною групами.

Таким чином, збільшення маси та довжини тіла молоді, отриманої після запліднення ікри розмороженою спермою після кріоконсервування в обох кріозахисних розчинах можна пояснити селективним впливом екстремальних факторів кріоконсервування за рахунок загибелі всіх ослаблених сперміїв, що не витримали холодового або осмотичного шоку [3].

Отримані нами результати свідчать про перспективи використання кріоконсервування сперми стерляді в заводських масштабах із наступним використанням вирощеної молоді як для потреб товарної аквакультури, так і з метою поповнення природних запасів.

**Висновки та перспективи подальших досліджень.** Таким чином, в результаті проведених досліджень встановлено вплив факторів кріоконсервування (осмотичність та компонентний склад середовищ) на

збільшення довжини та маси отриманої молоді. Так, в середовищі з меншою осмотичністю молодь характеризувалася значно меншими показниками лінійно-вагово приросту. Маса і довжина тіла молоді експериментальних груп стерляді впродовж 3 місяців відзначалась вищими показниками приросту, порівняно з контрольною групою. Водночас приріст маси молоді був меншим за використання сперми, кріоконсервованої в розчині № 1 із меншою концентрацією креатину та без плазми крові карася.

Отримані результати дозволяють рекомендувати використання кріоконсервованої сперми стерляді з метою отримання якісного потомства за умови використання розроблених нами кріозахисних середовищ.

### Список літератури

1. Вивчення впливу кріоконсервування сперми на розвиток молоді українських порід коропа/ О. Л. Безусий, В. О. Черепнін, В. В. Бех [та ін.] – Рибогосподарська наука України. – 2010. – № 4. – С. 95-100.
2. Копейка Е. Ф. Инструкция по низкотемпературной консервации сперму карпа [Текст] / Е. Ф. Копейка. – М.: Изд-во ВНИИПРХ, 1986. – 11 с.
3. Повреждения сперматозоидов руб при кріоконсервации / Е. Ф. Копейка, С. И. Дрокин, О.В. Бибенко [и др.] // Достижения и перспективу развития криобиологии и криомедицину : междунар. конф. : тез. докл. – Харьков, 1988. – С. 69–70.
4. Проницаемость мембран сперматозоидов стерляди (*Acipenser Ruthenus* L., 1758) для молекул воду / А. Ю. Пуговкин, И. С. Кононенко, В. А. Черепнин [и др.] – Рибогосподарська наука України. – 2016. – № 1. – С. 70-77.
5. Савушкина С. И. Вурачивание рубопосадочного материала, полученного с использованием кріоконсервированной сперму / С. И. Савушкина // Рациональное использование пресноводных экосистем – перспективное направление реализации национального проекта «Развитие АПК»: науч.-практ. конф. 17–19 декабря 2007 г. : материалу. – М.: Россельхозакадемия, 2007. – С. 303-305.
6. Савушкина С. И. Качество производителей сибирского осетра, при получении которух использована кріоконсервированная сперма / С. И. Савушкина// Аквакультура и интегрированное технологи: проблему и возможности: Международная научно-практическая конференция: материалу. – М.: 2005. – С. 227-232.
7. Судакова Н. В. Технологии и нормативу по товарному осетроводству в VI рубоводной зоне [Текст] / Н. В. Судакова. – Москва: ВНИРО, 2006. – 100 с.



8. Чебанов М. С. Руководство по разведению и выращиванию осетровых рыб / М. С. Чебанов, Е. В. Галич, Ю. М. Чмурь. – Москва: Росинформагротек, 2004. – 135 с.

9. Юрченко Т. Н. Влияние криопротекторов на биологические системы [Текст] / Т. Н. Юрченко. – Киев: Наукова Думка, 1989. – 98 с.

### References

1. Bezusyi O.L., Cherepnin V.O., Bekh V.V., Kopieika Ie.F. & Drokin S.I. (2010) Vyvchennia vplyvu kriokonservuvannia spermy na rozvytok molodi ukrainskykh porid koropa [The study of the impact of sperm cryopreservation on the development of young Ukrainian carp]. Fisheries science of Ukraine, 4, 95–100.

2. Kopeyka E.F. (1986) Ynstruktsyya po nyzkotemperaturnoy konservatsyy spermi karpa [The instruction for low-temperature preservation of carp sperm]. Moscow: VNYYPRKh

3. Kopeyka, E.F., Drokin, S.I., Bibenko, O.B., & Neyfakh, A.A. (1988). Povrezhdenyya spermatozoydov ryb pry kryokonservatsyy [The damage to fish spermatozoa during cryopreservation]. Dostyzhennyya y perspektyvy rozvytyya kryobyolohyy y kryomedytsyny. Kharkov, 69–70.

4. A.Yu. Puhovkyn, Y.S. Kononenko, V.A. Cherepnyn, Y.Y. Hrytsynyak & E.F. Kopeyka (2016) Pronytsaemost' membran spermatozoydov sterlyady (Acipenser Ruthenus L., 1758) dlya molekul vody [The permeability of sterlet sperm membranes (Acipenser ruthenus L., 1758) for water molecules]. Fisheries science of Ukraine, 1, 70 – 77.

5. Savushkyna S.Y. (2007) Vyrashchyvanye ryboposadochnoho materyala, poluchennoho s yspol'zovanyem kryokonservirovannoy spermy [The growing of fish sperm material which was received using cryopreserved sperm]. Ratsyonal'noe yspol'zovanye presnovodnykh ekosystem – perspektyvnoe napravlenye realizatsyy natsyonal'noho proekta «Rozvytye APK» : naukchno-praktycheskaya konferentsyya. Moscow, 303–305.

6. Savushkyna S.Y. (2005) Kachestvo proyzvodyteley sybyskoho osetra, pry poluchenyy kotorykh yspol'zovana kryokonservirovannaya sperma [The quality of Siberian male sturgeon which were born using cryopreserved sperm]. Akvakul'tura y yntehrovannyye tekhnolohyy: problemi y vozmozhnomy : Mezhdunarodnaya naukchno-praktycheskaya konferentsyya. Moscow, 227–232.

7. Sudakova N.V. (2006) Tekhnolohyy y normatyvy po tovarnomu osetrovodstvu v VI rybovodnoy zone [The technologies and standards for commercial sturgeon growing in the VIth fish zone]. Moscow: VNYRO.

8. Chebanov M.S., Halych E.V. & Chmyr' Yu.M. (2004) Rukovodstvo po razvedenyyu y vyrashchyvanyyu osetrovyykh ryb [The guide for breeding and growing sturgeon]. Moscow: Rosynformahrotek.

9. Yurchenko T.N. (1989) Vlyyanye kryoprotektorov na byolohycheskye system [The effect of cryoprotectants on biological systems]. Kyiv: Naukova Dumka.

## ОПТИМИЗАЦИЯ КРИОЗАЩИТНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ ЗАМОРАЖИВАНИЯ СПЕРМЫ СТЕРЛЯДИ (*ACIPENSER RUTHENUS*, L. 1758)

И. С. Кононенко, А. Ю. Пуговкин, Р. В. Кононенко, В. А. Черепнин,  
Е. Ф. Копейка

*Аннотация.* Осуществлено оптимизацию состава криозащитного раствора для замораживания половых продуктов самцов стерляди, исследовано влияние компонентного состава криораствора на качество полученного потомства. Установлено, что эмбриональное развитие икры стерляди, оплодотворенной нативной и криоконсервированной спермой, достоверных отличий в показателях не имело. Потомство, полученное в результате оплодотворения икры криоконсервированной спермой, характеризовалась лучшими показателями линейно-массового прироста.

*Ключевые слова:* стерлядь, криоконсервирование, оплодотворение, эмбриональное развитие, креатин, плазма крови карася

## THE OPTIMIZATION OF CRYOPROTECTIVE ENVIRONMENT FOR SPERM CRYO PRESERVATION IN STURGEON (*ACIPENSER RUTHENUS*, L. 1758)

I. Kononenko, A. Pugovkin, R. Kononenko, V. Cherepnin, E. Kopeyka

*Abstract.* The paper shows that the cryoprotectant solution for freezing male sturgeon semen has been improved and the impact of elements of its solution on the quality of has been studied. There are no confirmed differences in embryonic development of sturgeon eggs fertilized with cryopreserved sperm. The fish received from eggs fertilized with cryopreserved semen was characterized with better linear and weight indicators.

*Keywords:* sturgeon, cryopreservation, fertilizing, embryonic development, creatine, *Carassius gibelio* plasma