



Криоконсервация спермы осетрообразных рыб: современное состояние и перспективы. Часть 1

Продолжение в следующем номере

Обзорная статья
УДК 57.086.13:639.3.034:597.423

DOI: 10.36038/0131-6184-2024-2-110-122

Докина Ольга Борисовна – кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории криобиологии
E-mail: olgadokina@mail.ru

Ковалев Константин Викторович – кандидат сельскохозяйственных наук, заведующий лабораторией криобиологии
E-mail: silur5@mail.ru

Пронина Наталья Дмитриевна – главный специалист лаборатории криобиологии,
E-mail: proninatasha@rambler.ru

Филиал по пресноводному рыбному хозяйству ФГБНУ «ВНИРО» («ВНИИПРХ»)

Адрес: Россия, 141821, Московская область, Дмитровский городской округ, пос. Рыбное, д. 40А

Аннотация. Проведен анализ опубликованной информации в области криоконсервации спермы осетрообразных рыб. В представленном обзоре кратко прослеживается исторический опыт разработки способов криоконсервации и детально рассматривается современное состояние исследований за последние два десятилетия. Систематизированы технологические подходы, выявлены наиболее перспективные тенденции развития и существующие проблемы.

Ключевые слова: криоконсервация, криопротектор, криоконсервированная сперма, осетровые рыбы, осетрообразные рыбы

Для цитирования: Докина О.Б., Ковалев К.В., Пронина Н.Д. Криоконсервация спермы осетрообразных рыб: современное состояние и перспективы // Рыбное хозяйство. 2024. № 2. С. 110-122.

DOI: 10.36038/0131-6184-2024-2-110-122

CRYOPRESERVATION OF ACIPENSERIFORMES SPERM: CURRENT STATUS AND PERSPECTIVES

Olga B. Dokina – Candidate of Chemical Sciences, Leading Researcher at the Laboratory of Cryobiology

Konstantin V. Kovalev – Candidate of Agricultural Sciences, Head of the Cryobiology Laboratory

Natalia D. Pronina – chief Specialist of the Cryobiology Laboratory

Freshwater Fisheries Branch of VNIRO («VNIIPRH»)

Address: Russia, Moscow region, Dmitrovsky city district, 141821, village Rybnoye, 40A

Annotation. An analysis of published information in the field of cryopreservation of acipenseriformes sperm was carried out. The presented review briefly traces the historical experience in the development of cryopreservation methods and examines in detail the current state of research over the past two decades. Technological approaches are systematized, the most promising development trends and existing problems are identified.

Keywords: cryopreservation, cryoprotectant, cryopreserved sperm, sturgeons, acipenseriformes

For citation: Dokina O.B., Kovalev K.V., Pronina N.D. Cryopreservation of acipenseriformes sperm: current state and prospects // Fisheries. 2024. № 2. Pp.110-122. DOI: 10.36038/0131-6184-2024-2-110-122

ВВЕДЕНИЕ

К отряду осетрообразных (*Acipenseriformes*) – одной из самых древних групп хрящевых ганоидов, обитающей только в Северном полушарии, принадлежат рыбы семейства осетровых (*Acipenseridae*): осетры (*Acipenser*), белуги (*Huso*), американские лопатоносы (*Scaphirhynchus*), желолопатоносы (*Pseudoscaphirhynchus*) и семейства веслоносов (*Polyodontidae*). Столетиями эти рыбы высоко ценились за их деликатесное малокожное мясо и икру. В настоящее время большинство видов сократилось до очень малых популяций и находится под угрозой исчезновения из-за сверхэксплуатации, загрязнения и разрушения мест обитания. Развитие технологий искусственного воспроизводства позволило запустить программы их восстановления и выращивать некоторые виды в хозяйствах для пищевого потребления.

Активно развиваемая во всем мире криоконсервация спермы рыб может способствовать улучшению работы рыбоводных хозяйств, обеспечивая круглогодичное, исключаяющее риск несвоевременного созревания производителей, снабжение репродуктивными клетками самцов из криобанков, гибридизацию, половую манипуляцию (андрогенез и гиногенез), обмен генетическим материалом между хозяйствами, введение генов от диких рыб в рыбоводные популяции и развитие генетически полноценного потомства. В ряде случаев криоконсервация спермы может оказаться безальтернативным методом сохранения и восстановления исчезающих видов.

При разработке технологий криоконсервации должны учитываться уникальные особенности спермы осетрообразных, отличающие ее от спермы костистых рыб, включающие морфологию (наличие у сперматозоида вытянутого цилиндрического ядра, верхушечной функциональной акросомы, средней части с несколькими митохондриями), физиологию (низкая концентрация и продолжительная подвижность спермы, акросомная реакция) и биохимию (низкое содержание протеина, низкая осмоляльность семенной плазмы, наличие акрозина).

Исследования в области криоконсервации спермы осетрообразных рыб уже более полувека проводятся в России, Украине, ряде стран Европы, Иране, Китае и США. Наибольшие успехи в разработке технологий и изучении различных аспектов процесса криоконсервации были достигнуты в последние два десятилетия. В настоящей работе предпринята попытка более обширного охвата опубликованного материала последнего периода, чем это было сделано в предыдущих обзорах [1-5].

Исторический опыт разработки способов криоконсервации спермы осетрообразных рыб

Большинство исследований в данной области, проведенных в XX в., было выполнено на сперме осетровых рыб, начиная от первой попытки криоконсервации, предпринятой в Советском Союзе в конце 60-х годов И.А. Бурцевым и Е.В. Себряковой [6]. Сперму белуги (*H. huso*), калуги (*H. dauricus*) и стерляди (*A. ruthenus*) в криоза-

щитной среде, содержащей 7% сахарозы или лактозы, 10% желтка куриного яйца и 5% глицерина, а также сперму бестера (белуга × стерлядь) в 0,4% растворе NaCl с 14% глицерина замораживали в гранулах по 0,1-0,2 мл на сухом льду и через 2-3 мин. переносили в жидкий азот (LN₂). Результатами опытов, в которых варьировались соотношения разбавления спермы средой, время эквilibрации получаемой суспензии, время хранения в LN₂ и составы растворов для активации оттаявшей спермы, было получение после размораживания от 10 до 100% подвижных клеток, однако оплодотворение ими икры во всех случаях не превышало 1%.

Большого успеха в середине 70-х годов прошлого века впервые добились украинские ученые Института проблем криобиологии и криомедицины (ИПККиК) АН УССР, получив 50-60% поступательно движущихся клеток после криоконсервации спермы севрюги (*A. stellatus*) и русского осетра (*A. gueldenstaedti*) в среде на основе трис-буфера с диметилсульфоксидом (ДМСО) и желтком. Сперма севрюги после 7-23 дней хранения в LN₂ оплодотворяла 63% икры по сравнению с 77% оплодотворения свежей спермой в контроле [7; 8].

Итогом дальнейших исследований, проведенных этим коллективом под руководством Е.Ф. Копейки на разных видах осетровых (белуге, русском осетре, сибирском осетре (*A. baeri*), сахалинском осетре (*A. medirostris*), шипе (*A. nudiventris*), стерляди, севрюге) [9-15], стало представление обобщенных технологических рекомендаций по криоконсервации спермы. Было установлено, что предпочтительными компонентами криопротекторной среды являются 10-15% ДМСО, 100-150 мМ трис-НСl, рН 8.1, 10-15% желтка. При этом наиболее успешным было замораживание спермы в 0,5-1,5 мл полипропиленовых ампулах в парах LN₂ по трехэтапной программе [16; 17]. Одновременно сообщалось о сохранении подвижности у 30-40% сперматозоидов сибирского осетра и севрюги и 15-20% сперматозоидов сахалинского осетра после криоконсервации в среде с 20мМ трис-НСl буфера, рН 8.0, 15% ДМСО и 18% желтка по трехэтапной программе: со скоростью 2-5 °С/мин от 5 до -15°С, 20-25°С/мин от -15 до -70 °С с последующим погружением в LN₂. Авторы предполагали, что низкая криорезистентность спермы сахалинского осетра может быть связана с обнаруженными в ней пониженным содержанием фосфатидилэтаноламина и фосфатидилхолина и высокой активностью фосфолипазы, приводящей к повреждению мембран [18; 19]. По той же технологии (с концентрациями ДМСО 14,4-24% и желтка 9,6%) была заморожена сперма атлантического осетра (*A. sturio*) с по-

лучением после оттаивания 10-15% подвижных клеток (по сравнению с 50% в нативной сперме) и 23,2-38,3% оплодотворения икры (по сравнению с 43% в контроле) [20].

В этот же период, с использованием подобного трехэтапного режима замораживания, исследовательским коллективом под руководством Л.И. Цветковой во Всероссийском НИИ прудового рыбного хозяйства (ВНИИПРХ) была криоконсервирована сперма сибирского осетра и стерляди, разбавленная в соотношении 1:1 протективной средой, содержащей 15% ДМСО и 20% желтка в растворе 118 мМ трис-НСl и 23,4 мМ сахарозы, рН 8.0, впоследствии упоминаемое как оригинальный разбавитель Цветковой. После одного года хранения размороженная сперма сибирского осетра с подвижностью 23±9% оплодотворила 53±8% икры, а сперма стерляди с подвижностью 15±11% – 23±11% икры [21].

В дальнейшем концентрации криопротекторов в среде варьировались в пределах 12-18% для ДМСО и 10-20% для желтка, а рН трис-буферного раствора – в пределах 7,8-8,2. Детальное описание разработанного протокола содержалось в изданном институтом методическом пособии по криоконсервации спермы рыб [22]. Достаточно высокая эффективность протокола подтверждалась в опытах по осеменению в производственных условиях массовых партий икры (180-550 г) криоконсервированной спермой сибирских осетров ленской популяции. В одном из опытов оплодотворение составило 68% по сравнению с 82% для нативной спермы в контроле, выход личинок соответственно – 36% по сравнению с 45% в контроле [23]. В другом опыте, при использовании наиболее пригодных активаторов подвижности: воды и 0,7% раствора сахарозы в трис-буфере, рН 7, оплодотворение достигало, соответственно, 75,6% и 78,7% по сравнению с 89,7% в контроле [24]. В опытах по осеменению икры белуги и русского осетра спермой белуги, криоконсервированной по данному протоколу, заметное повышение процента оплодотворения и выхода личинок давало использование в качестве активатора эпина (раствора фитогормона эпибрасинолида в концентрации 10⁻⁷ мг/л) [25]. С использованием данного протокола была успешно криоконсервирована сперма веслоноса (*Polyodon spathula*), обеспечившая после размораживания оплодотворение 42,3% икры по сравнению с 94,1% для нативной спермы в контроле [26-28]. Разработанный протокол применялся с целью сохранения генетического разнообразия осетрообразных рыб в основанном в 1988-89 гг. во ВНИИПРХ низкотемпературном генном банке спермы рыб [29].

В экспериментах по криоконсервации спермы белуги, проведенных по аналогичной технологии исследователями из Института биофизики клетки РАН и ВНИИПРХ, наиболее высокая сохранность клеток обеспечивалась при использовании медленного трехэтапного режима замораживания и ДМСО в концентрации 12% в среде, содержащей 0,05-0,1 М трис-НСl, 5 мг/мл маннита, 10% желтка, рН 8-8.5. Быстрое замораживание, а также применение антифризных белков оказались не эффективны. Размороженная сперма от двух лучших самцов оплодотворила в среднем 43% икры, что составило 68% от заводского контроля [30; 31].

О предпочтительности медленного замораживания (со скоростью 4 °С/мин), при криоконсервации спермы осетровых в трис-буферном растворе (рН 7.96) с 37,1% сахарозы и 5,7% ДМСО, сообщалось также И.С. Трукшиным [32].

Польскими криобиологами [33] была криоконсервирована сперма озерного осетра (*A. fulvescens*), разбавленная в соотношении 1:3 водным раствором 0,6 М сахарозы с 10% ДМСО, посредством замораживания в 0,1 мл гранулах на сухом льду с последующим хранением их в пластиковых ампулах в LN₂ (по технологии, рекомендованной для криоконсервации спермы радужной форели [34]). Размороженная в активирующем буферном растворе (20 мМ трис, 30 мМ глицина, 10 мМ NaCl, рН 9), сперма сохраняла 14% подвижных клеток по сравнению с 45,9% у свежей. Добавление 5 мМ теофиллина в активатор способствовало повышению подвижности оттаявшей спермы. Обнаружена значимая корреляция между подвижностью и акрозино-подобной активностью, которая может быть показателем повреждения акросомы и акросомной реакции.

Используя эту же технологию, С.И. Савушкина и А.С. Ерохин [35] получили в размороженной сперме русского осетра в среднем 30,8% подвижных клеток, стерляди – 24,2%. Добавление в криозащитную среду 10% желтка и антиоксиданта бутилгидроксианола в концентрации 0,04 мг/мл увеличило подвижность до 50% у осетра и до 60% у стерляди.

С использованием медленных поэтапных режимов замораживания немецким исследователям [36; 37] удалось криоконсервировать сперму стерляди, разбавленную в соотношении 1:1 раствором 10 мМ трис, 25 мМ NaCl, рН 8.5 с этиленгликолем (в конечных концентрациях 12,5% или 17,5%), в 0,25 мл соломинках. После оплодотворения икры оттаявшей спермой с подвижностью 27% выход личинок достигал 94,4%, что, по мнению авторов, указывало на более высокую эффективность действия этиленгликоля по сравнению с ДМСО.

В США [38] была криоконсервирована сперма веслоноса, разбавленная защитной средой в соотношении 3:1, в больших соломинках объемом 5 мл, в раздробленном сухом льду в течение 15 мин. с последующим погружением в LN₂. Среда готовилась, исходя из пропорции: 1,6 мл ДМСО, 4,4 мл многокомпонентного разбавителя Эрдела, Грэма [39] для спермы лососевых рыб с пенициллином-стрептомицином, 300 мОсмоль/кг, рН 7.6 и 4 мл раствора трегалозы с концентрацией 100 мг на 1 мл разбавителя. Конечная концентрация криопротектора ДМСО в суспензии сперма-среда была 0,6 М (около 4%). Выклев из икры, оплодотворенной размороженной спермой (с подвижностью 25-50%), составлял в среднем 16,3% по сравнению с 90,8% в контроле. Предполагалось, что низкий выклев являлся результатом повреждения акросом сперматозоидов во время замораживания или оттаивания и, возможно, был бы выше при увеличении соотношения сперма:икра при осеменении. Наблюдаемое авторами под электронным микроскопом повреждение акросом могло происходить также в результате преждевременной акросомной реакции [40].

Продолжением этого исследования, проведенного совместно с польскими криобиологами [41], стало определение акрозино-подобной активности спермы веслоноса, криоконсервированной по протоколу, описанному выше для спермы озерного осетра [33]. Эта активность наблюдалась в оптимальном интервале рН 8.0-8.5 и была выше в цельной сперме, чем в сперматозоидах, что может быть следствием повреждения акросом и объясняет слабую оплодотворяющую способность размороженной спермы при хорошей сохранности аппарата подвижности.

Как показали рассмотренные публикации, к началу XXI в. большинство протоколов криоконсервации спермы было разработано для европейских видов осетровых. Для них было характерно применение криозащитных сред на основе трис-НСl-буферных растворов, в которых самым распространенным проникающим криопротектором был ДМСО. В качестве непроникающих криопротекторов чаще всего применялись желток и сахароза. Обычным было соотношение разбавления спермы средой 1:1. Замораживание полученной суспензии сперма-среда происходило, в основном, в полипропиленовых пробирках (ампулах) объемом 0,5-2,5 мл по трехэтапной программе или в гранулах объемом 0,1 мл на сухом льду с последующим хранением в LN₂. Отмечалась предпочтительность медленного режима замораживания. Оттаивание проводилось обычно в водяной бане при 40°C. Корреляции между подвижностью и оплодотворяющей способностью размороженной спермы, как правило, не наблюдалось. Начато изучение криоповреждений

сперматозоидов во взаимосвязи с повышением активности некоторых ферментов в сперме. Первые опыты по оплодотворению промышленных партий икры криоконсервированной спермой, с получением приемлемых результатов, показали пригодность криотехнологий для целей воспроизводства.

Современное состояние исследований в области криоконсервации спермы осетрообразных рыб

В последние два десятилетия к изучению процесса и совершенствованию технологий криоконсервации спермы осетрообразных рыб подключилось много исследовательских коллективов из Европы и Азии. Количество публикаций по данной тематике возросло в несколько раз по сравнению с рассмотренным предыдущим периодом.

I. Современный этап начался с сообщения венгерских криобиологов [42; 43] о значительно более сильном криопротективном действии метанола по сравнению с ДМСО и диметилацетамидом (ДМАА), обнаруженном при криоконсервации спермы стерляди. Использование 10% метанола в 30 мМ трис-буферном растворе с 23,4 мМ сахарозы и 0,25 мМ KCl, pH 8,0, впоследствии упоминаемом как модифицированный разбавитель Цветковой, позволило получить самые высокие показатели подвижности размороженной спермы ($46 \pm 23\%$) и оплодотворения ею икры ($22 \pm 15\%$ по сравнению с $28 \pm 16\%$ в контроле). ДМСО и ДМАА обеспечили соответственно $2 \pm 4\%$ и 0% оплодотворения.

Эффективность применения метанола была подтверждена в совместной работе с польскими криобиологами [44] по криоконсервации спермы сибирского осетра, при сравнении протективного действия сред, полученных добавлением 10% этого криопротектора к трем разбавителям: 30 мМ трис, 23,4 мМ сахарозы, 0,25 мМ KCl, pH 8,0 [43], 10 мМ трис, 25 мМ NaCl, pH 8,5 [37] и 20 мМ трис, 400 мМ сахарозы, pH 8,0. После разбавления нативной спермы, каждой из полученных сред в соотношении 1:1, конечная концентрация метанола составляла 5%. Сперма, замороженная в 0,25 мл соломинках в 4 см над поверхностью LN₂ в течение 10 мин. с последующим погружением, после оттаивания при 40 °C за 6 с., сохраняла около 15% подвижных клеток и после оплодотворения икры обеспечила выклев соответственно приведенным средам: $29,6 \pm 5\%$, $18,2 \pm 2,4\%$ и $6 \pm 3\%$. Результаты для первых двух сред были близки к процентам выклева в контроле после оплодотворения нативной спермой двух самцов: 17,9% и 26%.

В проведенном, совместно с австрийскими учеными [45], исследовании по разработке

протокола криоконсервации спермы стерляди лучший результат по оплодотворению икры (32,7% по сравнению с 33,9% в контроле) также был достигнут в случае добавления 7,5% метанола (в сравнении с 7,5 или 10% ДМСО) к выбранному оптимальному разбавителю, содержащему 10 мМ трис, 50 мМ NaCl, 5 мМ KCl, pH 8,5. Сперма, разбавленная полученной протективной средой в соотношении 1:2, замораживалась в 0,5 мл соломинках в оптимальном режиме: в 4 см над поверхностью LN₂ в течение 10 мин. с последующим погружением. Оттаивание было оптимальным при 25 °C за 30 секунд. Отмечалось, что в случае использования среды с 7,5% и 10% ДМСО подвижность и скорость размороженной спермы были выше, чем для среды с метанолом, а оплодотворяющая способность ниже (10,3% и 6,9%, соответственно).

Последующие исследования венгерских ученых, направленные на совершенствование технологии криоконсервации спермы осетрообразных рыб, были связаны, в основном, с подбором наиболее подходящего разбавителя и оптимальной концентрации выявленного эффективного криопротектора метанола. Сперма стерляди, сибирского, русского и атлантического осетров, разбавленная в соотношении 1:1 модифицированным разбавителем Цветковой, содержащим 10% метанола, была заморожена в 0,5 мл соломинках на полистироловой рамке толщиной 3 см на поверхности LN₂ в течение 3 мин. с последующим погружением. После оплодотворения икры стерляди размороженной (при 40 °C за 13 с) спермой перечисленных видов было получено соответственно 31, 50, 17 и 34% выклева личинок гибридов (по сравнению с 44% в контроле) [46; 47]. Показавшие свою эффективность параметры протокола: соотношение разбавления, режим замораживания и оттаивания применялись в дальнейших исследованиях.

В совместных работах с исследователями из США [48-50] по криоконсервации спермы североамериканских видов осетрообразных сравнивалось действие оригинального и модифицированного разбавителей Цветковой (обозначаемых авторами oT и mT) и сбалансированного солевого разбавителя Хэнкса (HBSS) в сочетании с разными конечными концентрациями метанола и ДМСО в суспензии сперма-среда. Использование сочетания mT с 5% метанола обеспечивало с размороженной спермой тупорылого осетра (*A. brevirostrum*) наиболее высокие оплодотворение и выклев: в одном опыте соответственно – $40 \pm 15\%$ и $31 \pm 15\%$, в другом – $18 \pm 11\%$ и $17 \pm 12\%$. При этом наибольшая подвижность наблюдалась у спермы, криоконсервированной с ДМСО, что

подтверждало ранее [44] сделанный вывод о том, что подвижность не прогнозирует успех оплодотворения. Отмечалось также, что присутствие ДМСО значительно повышало осмолальность разбавителей, а применение оТ давало значительно более низкие оплодотворение и выклев, чем мТ, также из-за более высокой осмолальности. При криоконсервации спермы белого лопатоноса (*S. albus*), по-видимому, очень высокого качества, не было выявлено значимых различий между разбавителями (мТ и НВСС) и концентрациями метанола. Оплодотворение (79-88%) во всех случаях было на уровне нативного контроля (89%), однако выклев был лучше с мТ и 5% метанола (71-73%, в контроле 80%) [48]. Сперма веслоноса, криоконсервированная в мТ с 10% метанола, имела самые высокие подвижность ($85 \pm 5\%$) и оплодотворяющую способность ($80 \pm 3\%$) [49]. Замороженные образцы спермы этих трех видов использовались далее для изучения зависимости между выживаемостью (целостностью мембран клеток, определявшейся методом проточной цитометрии) и оплодотворяющей способностью. Отмечалось, что выживаемость часто коррелировала с подвижностью оттаявшей спермы, но не со степенью оплодотворения, и не должна применяться для прогнозирования успеха при разработке методов криоконсервации. Для этих видов рыб криозащитные среды (разбавитель+криопротектор), изосмотичные семенной плазме, обеспечивали наиболее высокие степени оплодотворения и выклева, не связанные с подвижностью размороженной спермы [50]. При исследовании возможности криоконсервирования больших объемов спермы веслоноса для промышленного использования, сравнивались концентрации метанола 5 и 10% в сочетании с мТ и временем охлаждения (5 и 7 мин.) 5 мл-соломинок на рамке в 3 см над LN_2 , а также различные соотношения сперма: икра по влиянию на оплодотворяющую способность размороженной спермы. Оптимальными параметрами были 5% метанола и 5 мин. охлаждения. Лучший выклев ($69 \pm 6\%$) был достигнут при оплодотворении 40 г икры оттаявшей спермой из трех соломинок (7,5 мл), что мало отличалось от выклева в контроле ($77 \pm 6\%$) при использовании 5 мл свежей спермы. Авторы пришли к выводу, что для получения выклева, подобного контролю, объем размороженной спермы, по сравнению со свежей, должен быть увеличен по меньшей мере на 30% [51].

Проведенные исследования позволили венгерским криобиологам [2] рекомендовать детальный протокол криоконсервации спермы осетровых, в котором, в частности, предлага-

лось разбавление спермы в соотношении 1:1 разбавителем мТ и метанолом с его конечной концентрацией 5 или 10% (например, 9 мл разбавителя, 1 мл метанола и 10 мл спермы), замораживание в 0,5 мл-соломинках, укладываемых на рамке высотой 3 см на расстоянии 4-5 мм друг от друга, в течение 3 мин (со скоростью ~ 70 °С/мин) с последующим погружением в LN_2 и оттаивание при 40°С в течение 13 секунд. (Возможно замораживание в 1,2 мл-соломинках и 5 мл-макротрубочках в течение 5 мин. с оттаиванием, соответственно, за 20 и 40 с). Для оплодотворения авторы предпочитают использовать удобное на практике соотношение: размороженная сперма из одной 0,5 мл-соломинки после активации технологической водой добавляется к 5 г икры. Ранее рекомендовалось 200-кратное разбавление спермы водой для предотвращения полиспермии [52], однако современными исследованиями [53] показано, что у осетровых для этой цели служит эффективная система акросомной реакции. Поэтому для успешного оплодотворения должны использоваться более низкие разбавления.

Подобный протокол и, в первую очередь, разбавитель мТ и метанол, применялись на современном этапе многими исследовательскими коллективами в Европе, Азии и США для криоконсервации спермы различных видов осетровых.

Сперма озерного осетра, разбавленная мТ с 10% метанола (со ссылкой на [44], но с указанной концентрацией 5 мМ KCl) и замороженная в 0,25 мл-соломинках, после оттаивания сохраняла $19 \pm 18\%$ подвижных клеток, но результаты оплодотворения были низкими из-за длительной транспортировки (14-15 ч.) и ухудшения качества икры. Определение повреждения ДНК не показало значительного различия между свежей и криоконсервированной спермой [54].

Замороженная по тому же протоколу сперма стерляди показывала подвижность около 40%, при использовании в среде как 10% метанола, так и 10% ДМСО, что указывало на похожие повреждения аппарата подвижности. Доля клеток с поврежденной акросомой (фиксируемая по специфическому окрашиванию с помощью флуоресцентной микроскопии) была в два раза выше в сперме, криоконсервированной с ДМСО (12%), чем криоконсервированной с метанолом (6%) и свежей (5%). Но общее небольшое окрашивание не позволяло сделать вывод о том, что повреждение акросом является причиной низких степеней оплодотворения, обычно получаемых с ДМСО. Авторы предположили, что воздействие ДМСО на акросому способно вызывать преждевременную акросомную реакцию [55].

В совместном исследовании, с участием криобиологов из США, России, Чехии, Венгрии и Франции, выбранная, в результате сравнения разных концентраций компонентов и криопротекторов, протективная среда подобного состава (20 мМ трис, рН 8,0, 30 мМ сахарозы, 0,5 мМ KCl, 8% метанола) обеспечила при криоконсервации спермы веслоноса получение лучших результатов по подвижности (82% по сравнению с 98% в контроле) и оплодотворяющей способности (>80%). Замораживание спермы, разбавленной средой в соотношении 1:1, осуществлялось в 2 мл-пробирках в программируемом замораживателе поэтапно: от 0 до -5°C со скоростью 3 °C/мин, от -5 до -15°C – 5 °C/мин, от -15 до -25 °C – 10 °C/мин, от -25 до -80 °C – 20 °C/мин и после 5 мин. выдерживания при -80 °C погружение в LN₂ [56].

Замороженная по этой же программе в 0,5 мл-соломинках сперма веслоноса имела наименьшие повреждения ДНК в случае использования подобного разбавителя (20 мМ трис, рН 8,5, 75 мМ сахарозы, 0,5 мМ KCl), метанола в конечной концентрации 8% и соотношения разбавления 1:3 [57].

Сравнение действия четырех криопротекторов: ДМСО, ДМАА, этиленгликоля и метанола, добавляемых в концентрации 5 или 10% к разбавителю подобного состава (25 мМ трис, рН 8,5, 30 мМ сахарозы, 1 мМ KCl), при замораживании спермы стерляди в 0,5 мл-соломинках в 3 см над поверхностью LN₂ в течение 20 мин., показало предпочтительность метанола и ДМАА, непригодность этиленгликоля и отсутствие зависимости между параметрами подвижности и оплодотворяющей способностью размороженной спермы. Лучший выклев обеспечивали среда с 10% метанола (32±17% по сравнению с 61±8% в контроле), что, вероятно, связано с его малым молекулярным весом и высокой проницаемостью мембран для этого криопротектора, и среда с 5% ДМАА (23±3%). ДМСО давал очень низкое оплодотворение, что подтверждало наблюдаемый ранее [45; 48-50; 56] феномен, объясняемый, в частности, преждевременной акросомной реакцией [55]. Из-за возможного подобного действия на акросому ДМАА рекомендовано использовать в малых концентрациях [58].

Повторное сравнение этих криопротекторов в концентрации 10% в среде в том же протоколе подтвердило выводы предыдущего исследования. Этиленгликоль обеспечивал сохранение около 17% подвижных клеток в размороженной сперме стерляди по сравнению с 43-47% для остальных криопротекторов. Сперма, криоконсервированная с метанолом, была наиболее устойчива к окислительному стрессу. В образцах спермы, замороженных с этиленгликолем или ДМСО, обнаружено зна-

чительное повышение активности супероксид-дисмутазы и глутатионредуктазы. В случае использования этиленгликоля, оттаявшая сперма оказалась наиболее чувствительна к действию свободных радикалов. В ней в наибольшей степени наблюдались переокисление липидов, содержание карбонильных производных протеинов и фрагментация ДНК [59].

Впоследствии, при криоконсервации по тому же протоколу спермы корейского (*A. dabryanus*), китайского (*A. sinensis*) и сибирского осетров, исследовалось влияние добавок антиоксидантов (каталазы, глутатиона, цистеина и аскорбиновой кислоты) к той же среде с 10% метанола. Выявлены наиболее эффективные концентрации каталазы, глутатиона и аскорбиновой кислоты (25 U/мл, 0,25-0,5 мг/мл и 0,5 мг/мл, соответственно), в которых эти вещества повышали в оттаявшей сперме процент клеток с интактной мембраной или акросомой у трех видов осетров, а также – процент подвижных клеток у китайского осетра. Цистеин не проявил протективного действия против активных форм кислорода. Комбинации антиоксидантов не показали положительного синергического эффекта [60].

Разбавитель мТ с 10% метанола и замораживание в 0,25 мл-соломинках в 4 см над LN₂ в течение 3 мин., с последующим погружением, применялись в исследовании устойчивости криоконсервированной спермы сибирского осетра к ионам тяжелых металлов. Свежая сперма разбавлялась в соотношении 2:1 семенной плазмой (контроль) и семенной плазмой, содержащей хлориды ртути и кадмия (опыты), и инкубировалась в течение 4 ч. при 4 °C. Подвижность размороженной спермы (в контроле около 60%) снижалась ~ в 2 раза при воздействии 1 мг/л Hg²⁺ и 10 мг/л Cd²⁺. Снижались также скорость движения и выживаемость. При оплодотворении икры размороженной спермой, в контроле получено около 80% выклева личинок. Его резкое снижение (~ в 10 раз) происходило при воздействии 10 мг/л Hg²⁺, однако присутствие Cd²⁺ в концентрациях 1–100 мг/л не влияло на выклев [61].

Использование того же протокола (разбавитель мТ с 10% метанола, 0,5 мл-соломинки, 3 см над LN₂ в течение 20 мин.) обеспечило сохранение у криоконсервированной спермы стерляди 5-67% подвижных клеток (по сравнению с 26-100% – у нативной) и 13-76% оплодотворения, в зависимости от разных способов сбора спермы (за три раза с разными временными интервалами через 12 и 36 ч. после гормональной стимуляции) [62]. Таким же образом криокон-

сервировалась сперма стерляди, полученная обычным сцеживанием (подвижность нативной $92 \pm 8\%$), и тестикулярная сперма, созревшая *in vitro* в течение 25 мин. инкубации в супернатанте (при разбавлении 1:50), полученном после двойного центрифугирования семенной жидкости из уrogenитального канала (подвижность нативной $80 \pm 9\%$). После размораживания эти два вида спермы почти не отличались по подвижности (соответственно, 57 и 48%) и оплодотворяющей способности (соответственно, 48 и 39%), что демонстрировало возможность успешной криоконсервации спермы, полученной из семенников погибших самцов [63].

В аналогичных протоколах (разбавитель мТ, 0,25 мл-соломинки) сравнивалось действие разных концентраций криопротекторов (5, 10 и 20% ДМСО или метанола) и различных соотношений разбавления спермы средой (1:0.5; 1:1; 1:2; 1:5) при криоконсервации спермы севрюги [64] и белуги [65; 66]. Во всех случаях наиболее высокую подвижность размороженной спермы обеспечивало применение 10% криопротектора и разбавления 1:1. Впоследствии, при криоконсервации спермы персидского осетра (*A. persicus*) по тому же протоколу, подобное сравнение криопротекторов и соотношений разбавления показало, по уровню подвижности оттаявшей спермы, предпочтительнее использовать 15% метанола при разбавлении спермы средой 1:1 и непригодность этиленгликоля и глицерина. Эквилибрация суспензии сперма-среда более 20 мин. и соотношения разбавления большие, чем 1:3, снижали подвижность размороженной спермы. К повышению этого показателя приводило добавление в среду бычьего сывороточного альбумина (BSA) в концентрации 10 мг/мл, но никакого влияния не оказывало добавление аскорбиновой кислоты в различных концентрациях. Авторами рекомендовано в протоколе криоконсервации спермы персидского осетра применение разбавителя мТ с добавлением 15% метанола и 10 мг/мл BSA, соотношения разбавления 1:1, 5 мин. эквилибрации и замораживания в 0,25 мл-соломинках в 3 см над LN_2 в течение 10 мин. с последующим погружением. Замороженная по этому протоколу сперма сохраняла 32% подвижных клеток и обеспечила 30% оплодотворения икры и 28% выклева личинок [67].

С применением подобного протокола (разбавитель мТ с 10% метанола, 0,5 мл-соломинки, 3 см над LN_2 в течение 10 мин.) была показана возможность хранения оттаявшей спермы при $4^\circ C$ до 30 мин. почти без снижения качества. Сперма персидского осетра и белуги сразу после размораживания показывали подвижность 83-85%, оплодотворяющую способность – 75-85% и выклев – 73-78%, а через 30 мин. хранения,

соответственно: 78%, 70-78% и 68-72% [68; 69]. Добавка к разбавителю мТ 10 mM глутамин, в том же протоколе криоконсервации, обеспечивала для размороженной спермы персидского осетра значительное повышение подвижности: от 50% (без добавления глутамин) до 95%, оплодотворяющей способности: от 55% до 90% и выклева: от 52% до 85% [70]. Замораживание 0,5 мл-соломинок, в программируемом замораживателе при оптимальной скорости $40^\circ C/мин.$, позволило получить для оттаявшей спермы белуги подвижность 69%, оплодотворяющую способность – 72% и выклев – 65% [71], а для персидского осетра, соответственно: 60, 60 и 60% [72].

С помощью CASA (computer-assisted semen analysis) анализировались параметры движения спермы, криоконсервированной по тому же протоколу (мТ с 10% метанола, 0,25 мл-соломинки). Отмечалось, что в оттаявшей сперме, по сравнению с нативной, многие параметры снизились, в том числе – наиболее важные для оплодотворения икры: процент подвижных клеток (с 41,3 до 25,3% – у сибирского осетра, с 44,8 до 26,8% – у стерляди) и скорость криволинейного движения, что, по мнению авторов, возможно, связано с повреждениями средней части и хвоста сперматозоидов [73].

В сперме русского осетра, замороженной таким же образом, подвижность клеток снизилась с 95 до 65% (и до 0% в случае отсутствия криопротектора в среде). При этом в клетках снизилась, а в семенной плазме заметно повысилась активность многих ферментов: метаболических (аденозинтрифосфатазы, креатинкиназы, сукцинатдегидрогеназы, лактатдегидрогеназы) и антиокислительных (супероксиддисмутаза, каталазы, глутатионпероксидазы), что связывалось с повреждениями мембран и митохондрий, переокислением липидов мембран. Значительные различия в активности ферментов наблюдались в вариантах замораживания с криопротектором и без него. Мембраны клеток были намного больше повреждены в случае отсутствия криопротектора [74].

При криоконсервации спермы стерляди, по рассматриваемому протоколу (мТ с 10% метанола, 0,5мл-соломинки), сравнивалась эффективность двух приспособлений с неконтролируемым охлаждением (до погружения в LN_2): наиболее часто используемой полистироловой рамки толщиной 3 см с горизонтальной укладкой 6 или 60 соломинок, плавающей на поверхности LN_2 в течение 10 мин., и сухого цилиндрического сосуда (внутри переносного сосуда Дьюара с LN_2) с вертикальным размещением в его средней части 60 соломинок, не соприкасающихся со стенками и между собой, на 10 минут. Самые низкие скорости замораживания спермы в разных температурных интервалах

наблюдались при тесном расположении 60 соломинок на рамке. В остальных вариантах (6 соломинок на рамке, центр и периферия сухого сосуда) скорости были намного выше и отличались незначительно, что отражалось в получении близких значений оплодотворяющей способности оттаявшей спермы (48,8-59,4%) и выклева (46-59%), по сравнению с аналогичными показателями в случае 60 соломинок на рамке: $9,7 \pm 2,7\%$ и $11,7 \pm 4,2\%$, соответственно. Авторы считают предпочтительным использование сухого сосуда, так как он обеспечивает более стабильные условия охлаждения. В нем оптимальная скорость замораживания спермы стерляди составляла $53^\circ\text{C}/\text{мин.}$ для 60 соломинок [75].

С использованием того же протокола (мТ с 10% метанола, 0,5 мл-соломинки, 3 см над LN_2 в течение 10 мин.) исследовалось влияние добавляемых в среду антифризных протеинов (AFP) на криозащиту сперматозоидов стерляди. В сперме, замороженной без добавления AFP, после оттаивания сохранялось $44 \pm 9\%$ подвижных клеток, с добавлением 10 мкг/мл AFP I – $56 \pm 15\%$, с добавлением 1 мкг/мл AFP III – $58 \pm 14\%$, однако, ввиду незначимости различий, было предположено, что влияние AFP не зависит от их концентрации в среде. Проточная цитометрия показала целостность мембран у $26,6 \pm 14\%$ клеток спермы, криоконсервированной без AFP. Существенно выше был процент клеток с интактной мембраной после добавления 10 мкг/мл AFP I или AFP III ($65,4 \pm 12$ и $62,9 \pm 12\%$, соответственно) [76]. В другой серии аналогичных опытов авторы не обнаружили положительного влияния AFP ни на подвижность (не было значимых различий в скоростях движения клеток), ни на оплодотворяющую способность размороженной спермы (45-50% во всех вариантах) [77].

При использовании рассматриваемого протокола было обнаружено сильное влияние криоконсервации на протеом семенной плазмы и спермы стерляди. В основном изменения наблюдались у протеинов, связанных с метаболизмом, откликом на стресс и цитоскелетом [78].

При криоконсервации спермы персидского осетра, разбавленной мТ с 10% метанола, сравнивались два способа замораживания: наиболее распространенный (замораживание в 0,5 мл-соломинках на рамке в 4 см над LN_2 в течение 3 мин. с последующим погружением) и капельная витрификация (накапывание суспензии сперма-среда прямо в LN_2 и через 5 мин. сбор полученных шариков диаметром 5 мм охлажденным пинцетом в охлажденные 2 мл-криопробирки для хранения). Подвижность оттаявшей спермы оказалась в обоих случаях практически одинаковой (9 и 10%,

соответственно), однако продолжительность подвижности была выше после капельной витрификации. Оценка уровней метаболитов в сперме, с помощью ПМР-спектроскопии, показала значимые отличия для некоторых из них (ацетата, креатинфосфата, бетаина, β -аланина и триметиламин-N-оксида), связанных с энергетикой сперматозоидов, восстановительным балансом и компенсацией гипоксии, подтверждающие более высокую эффективность капельной витрификации для криозащиты [79]. Около 16% подвижности наблюдалось во всех образцах спермы персидского осетра, разбавленной 100 мМ трис-HCl буферным раствором, pH 8 с добавлением AFP III в оптимальной концентрации 10 мкМ и замороженной методом капельной витрификации, после разных сроков хранения (48 ч., 30 и 120 дней) [80].

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Вклад в работу авторов: О.Б. Докина – идея работы, поиск источников, написание статьи, К.В. Ковалев – участие в поиске источников, окончательная проверка статьи, Н.Д. Пронина – участие в поиске источников.

The authors declare that there is no conflict of interest.

Contribution to the work of the authors: O.B. Dokina – the idea of the work, search for sources, writing an article, K.V. Kovalev – participation in the search for sources, final verification of the article, N.D. Pronina – participation in the search for sources.

ЛИТЕРАТУРА И ИСТОЧНИКИ

1. Mims S.D., Tsvetkova L.I., Wayman W.R. [et al.]. Cryopreservation of sturgeon and paddlefish sperm / Cryopreservation in aquatic species, 2nd Edition / T.R. Tiersch and C.C. Green (eds). World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA. 2011. Pp. 366-380
2. Horvath A., Chevre P., Urbanyi B. Sperm cryopreservation in sturgeon with a special focus on *A. sturio*. // Biology and conservation of the European sturgeon *Acipenser sturio* L., 1758. / P. Williot et al. (eds). 2011. P. 465-475. DOI 10.1007/978-3-642-20611-5_35
3. Alavi S.M.H., Hafez A., Psenicka M. [et al.]. Sperm biology and control of reproduction in sturgeon: (II) sperm morphology, acrosome reaction, motility and cryopreservation // Rev. Fish Biol. Fisheries. 2012. V. 22. P. 861-886. DOI 10.1007/s11160-012-9270-x
4. Исаев Д.А., Шафеев Р.А. Криоконсервация спермы осетровых рыб: текущее состояние и перспективы // Рыбоводство и рыбное хозяйство. 2016. № 5. С. 65-73
5. Ciereszko A., Psenicka M. Siberian sturgeon sperm cryoconservation // The Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*, Brandt, 1869) / P. Williot P. et al. (eds). 2018. P. 49-57. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-61676-6> (Дата обращения 10.11.2022)
6. Бурцев И.А., Серебрякова Е.В. Первый опыт глубокого замораживания спермы осетровых рыб // Труды молодых ученых ВНИРО. 1969. Вып. 1. С. 94-100

7. Авторское свидетельство № 591164 СССР. Способ консервирования спермы рыб: опубл. 1978 / Пушкарь Н.С., Иткин Ю.А., Копейка Е.Ф. [и др.]
8. Пушкарь Н.С., Белоус А.М., Копейка Е.Ф. [и др.] Низкотемпературная консервация спермы осетровых // Осетровое хозяйство внутренних водоемов СССР: тезисы и рефераты II всесоюзного совещания (Астрахань, 26 февраля-2 марта 1979). С. 220
9. Авторское свидетельство № 786947 СССР. Способ консервирования спермы рыб: опубл. 1980 / Пушкарь Н.С., Белоус А.М., Новиков А.Н. [и др.]
10. Пушкарь Н.С., Иткин Ю.А., Копейка Е.Ф. I. Методы криоконсервации спермы рыб // Биологические исследования. 1980. Т. 46. С. 12-24
11. Пушкарь Н.С., Белоус А.М., Новиков А.Н. II. Методы криоконсервации спермы рыб / Н.С. Пушкарь // Биологические исследования. 1980. Т. 46. С. 25-32
12. Копейка Е.Ф., Новиков А.Н. Криоконсервирование спермы рыб // Криоконсервирование клеточных суспензий. Под ред. А.А. Цуцаевой. – Киев: Наукова Думка, 1983. С. 204-215
13. Дрокин С.И., Черепанов В.В., Копейка Е.Ф. [и др.] Сахалинский осетр: как сохранить генофонд // Рыбное хозяйство. 1991. № 7. С. 38-39
14. Drokin S.I., Cherepanov V.V., Kopeika E.F. [et al.]. Cryopreservation of the sperm of Sakhalin sturgeon (*Acipenser medirostris micadoi*): problems and prospects for cryopreserved sperm collection from rare and endangered sturgeon species // Int. Symp. Sturgeons (Moscow-Kostroma- Moscow, Russia, 6-11 Sept. 1993): Abstr. Bull. /VNIRO. Moscow. 1993. Pp. 64-65
15. Cherepanov V.V., Drokin S.I., Ochkur C.I., [et al.] Freezing of sperm of Azov-Black sea acipenserids // Int. Symp. Sturgeons (Moscow-Kostroma- Moscow, Russia, 6-11 Sept. 1993): Abstr. Bull. /VNIRO. Moscow. 1993. Pp. 63-64
16. Cherepanov V.V., Kopeika E.F. Cryopreservation and low temperature storage of sperm of sturgeons at the Institute for problems of cryobiology & cryomedicine of the National Academy of sciences of the Ukraine // 3rd Int. Symp. Sturgeon (Piacenza, Italy, 8-11 July 1997): Book Abstr. 1997. Pp. 119-120
17. Cherepanov V.V., Kopeika E.F. Cryopreservation and low temperature storage of sturgeon sperm // J. Appl. Ichthyol. 1999. V. 15. Pp. 310-311
18. Drokin S.I., Kopeika E.F. Cryopreservation and phospholipid content of spermatozoa of some sturgeon species // 3rd Int. Symp. Sturgeon (Piacenza, Italy, 8-11 July 1997): Book Abstr. 1997. Pp. 143-144
19. Drokin S.I., Kopeika E.F. Cryopreservation and phospholipids content of spermatozoa of some sturgeon species // J. Appl. Ichthyol. 1999. V. 15. P. 311
20. Kopeika E.F., Williot P., Goncharov B.V. Cryopreservation of Atlantic sturgeon *Acipenser sturio* L., 1758 sperm: First results and associated problems // Symp. Conservation of the Atlantic sturgeon *Acipenser sturio* L., 1758 in Europe (Madrid, 6-11 Sept. 1999) / Bol. Inst. Oceanogr. 2000. V. 16. No. 1-4. Pp. 167-173
21. Tsvetkova L.I., Cosson J., Linhart O. [et al.] Motility and fertilizing capacity of fresh and frozen-thawed spermatozoa in sturgeons *Acipenser Baeri* and *A. ruthenus* // J. Appl. Ichthyol. 1996. V. 12. Pp. 107-112
22. Цветкова Л.И., Савушкина С.И., Тутарева Л.Н. [и др.]. Методическое пособие по криоконсервации спермы карпа, лососевых и осетровых видов рыб – М., ВНИИПРХ. 1997. 10 с
23. Савушкина С.И., Цветкова Л.И. Эффективность использования дефростированной спермы при воспроизводстве осетровых рыб // Проблемы сохранения геномов лососевых и осетровых рыб: Рыбное хозяйство. Аналитическая информация, сер. Аквакультура. – М.: Экинас. 1998. Вып. 1. С. 33-36
24. Цветкова Л.И., Докина О.Б., Пронина Н.Д. [и др.]. Использование криоконсервированной спермы для осеменения больших партий икры сибирского осетра // Проблемы сохранения геномов рыб: Рыбное хозяйство. Информационный пакет, сер. Аквакультура. – М.: Экинас. 1999. Вып. 1. С. 24-29
25. Тихомиров А.М., Цветкова Л.И., Витвицкая Л.В. [и др.]. Разработка способов криоконсервации спермы белуги и осеменения криоконсервированным материалом икры белуги и русского осетра // Консервация генетических ресурсов: материалы XV рабочего совещания (Пушино, 13-15 октября 1998). С. 90-93
26. Пронина Н.Д. Цветкова Л.И., Докина О.Б. Криоконсервация спермы веслоноса // Проблемы экологии и биоразнообразия водных и прибрежно-водных экосистем: тезисы докладов XI всероссийской конференции молодых ученых (Борок, 14-16 сентября 1999). 1999. С. 61-62
27. Цветкова Л.И., Пронина Н.Д., Докина О.Б. [и др.]. Использование криоконсервированной спермы для осеменения икры веслоноса // Ресурсосберегающие технологии в аквакультуре: материалы докладов второго международного симпозиума (Адлер, 4-7 октября 1999). Краснодар. 1999. С. 110-111
28. Багров А.М., Цветкова Л.И., Докина О.Б. [и др.]. Криоконсервация спермы веслоноса // Вестник РАСХН. 2000. № 4. С. 44-47
29. Цветкова Л.И., Гахова Э.Н., Утешев В.К. [и др.]. Создание низкотемпературных коллекций рыб и амфибий // Консервация генетических ресурсов: материалы XIV рабочего совещания (Пушино, 28-30 мая 1996). 1996. С. 89-92.
30. Андреев А.А., Витвицкая Л.В., Цветкова Л.И. [и др.]. Криоконсервация спермы белорыбицы и белуги // Консервация генетических ресурсов: материалы XIV рабочего совещания (Пушино, 28-30 мая 1996). 1996. С. 96-98
31. Ананьев В.И., Андреев А.А., Голованова Т.С. [и др.]. Опыт криоконсервации спермы белорыбицы и белуги // Проблемы сохранения геномов лососевых и осетровых рыб. Рыбное хозяйство. Аналитическая информация, сер. Аквакультура. – М.: Экинас. 1998. Вып. 1. С. 25-36
32. Trukshin I.S. Effect of cooling rates on the motility and fertility of two sturgeon species sperm after cryopreservation // 6th Int. Symp. on the Reproductive Physiology of Fish (Bergen, Norway, 4-9 July 1999): Proceedings. 2000. P. 417
33. Ciereszko A., Toth G., Christ S. [et al.]. Effect of cryopreservation and theophylline on motility characteristics of lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*) spermatozoa // Theriogenology. 1996. V. 45. P. 665-672
34. Holtz W. Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) sperm: practical recommendations // Aquaculture. 1993. V. 110. P. 97-100

35. Савушкина С.И., Ерохин А.С. Опыт совершенствования способов криоконсервации спермы русского осетра и стерляди // Проблемы сохранения геномов рыб: Рыбное хозяйство. Информационный пакет, сер. Аквакультура. – М.: Экинас. 1999. Вып. 1. С. 43-45
36. Jahnichen H., Warnecke W., Trölsch E. [et al.]. Motility and fertilizing capability of cryopreserved *Acipenser ruthenus* L. sperm // 3rd Int. Symp. Sturgeon (Piacenza, Italy, 8-11 July 1997): Book Abstr. 1997. Pp. 201-202
37. Jahnichen H., Warnecke W., Trölsch E. [et al.]. Motility and fertilizing capability of cryopreserved *Acipenser ruthenus* L. sperm // J. Appl. Ichthyol. 1999. V. 15. Pp. 204-206
38. Brown G.G., Mims S.D. Cryopreservation of paddlefish *Polyodon spathula* milt // J. World Aquacult. Soc. 1999. V. 30. No. 2. Pp. 245-249
39. Erdahl A.W., Erdahl D.A., Graham E.F. Some factors affecting the preservation of salmonid spermatozoa // Aquaculture. 1984. V. 43. Pp. 341-350
40. Mims S.D., Tsvetkova L.I., Brown G.G. [et al.]. Cryopreservation of sperm of sturgeon and paddlefish // Cryopreservation in aquatic species / T.R. Tiersch and P.M. Mazik (eds). World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA. 2000. Pp. 123-129
41. Ciereszko A., Dabrowski K., Mims S.D. [et al.]. Characteristics of sperm acrosin-like activity of paddlefish (*Polyodon spathula* Walbaum) // Comp. Biochem. Physiol. 2000. Part B 125. Pp. 197-203
42. Horvath A., Urbanyi B. Cryopreservation sterlet (*Acipenser ruthenus*) sperm // 6th Int. Symp. on the Reproductive Physiology of Fish (Bergen, Norway, 4-9 July 1999): Proceedings. 2000. P. 441
43. Urbanyi B., Horvath A., Bercsenyi M. Androgenesis on sterlet (*Acipenser ruthenus*) using fresh and cryopreserved sperm // 6th Int. Symp. on the Reproductive Physiology of Fish (Bergen, Norway, 4-9 July 1999): Proceedings. 2000. P. 440
44. Glogowski J., Kolman R., Szczepkowski M. [et al.]. Fertilization rate of Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*, Brandt) milt cryopreserved with methanol // Aquaculture. 2002. V. 211. Pp. 367-373
45. Lahnsteiner F., Berger B., Horvath A. [et al.]. Studies on the semen biology and sperm cryopreservation in the sterlet, *Acipenser ruthenus* L. // Aquacult. Res. 2004. V. 35. Pp. 519-528
46. Urbanyi B., Horvath A. Hatching of sturgeon hybrids using cryopreserved sperm // Aquaculture America 2002, World Aquaculture Society (San Diego, California, USA, 27-30 January 2002): Book Abstr. 2002. P. 654
47. Urbanyi B., Horvath A., Kowacs B. Successful hybridization of *Acipenser* species using cryopreserved sperm // Aquacult. Int. 2004. V. 12. Pp. 47-56
48. Horvath A., Wayman W.R., Urbanyi B. [et al.]. The relationship of the cryoprotectants methanol and dimethyl sulfoxide and hyperosmotic extenders on sperm cryopreservation of two North-American sturgeon species // Aquaculture. 2005. V. 247. Pp. 243-251. doi:10.1016/j.aquaculture.2005.02.007
49. Horvath A., Urbanyi B., Mims S.D. [et al.]. Improved cryopreservation of sperm paddlefish (*Polyodon spathula*) // J. World Aquacult. Soc. 2006. V. 37. No. 4. Pp. 356-362
50. Horvath A., Wayman W.R., Dean J.C. [et al.]. Viability and fertilizing capacity of cryopreserved sperm from three North American acipenseriform species: a retrospective study // J. Appl. Ichthyol. 2008. V. 24. Pp. 443-449. doi:10.1111/j.1439-0426.2008.01134.x
51. Horvath A., Urbanyi B., Wang C. [et al.]. Cryopreservation of paddlefish sperm in 5-mL straws // J. Appl. Ichthyol. 2010. V. 26. Pp. 715-719. doi:10.1111/j.1439-0426.2010.01551.x
52. Dettlaff T.A., Ginsburg A.S., Schmalhausen O.I. Sturgeon Fishes, Developmental Biology and Aquaculture. – Berlin, Heidelberg, SpringerVerlag. 1993
53. Psenicka M., Rodina M., Linhart O. Ultrastructural study on the fertilization process in sturgeon (*Acipenser*), function of the acrosome and prevention of polyspermy // Anim. Reprod. Sci. 2010. V. 117. Pp. 147-154
54. Ciereszko A., Dabrowski K., Froschauer J. [et al.]. Cryopreservation of semen from lake sturgeon // Trans. Am. Fish. Soc. 2006. V. 135. Pp. 232-240. doi:10.1577/T04-160.1
55. Psenicka M., Dietrich G.J., Wojtczak M. [et al.]. Acrosome staining and motility characteristics of sterlet spermatozoa after cryopreservation with use of methanol and DMSO // Cryobiology. 2008. V. 56. Pp. 251-253. doi:10.1016/j.cryobiol.2008.03.006
56. Linhart O., Mims S.D., Gomelsky B. [et al.]. Effect of cryoprotectants and male on motility parameters and fertilization rate in paddlefish (*Polyodon spathula*) frozen-thawed spermatozoa // J. Appl. Ichthyol. 2006. V. 22. Suppl. 1. Pp. 389-394.
57. Li P., Wei Q., Liu L. DNA integrity of *Polyodon spathula* cryopreserved sperm // J. Appl. Ichthyol. 2008. V. 24. Pp. 121-125. doi:10.1111/j.1439-0426.2007.01025.x
58. Boryshpolets S., Dzyuba B., Rodina M. [et al.]. Cryopreservation of sterlet (*Acipenser ruthenus*) spermatozoa using different cryoprotectants // J. Appl. Ichthyol. 2011. V. 27. P. 1147-1149. doi:10.1111/j.1439-0426.2011.01866.x
59. Shaliutina-Kolesova A., Cosson J., Lebeda I. [et al.]. The influence of cryoprotectants on sturgeon (*Acipenser ruthenus*) sperm quality, DNA integrity, antioxidant responses, and resistance to oxidative stress // Anim. Reprod. Sci. 2015. V. 159. Pp. 66-76. http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.05.014. (Дата обращения 10.11.2022)
60. Li P., Xi M.D., Du H. [et al.]. Antioxidant supplementation, effect on post-thaw spermatozoan function in three sturgeon species // Reprod. Dom. Anim. 2018. V.53. Pp. 287-295. doi:10.1111/rda.13103
61. Dietrich G.J., Ciereszko A., Kowalski R.K. [et al.]. Motility and fertilizing capacity of frozen/thawed sperm of Siberian sturgeon after a short-time exposure of fresh semen to mercury and cadmium // J. Appl. Ichthyol. 2012. V. 28. Pp. 973-977. doi:10.1111/jai.12062
62. Dzyuba B., Boryshpolets S., Shaliutina A. [et al.]. Spermatozoa motility, cryoresistance, and fertilizing ability in sterlet *Acipenser ruthenus* during sequential stripping // Aquaculture. 2012. V. 356-357. Pp. 272-278. doi:10.1016/j.aquaculture.2012.05.006
63. Dzyuba B., Boryshpolets S., Cosson J. [et al.]. Motility and fertilization ability of sterlet *Acipenser ruthenus* testicular sperm after cryopreservation // Cryobiology. 2014. V. 69. Pp. 339-341. http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.07.008. (Дата обращения 10.11.2022)
64. Sadeghi A., Imanpoor M.R., Shahriari R. [et al.]. Cryopreservation of stellate (*Acipenser stellatus*)

- sperm: Effect of different concentrations of DMSO and dilution rates on sperm motility and motility duration after long-term storage // Global Veterinaria. 2013. V. 10 (1). Pp. 26-30. doi:10.5829/idosi.gv.2013.10.1.7195
65. Sadeghi A., Imanpoor M.R., Taghizadeh V. [et al.]. Cryopreservation of beluga (*Huso huso*) sperm: Effect of different concentrations of DMSO and dilution rates on sperm motility and motility duration after short-term storage // Global Veterinaria. 2013. V. 10 (1). Pp. 46-50. doi:10.5829/idosi.gv.2013.10.1.66229
 66. Sadeghi A., Imanpoor M.R., Taghizadeh V. [et al.]. Cryopreservation of beluga (*Huso huso*) sperm: Effect of different concentrations of methanol (MeOH) and dilution rates on sperm motility and motility duration after long-term storage // World. J. Zool. 2013. V. 8 (2). Pp. 159-162. doi:10.5829/idosi.wjz.2013.8.2.66227
 67. Shalvei F., Sadeghi A., Zadmajid V. Cryopreservation of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) sperm: effects of cryoprotectants, antioxidant, membrane stabilizer, equilibration time and dilution ratio on sperm motility and fertility // Aquacult. Res. 2017. V. 48. Pp. 1031-1040. doi:10.1111/are.12946
 68. Aramli M.S., Nazari R.M., Ciereszko A. Motility and fertility of cryopreserved semen in Persian sturgeon, *Acipenser persicus*, stored for 30 to 60 min after thawing // Cryobiology. 2014. V. 69. Pp. 500-502. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.10.006
 69. Aramli M.S., Nazari R.M., Gharibi M.R. Effect of post-thaw storage time on motility and fertility of cryopreserved beluga sturgeon (*Huso huso*) sperm // Reprod. Dom. Anim. 2015. V. 50. No. 2. Pp. 349-352. doi:10.1111/rda.12484
 70. Aramli M.S., Golshahi K., Nazari R.M. [et al.]. 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
 71. Aramli M.S., Golshahi K., Nazari R.M. [et al.]. Effect of freezing rate on motility, adenosine triphosphate content and fertilizability in beluga sturgeon (*Huso huso*) spermatozoa // Cryobiology. 2015. V. 70. Pp. 170-174. http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2015.02.001. (Дата обращения 10.11.2022)
 72. Aramli M.S., Golshahi K., Nazari R.M. [et al.]. Effect of freezing rate for cryopreservation of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) spermatozoa // Theriogenology. 2016. V. 85. Pp. 734-739. http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.10.018. (Дата обращения 10.11.2022)
 73. Stęczyński P., Cejko B.I., Grygoruk C. [et al.]. Cryopreservation of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*, Brandt, 1869) and sterlet (*Acipenser ruthenus*, Linnaeus, 1758) semen and its influence on sperm motility parameters assessed using a computer-assisted sperm analysis (CASA) system // J. Appl. Ichthyol. 2015. V. 31. Suppl. 1. Pp. 99-103. doi:10.1111/jai.12719
 74. Huang X.-R., Zhuang P., Zhang L.-Z. [et al.]. Effect of cryopreservation on the enzyme activity of Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii* Brandt & Ratzeburg, 1833) semen // J. Appl. Ichthyol. 2014. V. 30. Pp. 1585-1589. doi:10.1111/jai.12608
 75. Horokhovatskyi Y., Rodina M., Dadras H. [et al.]. Consequences of uncontrolled cooling during sterlet (*Acipenser ruthenus*) sperm cryopreservation on post-thaw motility and fertilizing ability // Theriogenology. 2017. V. 95. Pp. 89-95. http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.03.007. (Дата обращения 10.11.2022)
 76. Xin M., Shaliutina-Kolesova A., Dzyuba B. [et al.]. Protective role of antifreeze proteins on sterlet (*Acipenser ruthenus*) sperm during cryopreservation // Fish Physiol. Biochem. 2018. V. 44. No 6. Pp. 1527-1533. https://doi.org/10.1007/s10695-018-0538-5. (Дата обращения 10.11.2022)
 77. Xin M., Tuckova V., Rodina M. [et al.]. Effects of antifreeze proteins on cryopreserved sterlet (*Acipenser ruthenus*) sperm motility variables and fertilization capacity // Anim. Reprod. Sci. 2018. V. 196. Pp. 143-149. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.07.007. (Дата обращения 10.11.2022)
 78. Xin M., Shaliutina-Kolesova A., Boryshpolets S. [et al.]. Impact of cryopreservation on sterlet, *Acipenser ruthenus* sperm motility and proteome // Anim. Reprod. Sci. 2018. V. 192. Pp. 280-289. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.03.025. (Дата обращения 10.11.2022)
 79. Abed-Elmdoust A., Rahimi R., Farahmand H. [et al.]. Droplet vitrification versus straw cryopreservation for spermatozoa banking in Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) from metabolite point of view // Theriogenology. 2019. V. 129. Pp. 110-115. doi:10.1016/j.theriogenology.2019.02.031
 80. Abed-Elmdoust A., Farahmand H., Amiri B.M. [et al.]. Novel droplet vitrification combined with fish antifreeze protein type III enhances cryoprotection of semen in wild endangered Persian sturgeon *Acipenser persicus* (Borodin, 1897) // Aquacult. Res. 2015. V. 46. No 10. Pp. 2392-2397. doi:10.1111/are.12397

LITERATURE AND SOURCES

1. Mims S.D., Tsvetkova L.I., Wayman W.R. [et al.]. (2011). Cryopreservation of sturgeon and paddlefish sperm / Cryo-preservation in aquatic species, 2nd Edition / T.R. Tiersch and C.C. Green (eds). - World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA. Pp. 366-380
2. Horvah A., Chevre P., Urbanyi B. [et al. (eds)] (2011). Sperm cryopreservation in sturgeon with a special focus on *A. sturio* // Biology and conservation of the European sturgeon *Acipenser sturio* L., 1758. P. 465-475. DOI 10.1007/978-3-642-20611-5_35
3. Alavi S.M.H., Hatef A., Psenicka M. [et al.]. (2012). Sperm biology and control of reproduction in sturgeon: (II) sperm morphology, acrosome reaction, motility and cryopreservation // Rev. Fish Biol. Fisheries. V. 22. Pp. 861-886. DOI 10.1007/s11160-012-9270-x
4. Isaev D.A., Shafei R.A. (2016). Cryopreservation of sperm of sturgeon fish: current state and prospects / D.A. Isaev, R.A. Shafei // Fish farming and fisheries. No. 5. Pp. 65-73. (In Russ.)
5. Ciereszko A., Psenicka M. (2018). Siberian sturgeon sperm cryoconservation // The Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*, Brandt, 1869) / P. Williot P. et al. (eds). Pp. 49-57. https://doi.org/10.1007/978-3-319-61676-6 (Date of application. 10.11.2022)

6. Burtsev I.A., Serebryakova E.V. (1969). The first experience of deep freezing of sperm of sturgeon fish // Proceedings of young scientists VNIRO. Issue 1. Pp. 94-100. (In Russ.)
7. Pushkar N.S., Itkin Yu.A., Kopeika E.F. [et al.]. (1978). Copyright certificate No. 591164 USSR. The method of pre-serving fish sperm. / (In Russ.)
8. Pushkar N.S., Belous A.M., Kopeika E.F. [et al.] (1979). Low-temperature preservation of sturgeon sperm // Sturgeon farming of inland reservoirs of the USSR: theses and abstracts of the II All-Union meeting (Astrakhan, February 26-March 2, 1979). Pp. 220. (In Russ.)
9. Pushkar N.S., Belous A.M., Novikov A.N. [et al.]. (1980). Copyright certificate No. 786947 USSR. Method of preserv-ing fish sperm. (In Russ.)
10. Pushkar N.S., Itkin Yu.A., Kopeika E.F. (1980). I. Methods of cryopreservation of fish sperm // Biological research. Vol. 46. Pp. 12-24. (In Russ.)
11. Pushkar N.S., Belous A.M., Novikov A.N. (1980). II. Methods of cryopreservation of fish sperm // Biological re-search. Vol. 46. Pp. 25-32. (In Russ.)
12. Kopeika E.F., Novikov A.N. (1983). Cryopreservation of fish sperm // Cryopreservation of cell suspensions. Edited by A.A. Tsutsayeva. – Kiev: Naukova Dumka. Pp. 204-215. (In Russ.)
13. Drokin S.I., Cherepanov V.V., Kopeika E.F. [et al.] (1991). Sakhalin sturgeon: how to preserve the gene pool // Fish-eries. No. 7. Pp. 38-39. (In Russ.)
14. Drokin S.I., Cherepanov V.V., Kopeika E.F. [et al.] (1993). Cryopreservation of the sperm of Sakhalin sturgeon (*Acipenser medirostris micadoi*): problems and prospects for cryopreserved sperm collection from rare and endangered stur-geon species // Int. Symp. Sturgeons (Moscow-Kostroma- Moscow, Russia, 6-11 Sept. 1993): Abstr. Bull. / VNIRO. Moscow. Pp. 64-65
15. Cherepanov V.V., Drokin S.I., Ochkur C.I., [et al.] (1993). Freezing of sperm of Azov-Black sea acipenserids // Int. Symp. Sturgeons (Moscow-Kostroma-Moscow, Russia, 6-11 Sept. 1993): Abstr. Bull. / VNIRO. Moscow. Pp. 63-64
16. Cherepanov V.V., Kopeika E.F. (1997). Cryopreservation and low temperature storage of sperm of sturgeons at the In-stitute for problems of cryobiology & cryomedicine of the National Academy of sciences of the Ukraine // 3rd Int. Symp. Sturgeon (Piacenza, Italy, 8-11 July 1997): Book Abstr. 1997. Pp. 119-120
17. Cherepanov V.V., Kopeika E.F. (1999). Cryopreservation and low temperature storage of sturgeon sperm // J. Appl. Ichthyol. V. 15. Pp. 310-311
18. Drokin S.I., Kopeika E.F. (1997). Cryopreservation and phospholipid content of spermatozoa of some sturgeon spe-cies // 3rd Int. Symp. Sturgeon (Piacenza, Italy, 8-11 July 1997): Book Abstr. Pp. 143-144
19. Drokin S.I., Kopeika E.F. (1999). Cryopreservation and phospholipids content of spermatozoa of some sturgeon spe-cies // J. Appl. Ichthyol. V. 15. P. 311
20. Kopeika E.F., Williot P., Goncharov B.V. (2000). Cryopreservation of Atlantic sturgeon *Acipenser sturio* L., 1758 sperm: First results and associated problems // Symp. Conservation of the Atlantic sturgeon *Acipenser sturio* L., 1758 in Eu-rope (Madrid, 6-11 Sept. 1999) / Bol. Inst. Esp. Oceanogr. V. 16. No. 1-4. Pp. 167-173
21. Tsvetkova L.I., Cosson J., Linhart O. [et al.]. (1996). Motility and fertilizing capacity of fresh and frozen-thawed spermatozoa in sturgeons *Acipenser Baeri* and *A. ruthenus* // J. Appl. Ichthyol. V. 12. Pp. 107-112
22. Tsvetkova L.I., Savushkina S.I., Titareva L.N. [et al.]. (1997). Methodical manual on cryopreservation of sperm of carp, salmon and sturgeon species of fish – M., VNIIPRH. 10 p. (In Russ.)
23. Savushkina S.I., Tsvetkova L.I. (1998). The effectiveness of using defrosted sperm in the reproduction of sturgeon fish // Problems of preserving the genomes of salmon and sturgeon fish: Fisheries. Analytical information, ser. Aquaculture. – M.: Ekinas. Issue 1. Pp. 33-36. (In Russ.)
24. Tsvetkova L.I., Dokina O.B., Pronina N.D. [et al.]. (1999). The use of cryopreserved sperm for insemination of large batches of Siberian sturgeon eggs // Problems of conservation of fish genomes: Fisheries. Information package, ser. Aqua-culture. – M.: Ekinas. Issue 1. Pp. 24-29. (In Russ.)
25. Tikhomirov A.M., Tsvetkova L.I., Vitvitskaya L.V. [et al.]. (1998). Development of methods for cryopreservation of beluga sperm and insemination with cryopreserved material of beluga and Russian sturgeon eggs // Conservation of genetic resources: proceedings of the XV workshop (Pushchino, October 13-15, 1998). Pp. 90-93. (In Russ.)
26. Pronina N.D. Tsvetkova L.I., Dokina O.B. (1999). Cryopreservation of paddlefish sperm // Problems of ecology and bio-diversity of aquatic and coastal aquatic ecosystems: abstracts of the XI All-Russian Conference of Young Scientists (Borok, September 14-16, 1999). Pp. 61-62. (In Russ.)
27. Tsvetkova L.I., Pronina N.D., Dokina O.B. [et al.]. (1999). The use of cryopreserved sperm for insemination of oarfsh eggs // Resource-saving technologies in aquaculture: proceedings of the second International Symposium (Adler, October 4-7, 1999). Krasnodar. Pp. 110-111. (In Russ.)
28. Bagrov A.M., Tsvetkova L.I., Dokina O.B. [et al.]. (2000). Cryopreservation of oarfsh sperm // Bulletin of RAS. No. 4. Pp. 44-47. (In Russ.)
29. Tsvetkova L.I., Gakhova E.N., Uteshev V.K. [et al.]. (1996). Creation of low-temperature collections of fish and am-phibians // Conservation of genetic resources: materials of the XIV workshop (Pushchino, May 28-30, 1996). Pp. 89-92. (In Russ.)
30. Andreev A.A., Vitvitskaya L.V., Tsvetkova L.I. [et al.]. (1996). Cryopreservation paddlefish sperm of white fish and beluga // Conservation of genetic resources: materials of the XIV workshop (Pushchino, May 28-30, 1996). Pp. 96-98. (In Russ.)
31. Ananyev V.I., Andreev A.A., Golovanova T.S. [et al.]. (1998). The experience of cryopreservation of sperm of white-fish and beluga // Problems of preserving the genomes of salmon and sturgeon fish. Fisheries. Analytical information, ser. Aquaculture. – M.: Ekinas. Issue 1. Pp. 25-36. (In Russ.)
35. Savushkina S.I., Erokhin A.S. (1999). Experience in improving methods of cryopreservation of sperm of Russian sturgeon and sterlet // Problems of conservation of fish genomes: Fisheries. Information package, ser. Aquaculture. – M.: Ekinas. Issue 1. Pp. 43-45. (In Russ.)

Материал поступил в редакцию/ Received 10.10.2023
 Принят к публикации / Accepted for publication 07.02.2024