

Криоконсервация спермы осетрообразных рыб: современное состояние и перспективы. Часть 2.

DOI: 10.36038/0131-6184-2024-3-110-121

Обзорная статья
УДК 57.086.13:639.3.034:597.423

Докина Ольга Борисовна – кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории криобиологии, Филиал по пресноводному рыбному хозяйству ФГБНУ «ВНИРО» («ВНИИПРХ»), Московская область, Дмитровский городской округ, пос. Рыбное, Россия

E-mail: olgadokina@mail.ru

Ковалев Константин Викторович – кандидат сельскохозяйственных наук, заведующий лабораторией криобиологии, Филиал по пресноводному рыбному хозяйству ФГБНУ «ВНИРО» («ВНИИПРХ»), Россия, Московская область, Дмитровский городской округ, пос. Рыбное

E-mail: silur5@mail.ru

Пронина Наталья Дмитриевна – главный специалист лаборатории криобиологии, Филиал по пресноводному рыбному хозяйству ФГБНУ «ВНИРО» («ВНИИПРХ»), Россия, Московская область, Дмитровский городской округ, пос. Рыбное

E-mail: proninatasha@rambler.ru

Адрес:

Филиал по пресноводному рыбному хозяйству ФГБНУ «ВНИРО» («ВНИИПРХ») –
Россия, 141821, Московская область, Дмитровский городской округ, пос. Рыбное, дом 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. Часть 2. // Рыбное хозяйство. 2024. № 3. С. 110-121.
DOI: 10.36038/0131-6184-2024-3-110-121

CRYOPRESERVATION OF ACIPENSERIFORMES SPERM: CURRENT STATUS AND PERSPECTIVES. PART 2.

Olga B. Dokina – Candidate of Chemical Sciences, Leading Researcher at the Laboratory of Cryobiology, Branch of Freshwater Fisheries of the VNIRO (VNIIPRH), Moscow region, Dmitrovsky city district, village Rybnoye, Russia

Konstantin V. Kovalev – Candidate of Agricultural Sciences, Head of the Cryobiology Laboratory, Freshwater Fisheries Branch of VNIRO (VNIIPRH), Russia, Moscow region, Dmitrov city district, village Rybnoye

Natalia D. Pronina – chief Specialist of the Cryobiology Laboratory, Freshwater Fisheries Branch of the VNIRO (VNIIPRH), Russia, Moscow region, Dmitrov city district, village Rybnoye

Address:

Freshwater Fisheries Branch of VNIRO («VNIIPRH») – Russia, Moscow region, Dmitrovsky city district, 141821, village Rybnoye, house 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. (2024). Cryopreservation of acipenseriformes sperm: current state and perspectives. Part 2. // *Fisheries*. No. 3. Pp. 110-121. DOI: 10.36038/0131-6184-2024-3-110-121

На современном этапе применялись и другие протоколы криоконсервации спермы осетрообразных рыб с использованием трис-буферных и водно-солевых разбавителей.

Для оценки качества образцов спермы, полученных после стимуляции созревания различными гормональными препаратами, украинскими криобиологами проводилась их криоконсервация по традиционной, разработанной в 80-х годах XX в., технологии в среде на основе трис-буфера с ДМСО и желтком. Подвижность размороженной спермы веслоноса составляла 80-90% [81], стерляди – 68-79% [82].

Использование оригинального разбавителя Цветковой (oT), дополненного пенициллином, и программируемого замораживания с поэтапным увеличением скорости позволило получить для оттаявшей спермы персидского осетра 32,2% подвижных клеток и 31% оплодотворения икры, а для спермы севрюги, соответственно – 37,5 и 34,6% [83]. Была также подтверждена непригодность коммерческого разбавителя Biociphus для криоконсервации спермы осетровых рыб, о чем сообщалось ранее [17].

Дополнение разбавителя oT с желтком и 15% ДМСО, pH 7,8, антиоксидантами: аскорбиновой кислотой или лизином (в конечных концентрациях, соответственно, 0,01 М и 0,05 М) при криоконсервации спермы русского осетра в 2 мл пробирках, охлаждаемых поэтапно в парах LN₂ до -70 °C и погружаемых в LN₂ через 8 мин, повышало подвижность и оплодотворяющую способность размороженной спермы. Лучшие результаты по этим показателям, в варианте опыта с аскорбиновой кислотой, были соответственно ~ 45 и ~ 75%, по сравнению с вариантом без добавок – 30 и 55%. Отмечалось, что добавление этих веществ снижало уровень aberrаций хромосом [84; 85].

Сообщалось о повышении подвижности размороженной спермы стерляди, русского и си-

бирского осетров при снижении pH трис-буферного раствора в криозащитной среде до 6,5-7,0 и введении в нее антиоксиданта бутилокситолуола в концентрациях 0,04 и 0,06 мг/мл. Применение оригинальной синтетической среды С-2 и замораживания спермы в гранулах по 0,1 мл на фторопластовой пластине при -80 °C с дальнейшим погружением в LN₂ позволяло получать после оттаивания более 40% подвижных клеток и достигать оплодотворяемости икры 76-81% [86]. Выращивание рыбопосадочного материала, полученного с использованием криоконсервированной (в средах С-3 и С-4) спермы сибирского осетра, показало преимущество в темпе роста «крио-осетров» по сравнению с контролем, полученным из нативной спермы [87; 88], однако в «крио-потомстве» наблюдалось увеличение доли самок [88].

Использование среды на основе трис-буфера с добавлением сахарозы, KCl и ~10% метанола при криоконсервации спермы русского осетра позволило получить после оттаивания 2-35% подвижных клеток, 18-90% – оплодотворения икры и 12-86% – выклева личинок [89]. Обнаружено, что использование для оплодотворения икры криоконсервированной таким способом спермы, по сравнению с нативной, приводит к пониженному выходу личинок, прежде всего, за счет повышенной смертности на ранних эмбриональных стадиях, т.е. идет отбор жизнеспособных «криоэмбрионов». Выявлено увеличение доли некоторых гетерозигот и гетерозиготности по исследованным локусам. Поскольку отклонение этого показателя от исторического оптимума вызывает сокращение численности популяций и их деградацию в последующих поколениях, авторы считают целесообразным ограничить применение криоконсервированной спермы при искусственном воспроизведении товарными хозяйствами, а также отмечают необходимость поиска щадящих методик крио-

консервации и изучения их влияния на генофонд [90-92].

В образцах спермы персидского осетра, разбавленной 100 мМ трис-HCl буферным раствором, pH 8 с 10% ДМСО и гидроксипропил-β-циклодекстрином, как дополнительным криопротектором, в оптимальной концентрации 10 мМ, после замораживания в 0,5 мл соломинках (в 4 см над LN₂ в течение 3 мин) и хранения в течение 2 и 8 недель наблюдалось 16-17% подвижных клеток [93].

Сравнение трех криозащитных сред: 1) mT с 10% метанола, 2) oT с 15% ДМСО и 20% желтка и 3) раствора 80 мМ сахарозы, 5,5 мМ восстановленного глутатиона с 10% ДМСО при замораживании спермы русского осетра в 0,5 мл соломинках в 3 см над LN₂ в течение 20 мин показало практическую равнозначность первых двух сред (подвижность после оттаивания составляла, соответственно, 28 ± 15 и 30 ± 12%) и меньшую эффективность третьей (11 ± 6%) [94].

С использованием такого же способа замораживания проводилось сравнение действия различных дисахаридов и их комбинаций, а также разных концентраций хлорида калия в среде на основе 0,02 М трис-буфера, pH 8.1 с 10% метанола при криоконсервации спермы китайского и корейского осетров. Лучшая среда, с добавлением 2-5 мМ KCl, 15 мМ лактозы и 15 мМ трегалозы, обеспечила сохранение в оттаявшей сперме китайского осетра ~ 85% подвижных клеток, в сперме корейского осетра ~75%. Оплодотворяющая способность составляла, соответственно, 32 и 23% [95].

Американские исследователи замораживали сперму лопатоносов в 0,5 мл соломинках, опускаемых в стаканах на дно алюминиевого сосуда, помещаемого в переносной сосуд Дьюара с LN₂ (скорость охлаждения 22-24 °C/мин). Сравнение модифицированного HBSS и oT (разбавление 1:4) в сочетании с 5 и 10% метанола или ДМСО при криоконсервации спермы обыкновенного лопатоноса (*S. platorhynchus*) не обнаружило значимых различий между криопротекторами, но разбавитель oT обеспечивал более высокую подвижность размороженной спермы (42-50% по сравнению с 23-28% для HBSS) [96]. Сравнение метанола и ДМСО в концентрациях 5, 10 и 15% при замораживании спермы белого лопатоноса (*S. albus*), разбавленной в соотношении 1:4 mHBSS с осмоляльностью 100 мОsmоль/кг, не показало значимых различий между криопротекторами по подвижности оттаявшей спермы, однако значительно более высокий выклев (77%) был получен при использовании 5 и 10% метанола. Отмечалось, что перед началом эксперимента каждый криопротектор смеши-

вался с mHBSS в соотношении 1:1 для снижения токсических эффектов [97]. Впоследствии было представлено детальное описание последнего опыта с использованием метанола и приведены лучшие показатели криоконсервированной спермы, полученные в вариантах с 5 и 10% метанола: соответственно подвижность – 28 и 25%, оплодотворяющая способность на стадии 4-8 бластомеров – 91 и 92 %, выклев – 77 и 77% (в контроле 69%) [98].

Выбранная, по результатам испытаний нескольких солевых разбавителей и разных концентраций ДМСО и глицерина, лучшая среда, представляющая собой водный раствор 8,85 г/л NaCl, 0,2 г/л KCl, 0,4 г/л NaHCO₃ с 12% ДМСО, обеспечила после криоконсервации спермы китайского осетра 83,8% оплодотворения икры и 68% выклева личинок. Разбавленная в соотношении 1:3 сперма, после эквилибрации в течение 0,5-2 час, замораживалась в 2,5 мл пробирках со скоростью 2 °C/мин от 4 до -6 °C и после 10 мин выдерживания погружалась в LN₂ [99].

Биологами Астраханского государственного университета (АГУ) [100] исследовались цитоморфологические и функциональные изменения сперматозоидов русского осетра после криоконсервации в различных вариантах среды Штайна [31; 101] и водном растворе глицерина, ДМСО и гепарина. Использование этого раствора, в отличие от других сред, не вызывало существенных морфологических нарушений, но клетки теряли способность поступательного движения.

Среде Штайна также было отдано предпочтение, при сравнении ее с трис-HCl буферными растворами, с ДМСО или метанолом, при замораживании спермы двух самцов русского осетра в 0,5 мл соломинках на металлической плите в 5 см над LN₂, на основании наблюдения наиболее высокой подвижности клеток (25 и 30%) после оттаивания [102].

Российскими исследователями из Южного научного центра (ЮНЦ) РАН и Астраханского государственного технического университета (АГТУ), при совершенствовании технологии криоконсервации спермы осетровых рыб, использовались различные модификации среды Штайна и технологические приемы, изложенные в методическом пособии, разработанном во ВНИИПРХ [22]. Сообщалось о повышении выживаемости сперматозоидов в результате добавления в среду цианокобаламина [103]. Замена глюкозы в среде Штайна на сахарозу и маннит и уменьшение концентраций желтка и ДМСО до 10% привели к повышению количества подвижных клеток в размороженной сперме русского осетра с 10 до 60% и снижению скорости пероксидного окис-

ления липидов на всех этапах криоконсервации [104]. С целью увеличения проницаемости мембран сперматозоидов для применяемого криопротектора предлагалась электростимуляция разбавленной средой спермы в течение 1 мин перед эквилибрацией. При оптимальной частоте сигнала 20 Гц сохранность клеток увеличивалась на 30%, а время жизни – в 2,2 раза. Для вымывания криопротектора из клеток размороженная сперма разбавлялась в соотношении 1:1 раствором 6,5 г/л NaCl и выдерживалась в течение 7 мин [105-108]. Для ускорения проникновения криопротектора через клеточные мембранны предложено также ультразвуковое воздействие на разбавленную среду сперму, позволяющее снизить период эквилибрации и уменьшить время воздействия токсичных веществ на клетки [109; 110]. Сообщалось о получении высоких процентов оплодотворения икры криоконсервированной спермой (80-96% – у русского осетра, 64-84% – у севрюги, 75% – у белуги) [111-115] и формировании коллекции спермы осетровых рыб в созданном в ЮНЦ РАН криобанке [114; 116]. Показана целесообразность использования криоконсервированной спермы при искусственном воспроизводстве осетровых рыб в установках замкнутого водообеспечения [112]. Предложен способ создания репродуктивных маточных стад осетровых рыб с их частичным обновлением за счет генетического материала из криобанка [113; 117]. Показано, что потомство, полученное с использованием криоконсервированной спермы, имело нормальное эмбриональное и постэмбриональное развитие [117-119].

Показана предпочтительность использования пробирок Эппendorфа объемом 0,5 мл по сравнению с 0,75, 1,5 и 2 мл пробирками. В образцах меньшего объема за счет более равномерных режимов охлаждения и оттаивания наблюдалось наибольшее время жизни сперматозоидов [120; 121]. Показана перспективность скоростного замораживания на тефлоновой пластиине [122]. Предложен альтернативный метод замораживания супензии сперма-среда на пластиковых или металлических сетках в виде тонких пленок, а также – в виде высушенных в термостате мазков, для предотвращения криоповреждений клеток за счет сверхвысоких скоростей замораживания. Лучший результат достигнут при использовании пластиковых сеток: после оттаивания продолжительность жизни спермиев русского осетра составила 20 мин, сибирского осетра – 26 мин [123-125]. Снижение концентрации ДМСО в применяемой среде с 10 до 3% с целью уменьшения ее токсического действия привело к увеличению

времени жизни размороженных спермиев белуги с 26 до 31 мин, а подвижности – с 75 до 82%. Аналогичные показатели у русского осетра (при снижении ДМСО до 4%) увеличились соответственно с 6 до 9 мин и с 70 до 78% [126-128]. По оценке влияния на подвижность и время жизни спермиев после оттаивания, определены лучшие скорости замораживания (3 °C/мин для русского осетра и 10 °C/мин для севрюги и стерляди) по сравнению со ступенчатым режимом: 6 °C/мин – в течение 6 мин, 10 °C/мин – в течение 4 мин, погружение в LN₂ [129-131].

С использованием вышеупомянутой методики криоконсервации [22] специалистами ЮНЦ РАН исследовалось влияние добавок 0,1 мМ антиоксидантов из ряда стерически-затрудненных фенолов к модифицированной среде Штайна, содержащей в водном растворе 130 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 20 мМ NaHCO₃, 5,5 мМ глюкозы, 12,5% желтка и 12,5% ДМСО. Наиболее эффективно снижала уровень пероксидного окисления липидов мембран добавка 3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенилметилендифосфоновой кислоты, превосходя по активности известные антиоксиданты ионол (2,6-ди-трет-бутил-4-метилфенол) и тролокс (водорастворимый аналог витамина Е), и обеспечив повышение оплодотворения икры криоконсервированной спермой с 30 до 60% у белуги, с 84 до 91% – у русского осетра и с 71 до 79% – у севрюги [132-134]. Снижение уровня пероксидации липидов и увеличение продолжительности подвижности спермиев наблюдалось также при добавлении фенольных соединений, содержащих фрагменты пирролидина [135; 136], тиоацетамида [136; 137] или димиамина [138], и производных индолина [139]. Предположено криопротекторное действие L-1-(2-((1-гидроксинафтилин-2-ил)тио)ацетил) пирролидин-2-карбоновой кислоты, добавление которой к нативной сперме белуги увеличило время поступательного движения сперматозоидов в 2,2 раза, а проценты оплодотворения и выклева примерно в 1,5 раза [140]. В качестве потенциальных криопротекторов рассматриваются новые фенол- и нафтольпроизводные L- и D-пролина с мультифункциональной активностью [141-143]. Установлена видоспецифичность повышения уровня пероксидации липидов спермы осетровых при криоконсервации в модифицированной среде Штайна [144]. Уровень липидного переокисления возрастал и в нативной, и в криоконсервированной сперме русского осетра в присутствии органических соединений олова [145].

Наряду с рассмотренными технологиями, с начала XXI в. стали разрабатываться принципиально иные протоколы с использованием

ем низкоосмотичных криозащитных сред на водной основе и метанола в качестве основного криопротектора.

Специалистами лаборатории криобиологии ВНИИ пресноводного рыбного хозяйства (ВНИИПРХ) в результате экспериментов, проведенных в 2001-2003 гг. на белуге, стерляди, севрюге, сибирском и русском осетрах, разработана базовая криозащитная среда для замораживания спермы осетровых рыб, содержащая в водном растворе 0,1% сахарозы, 0,08% KCl и 8% метанола (в массовых долях), применение которой, при сохранении прежнего трехэтапного режима замораживания в 1,5 мл пробирках [146], позволило повысить оплодотворяющую способность размороженной спермы в 2-2,5 раза по сравнению с используемой ранее средой от [147-155]. Показано отсутствие необходимости в использовании трис-буферных разбавителей и сложных солевых составов, а также в раздельном смешивании спермы сначала с разбавителем, а затем с криопротектором, и в периоде эквилибрации. Выявлена определяющая роль и оптимальная концентрация хлорида калия в среде. Некоторое повышение протективного действия базовой среды наблюдалось при добавлении к ней ряда аминокислот, антиоксидантов, антифризных белков, глицерина [148; 149; 156; 157]. Добавление антифризных гликопротеинов (АФГП), полученных из крови баренцевоморской трески (*Gadus morhua*), в концентрациях 5-25 мг/мл обеспечило трехкратное и более увеличение оплодотворяющей способности размороженной спермы сибирского осетра [158-160]. Обнаружено положительное влияние добавок таурина на сохранность криоконсервированной спермы [161], а также – на продление жизнеспособности нативной спермы при хранении и транспортировке перед криоконсервацией [162]. Разработанный базовый протокол обеспечивал получение высоких уровней оплодотворения икры криоконсервированной спермой сибирского осетра (62-75%), русского осетра (62-68%), стерляди (62-73%), севрюги (72-82%), белуги (81%), калуги (87%) в промышленных условиях [146; 153; 163-166]. Отмечалось, что полученная таким способом молодь осетров имеет повышенные физиологические и рыбоводные показатели. Фенотипическая адаптация личинок к изменениям экологических условий (температура воды 37 и 4 °С, содержание без кормления, соленость 1-5%) оказалась значительно выше, чем у полученных традиционным способом [163; 164; 167].

С применением данной технологии, в сотрудничестве исследователей из МГУ и ВНИИПРХ, разработан метод оценки степени повреж-

дения клеток в криоконсервированной сперме, основанный на интенсивности свободнорадикальных реакций [168; 169]. С использованием спермы, криоконсервированной в лаборатории криобиологии ВНИИПРХ, генетиками из Института биологии развития РАН и ВНИИПРХ осуществлен диспермный андрогенез у осетровых рыб, открывающий, в сочетании с криоконсервацией, новые возможности для восстановления исчезающих видов. Получено андрогенетическое потомство сибирского и русского осетров, севрюги, белуги, гибридов севрюга×белуга, русский осетр×сибирский осетр [170], сибирский осетр× русский осетр [171; 172]. Впервые на осетровых рыбах применен гаплоидный андрогенез, как метод оценки повреждений генетического аппарата спермиев, вызванных различными факторами криоконсервации. Повреждения хромосом у размороженных сперматозоидов белуги и сибирского осетра, не выявленные у обычных диплоидных зародышей, четко проявились у гаплоидных эмбрионов. Положительный эффект добавки АФГП в криозащитную среду, при замораживании спермы стерляди, доказан равной выживаемостью гаплоидных эмбрионов, развившихся из нативной и криоконсервированной спермы [173].

При дальнейшем совершенствовании данной технологии криоконсервации, вызванном необходимостью замораживания спермы разного качества, обнаружено повышение протективного действия базовой среды при дополнении ее вторым проникающим криопротектором, формамидом, в концентрациях 0,5-1%, что может быть связано с проявлением эффекта синергизма. Эффективность усовершенствованной криозащитной среды подтверждена испытаниями 40 экспериментальных сред, а также при замораживании образцов спермы калуги, стерляди, сибирского и русского осетров для пополнения коллекции криобанка. Усовершенствованный протокол криоконсервации спермы осетровых рыб обеспечивал, в случае использования половых продуктов хорошего качества, сохранение оплодотворяющей способности замороженной спермы на уровне нативной [155; 174]. Коллекция спермы осетрообразных рыб в крупнейшем в России криобанке ВНИИПРХ представлена 700 образцами, общий объем которых составляет более 15 литров. Мониторинг сохранности образцов криоконсервированной спермы, проводимый в течение 30 лет, показывал, что продолжительность хранения не влияла на их качество [149-151; 165; 175-177].

Украинские исследователи, в опытах на сперме стерляди, при модифицировании разработанного в ВНИИПРХ способа криоконсервирования спермы осетровых рыб [153; 156], комбинируя

в водных средах различные концентрации сахарозы, фруктозы, KCl, K₂CO₃, глицина, глицерина, креатина, метанола и ДМСО, добавляя плазму крови карася, а также сравнивая способы замораживания суспензии сперма-среда в гранулах по 100 мкл на фторопластовой пластине и в пробирках объемом 0,5 и 1,5 мл, согласно методическому пособию ВНИИПРХ [146], подтвердили предпочтительность метанола в сравнении с ДМСО, заметили положительный эффект от использования в средах креатина и фруктозы, замены KCl на K₂CO₃, а также от уменьшения объема замораживаемого образца. Применение лучшей среды, содержащей в водном растворе 8,9 мМ K₂CO₃, 3,8 мМ креатина, 11,7 мМ сахарозы, 5,6 мМ фруктозы и 3,75 М метанола, и замораживания, разбавленной в соотношении 1:1 спермы в гранулах, обеспечило достижение 85,6% оплодотворения икры оттаявшей спермой по сравнению с 87,6% в контроле. Отмечалось, что прирост массы и длины тела трехмесячных особей, полученных с использованием криоконсервированной спермы, был больше, чем в контроле [178-180].

При использовании вышеупомянутого способа криоконсервации спермы осетровых рыб для воспроизводства стерляди дунайской и днепровской популяций, украинскими специалистами установлено, что криозащитная среда, содержащая сахарозу, KCl и метанол, является технологически оптимальной. Размороженная сперма с 48-55% подвижных клеток оплодотворяла 80-85% икры по сравнению с 90-95% в нативном контроле. Полученные личинки от двух популяций стерляди были использованы для воспроизводства ремонтно-маточных стад в рыбоводческом хозяйстве [181]. Сравнение в другом исследовании характеристик спермы стерляди из дунайской, днепровской и волжской популяций после криоконсервации в среде, содержащей 14,6 мМ сахарозы, 13,4 мМ KCl и 3,73 М метанола, с трехэтапным режимом замораживания в стеклянных ампулах, показало снижение ее подвижности в среднем до 50% (от нативной, близкой к 100%) и снижение содержания в ней пяти липидных фракций (фосфолипидов, холестерола, свободных жирных кислот, триацилглицерола, эфиров холестерола), свидетельствующее о повреждении фосфолипидного бислоя мембран [182].

Польские криобиологи исследовали возможность применения для криоконсервации спермы сибирского осетра глюкозо-метанольной среды, подобной той, которая ранее была ими разработана для спермы лососеобразных рыб, в протоколе замораживания в 0,25 мл соломинках на рамке в 3 см над LN₂ в течение

5 мин с последующим погружением. Лучший, по результатам оценки подвижности размороженной спермы, состав (водный раствор 0,1 М глюкозы и 15% метанола), выбранный при сравнении сред с разными концентрациями глюкозы (0, 0,1, 0,15, 0,2 и 0,3 М), в сочетании с 15% метанола, при соотношении разбавления 1:1, обеспечивал около 30% выклева после оплодотворения икры криоконсервированной спермой, близкого к выклеву в контроле (около 33%). При этом ни эквилибрация перед замораживанием до 30 мин, ни хранение после оттаивания до 30 мин не влияли на подвижность и оплодотворяющую способность размороженной спермы, что важно для выполнения крупномасштабных хозяйственных операций. Сравнение раствора 0,1 М глюкозы с разбавителем mT в данном протоколе практически не показало различия: соответственно ~ 28% и ~ 25% выклева [183]. При сравнении 0,05 и 0,1 М растворов глюкозы в том же протоколе при замораживании спермы стерляди предпочтение было отдано раствору с меньшей концентрацией по оценке подвижности после оттаивания: 68,3 и 65,1%, соответственно [184]. При криоконсервации спермы остроносого осетра (*A. oxyrinchus*) по данному протоколу лучшую подвижность после оттаивания (81-84%) обеспечивали финальные (после разбавления) концентрации: 0,05 М глюкозы, 7,5 % метанола и 1.109 сперматозоидов/мл [185].

При аналогичном сравнении растворов глюкозы того же набора концентраций с разбавителем mT в сочетании с 10% метанола при криоконсервации спермы белуги в подобном протоколе замораживания (в 0,5 мл соломинках в 3 см над LN₂ в течение 5 мин) лучший результат был получен при использовании 0,2 М раствора глюкозы (50% выклева по сравнению с 40% для mT). При этом эквилибрация суспензии сперма-среда в течение 0 или 15 мин не влияла на выклев, но он резко падал при эквилибрации в течение 30 мин [186]. При сравнении 0,2 М растворов мальтозы, лактозы и трегалозы в сочетании с 9% метанола в том же протоколе при криоконсервации спермы белуги и персидского осетра не выявлено влияния типа дисахарида на подвижность размороженной спермы. Этот показатель не менялся в течение 30 мин хранения после оттаивания, но резко падал после 60 мин хранения [187].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Как показывает представленный обзор публикаций двух последних десятилетий, технологии криоконсервации спермы разрабатывались для большинства видов осетрообразных рыб, обитающих в Европе, Азии и Северной Амери-

ке. Наиболее распространены были протоколы с использованием модифицированного разбавителя Цветковой (30 мМ трис-буферного раствора с 23,4 мМ сахарозы и 0,25 мМ KCl, pH 8.0) с ДМСО или метанолом и быстрого замораживания разбавленной в обычном соотношении 1:1 спермы в соломинках объемом 0,25 или 0,5 мл на полистироловой рамке толщиной 3-4 см, плавающей на поверхности LN₂ в течение 3-10 мин с последующим погружением. Среди известных проникающих криопротекторов метанол был наиболее эффективен для криозащиты клеток и сохранения ими высокой оплодотворяющей способности после оттаивания. Показано, что все еще применяющийся ДМСО обеспечивает меньшую сохранность сперматозоидов, более токсичен и способен вызывать преждевременную акросомную реакцию при оплодотворении икры криоконсервированной спермой. Отмечалось, что сперма, замороженная с метанолом, была наиболее устойчива к окислительному стрессу и не обнаруживала различия в повреждении ДНК со свежей спермой. На современном этапе применялись и другие протоколы криоконсервации спермы осетрообразных рыб с использованием трис-буферных и водно-солевых разбавителей (в частности, различных вариантов среды Штайна) и трехэтапных режимов замораживания спермы в пробирках объемом 0,5-2 мл. Перспективными представляются протоколы с использованием простых по составу криозащитных сред на основе водных растворов сахаров с метанолом, обеспечивающие сохранение оплодотворяющей способности криоконсервированной спермы на уровне нативной. Полезным было добавление в такие среды солей калия, некоторых аминокислот, амидов, антиоксидантов и антифризных белков. Рекомендовано применение сред, изоосмотичных семенной плазме конкретных видов рыб. При необходимости криоконсервирования больших объемов спермы для последующего использования в аквакультуре целесообразным представляется ее замораживание в пробирках объемом 1,5 мл с поэтапным регулированием скорости охлаждения. Для оценки качества нативной и криоконсервированной спермы, а также эффективности протокола в целом, наиболее часто использовался анализ параметров подвижности клеток с помощью CASA (computer-assisted semen analysis). Отмечалось, что подвижность нативной спермы имеет ограниченную пригодность для прогнозирования успеха криоконсервации, поэтому необходим поиск новых маркеров. Для прогнозирования успеха оплодотворения икры также не пригодны ни подвижность, ни выживаемость размороженной спермы.

Часто наблюдаемое отсутствие корреляции между подвижностью, процентом оплодотворения икры и выклевом личинок указывало на необходимость оценки эффективности криоконсервации только по выклеву. Для успешного оплодотворения рекомендовалось увеличение количества размороженной спермы по сравнению со свежей и снижение степени ее разбавления водой. Активно исследовались причины снижения подвижности и оплодотворяющей способности клеток после криоконсервации. Пониженная подвижность сперматозоидов после оттаивания может вызываться механическими повреждениями мембран и хвоста, снижением содержания АТФ, окислительным стрессом. Индикаторами повреждений могут служить энзимы, вытекающие из клеток после замораживания и оттаивания. Лактатдегидрогеназа и кислая фосфатаза могут быть маркерами повреждений плазмалеммы и средней части. Повреждения акросомы могут оцениваться путем мониторинга активности акрозина, арилсульфатазы и β -N-ацетилглюкозаминдазы. Начато активное изучение изменений протеома криоконсервированной спермы. Разработан метод оценки степени повреждения клеток в криоконсервированной сперме, основанный на интенсивности свободнорадикальных реакций. Осуществлен диспермный и гаплоидный андрогенез у осетровых рыб, открывающий, в сочетании с криоконсервацией, новые возможности для восстановления исчезающих видов. Показана возможность криоконсервации тестикулярной спермы, которая может быть получена из семенников погибших самцов. Проводилось успешное получение промышленных партий эмбрионов с использованием криоконсервированной спермы. Показано, что полученное потомство имело нормальное эмбриональное и постэмбриональное развитие. Однако обнаружена опасность отбора жизнеспособных «криоэмбрионов» и увеличения доли некоторых гетерозигот у потомства, что указывает на необходимость изучения влияния методик криоконсервации на генофонд. Сформированы коллекции спермы осетрообразных рыб в криобанках.

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

81. Копейка Е.Ф., Дрокин С.И., Черепнин В.А. [и др.]. Опыт получения качественной спермы веслоноса (*Polyodon spathula* Walbaum 1792) и ее криоконсервация // Криоконсервация как способ сохранения биологического разнообразия: материалы конференции (Пущино, 28-30 октября 2008). – Биофизика живой клетки. 2008. Т. 9. С. 65-66.
82. Буцкий К.И., Пуговкин А.Ю., Копейка Е.Ф. Криоконсервирование спермы стерляди (*Acipenser ruthenus*) с использованием криозащитной среды на основе ДМСО // Проблемы криобиологии и криомедицины. 2017. Т. 27. № 2. <https://doi.org/10.15407/cryo27.02.174>
83. Alipour A., Baradaran Noveiri S., Nowruzfashkhami M.R. [et al.]. Fertilizing ability of cryopreserved spermatozoa in the Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) and stellate sturgeon (*A. stellatus*) // Iranian J. Fish. Sci. 2009. V. 8 (1). Pp. 1-12.
84. Мирзоян А.В., Небесихина Н.А., Войнова Н.В. [и др.] Аскорбиновая кислота и лизин подавляют генотоксический эффект глубокой заморозки спермы русского осетра // Сохранение генетических ресурсов: материалы международной конференции (Санкт-Петербург, 19-22 октября 2004). Цитология. 2004. Т. 46. № 9. С. 821-822.
85. Mirzoyan A.V., Nebesikhina N.A., Voynova N.V. [et al.] Preliminary results on ascorbic acid and lysine suppression of clastogenic effect of deep-frozen sperm of the Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedti*) // Int. J. Refrigeration. 2006. V. 29. No 3. Pp. 374-378. doi:10.1016/j.ijrefrig.2005.07.008.
86. Савушкина С. И. Методические аспекты биотехнологии криоконсервации половых продуктов пресноводных рыб // Аквакультура и интегрированные технологии: проблемы и возможности: материалы международной научно-практической конференции, посвященной 60-летию Московской рыбоводно-мелиоративной опытной станции и 25-летию её реорганизации в ГНУ ВНИИР (Москва, 11-13 апреля 2005). М., 2005. Т. 2. С. 217-227.
87. Савушкина С. И. Выращивание рыбопосадочного материала, полученного с использованием криоконсервированной спермы // Рациональное использование пресноводных экосистем – перспективное направление реализации национального проекта «Развитие АПК»: материалы научно-практической конференции (Москва, 17-19 декабря 2007). – М.: Россельхозакадемия. 2007. С. 303-305.
88. Савушкина С. И. Искусственное воспроизводство осетровых рыб с использованием криотехнологий // Состояние и перспективы развития пресноводной аквакультуры: доклады международной научно-практической конференции (Москва, ВВЦ, 5-6 февраля 2013). – Москва: Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К. А. Тимирязева. 2013. С. 429-440.
89. Лунев Г.Е., Тренклер И.В. Криоконсервация спермы русского осетра с использованием метилового спирта // Воспроизведение естественных популяций ценных видов рыб: тезисы докладов международной научной конференции (Санкт-Петербург, 20-22 апреля 2010). – Санкт-Петербург, 2010. С. 107-108.
90. Тренклер И.В., Лунев Г.Е. Оценка жизнеспособности эмбрионов и личинок русского осетра при использовании дефростированной спермы // Современное состояние биоресурсов: материалы конференции (Новосибирск, 7-9 октября 2010). – Новосибирск: Изд-во ИИЦ ГНУ СибНСХБ Россельхозакадемии. п. Краснообск. 2010. С. 171-173.
91. Shishanova E.I., Trenkler I.V. The influence of sperm cryopreservation on progeny of Russian sturgeon (*Acipenser gueldestaedti* Brandt) // Diversification in inland finfish aquaculture, Workshop (Pisek, Czech Republic, 16-18 May 2011): Abstr. Book. P. 114.
92. Шишанова Е.И., Тренклер И.В., Мамонова А.С. Влияние криоконсервации спермы на выживаемость и генетический полиморфизм личинок русского осетра // Вестник АГТУ. Сер.: Рыбное хозяйство. 2012. № 2. С. 105-111.
93. Rahimi R., Farahmand H., Mirvaghefi A. [et al.] Improvement in wild endangered Persian sturgeon, *Acipenser persicus* (Borodin, 1897), semen cryopreservation by 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin (H β CD) // Aquacult. Res. 2015. V. 46. No 10. P. 2452-2456. doi:10.1111/are.12403.
94. Yamaner G., Memis D., Baran A. Sperm quality and effects of different cryo media on spermatozoa motility in first-time spawning of cultured Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii* Bandt & Ratzeburg, 1833) // J. Appl. Ichthyol. 2015. V. 31. S1. Pp. 71-74. doi:10.1111/jai.12744.
95. Xi M.D., Wei Q.W., Li P. [et al.] Disaccharide combinations and the expression of enolase3 and plasma membrane Ca $^{2+}$ ATPase isoform in sturgeon sperm cryopreservation // Reprod. Dom. Anim. 2018. V. 53. No 2. Pp. 472-483. DOI: 10.1111/rda.13134.
96. Wayman W.R., Holm R.L., Tiersch T.R. Cryopreservation of sperm from shovelnose sturgeon *Scaphirhynchus platyrhynchus* // Aquaculture America 2002, World Aquaculture Society (San Diego, California, USA, 27-30 January 2002): Book Abstr. 2002. P. 356.
97. Wayman W.R., Looney G.L., Holm R.L. [et al.] Cryopreservation of sperm of pallid sturgeon *Scaphirhynchus albus* // Aquaculture America 2002, World Aquaculture Society (San Diego, California, USA, 27-30 January 2002): Book Abstr. 2002. P. 687.
98. Wayman W.R., Looney G.L., Holm R.L. [et al.] Cryopreservation of sperm from endangered pallid sturgeon // North American Journal of Fisheries Management. 2008. V. 28. Pp. 740-744. DOI: 10.1577/M06-161.1.
99. Liu L., Wei Q., Guo F. [et al.] Cryopreservation of Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) sperm // J. Appl. Ichthyol. 2006. V. 22. Suppl. 1. Pp. 384-388.
100. Земков Г.В., Акимочкина Т.И. Цитоморфологические и функциональные изменения спермииев русского осетра *Acipenser gueldenstaedtii* после криоконсервации // Цитология. 2009. Т. 51. № 11. С. 945-952.
101. Stein H., Bayrle H. Cryopreservation of the sperm of some freshwater teleosts // Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys. 1978. V. 18. Pp. 1073-1076.
102. Чипинов В.Г., Джаригазов Е.С., Болонина Н.В. Оценка качества спермы осетровых рыб различными методами и опыт ее низкотемпературной консервации // Вестник АГТУ. Сер.: Рыбное хозяйство. 2012. № 2. С. 105-111.

- вации // Вестник АГТУ. Сер.: Рыбное хозяйство. 2010. № 1. С. 140-143.
103. Храмова А.В., Богатырева М.М., Болонина Н.В. Криопротекторный эффект цианокобаламина при замораживании спермы осетровых рыб // Материалы 2 ежегодной научной конференции студентов и аспирантов базовых кафедр Южного научного центра РАН (Ростов-на-Дону, 5-26 апреля 2006). С. 44-45.
104. Пономарева Е.Н., Богатырева М.М., Антонова Н.А. [и др.] Оптимизация процесса криоконсервации спермы осетровых рыб при использовании различных сред // Известия Самарского научного центра РАН. 2009. Т. 11. № 1 (2). С. 132-134.
105. Тихомиров А.М., Пономарева Е.Н. Электростимуляция мембран спермииев русского осетра облегчает проникновение криопротекторов внутрь клеток // Биофизика живой клетки. 2008. Т. 9. С. 129-130.
106. Пономарева Е.Н., Богатырева М.М., Болонина Н.В. [и др.] Повышение эффективности криоконсервации половых клеток сюрюга с помощью электростимуляции // Вестник АГТУ. Сер.: Рыбное хозяйство. 2009. № 1. С. 100-103.
107. Патент № 2399201 Российская Федерация, С1. Способ повышения выживаемости половых клеток осетровых рыб при криоконсервации: опубл. 20.09.2010 / Е.Н. Пономарева, А.М. Тихомиров, М.М. Богатырева, Н.В. Болонина, Е.С.Джаригазов.
108. Пономарева Е.Н., Богатырева М.М., Тихомиров А.М. Повышение выживаемости половых клеток в процессе криоконсервации с использованием электростимуляции // Доклады Академии наук. 2010. Т. 431. № 2. С. 264-265.
109. Пономарева Е.Н., Белая М.М., Фирсова А.В. [и др.] Влияние акустико-механического воздействия на репродуктивные качества спермы осетровых рыб при криоконсервации // Доклады РАН. Науки о жизни. 2022. Т. 505. № 1. С. 314-317. DOI: 10.31857/S2686738922040126
110. Фирсова А.В., Григорьев В.А. Применение пьезоактуаторов при криоконсервации спермы рыб // Состояние и пути развития аквакультуры в Российской Федерации: материалы VII национальной научно-практической конференции – Саратов. 2022. С. 188-190.
111. Богатырева М.М., Болонина Н.В., Пономарева Е.Н. [и др.] Результаты хранения образцов спермы сюрюга // Вестник АГТУ. Сер.: Рыбное хозяйство. 2008. № 3. С. 22-25.
112. Пономарева Е.Н., Богатырева М.М., Тихомиров А.М. Использование криоконсервированной спермы при искусственном воспроизведении осетровых рыб в установках замкнутого водообеспечения // Актуальные проблемы обеспечения продовольственной безопасности юга России: инновационные технологии для сохранения биоресурсов, плодородия почв, мелиорации и водообеспечения: материалы международной научной конференции (Ростов-на-Дону, 27-30 сент. 2011). – Ростов-на-Дону: ЮНЦ РАН, 2011. С. 100-101.
113. Патент № 2518442 Российская Федерация, С1. Способ создания репродуктивных маточных стад осетровых рыб: опубл. 10.06.2014 / Е.Н. Пономарева, М.Н. Сорокина, В.А. Григорьев, А.В. Ковалева, М.М. Белая.
114. Пономарева Е.Н., Красильникова А.А., Белая М.М. [и др.] Сохранение биологического разнообразия методами криоконсервации: опыт Южного научного центра РАН // Морской биологический журнал. 2022. Т. 7. № 3. С. 80-87.
115. Фирсова А.В., Корчунов А.А. Оценка оплодотворяющей способности криоконсервированных репродуктивных клеток осетровых рыб // Ресурсы дичи и рыбы: использование и воспроизводство: материалы всероссийской (национальной) научно-практической конференции, посвященной 70-летию Красноярского государственного аграрного университета. – Красноярск. 2023. С. 325-327.
116. Матищов Г.Г., Пономарева Е.Н., Белая М.М. Сохранение генетического разнообразия рыб методами низкотемпературного консервирования // Рыбное хозяйство. 2012. № 3. С. 59-62.
117. Пономарева Е.Н., Неваленный А.Н., Белая М.М. [и др.] Использование криоконсервированной спермы для формирования маточного стада стерляди // Вестник АГТУ. Сер.: Рыбное хозяйство. 2017. № 4. С. 118-127. doi 10.24143/2073-5529-2017-4-118-127
118. Красильникова А.А., Тихомиров А.М. Получение жизнеспособной молоди русского осетра (*Acipenser gueldenstaedtii*) при использовании криоконсервированной спермы и оценка поведенческих реакций у криопотомства // Сельскохозяйственная биология. 2018. Т. 53. № 4. С. 762-768. doi 10.15389/agrobiology.2018.4.762rus
119. Белая М.М. Сохранение биоразнообразия ценных видов рыб методами низкотемпературного консервирования // Современные рыбные ресурсы и аквакультура в Азово-Черноморском бассейне: сборник совместных публикаций сотрудников ЮНЦ РАН и ДГТУ / под общей редакцией Г.Г. Матищова, Б.Ч. Месхи, И.В. Карманова (отв. ред.). – Ростов-на-Дону. 2020. С. 250-253.
120. Красильникова А.А., Тихомиров А.М. Объем замораживаемого образца как один из факторов выживаемости сперматозоидов осетровых видов рыб при криоконсервации // Естественные науки. 2014. № 2 (47). С. 62-69.
121. Krasilnikova A., Ponomareva E., Shvedova S. [et al.] The volume of the sample as a factor of survival of sturgeon spermatozoa after cryopreservation // E3S Web Conf. 2020. Vol. 210. P. 07010. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202021007010>
122. Стамгазиева А.Ш., Тихомиров А.М. Влияние сквозного замораживания на качество спермы осетровых рыб при криоконсервации // Рациональное использование и сохранение водных биоресурсов: материалы международной научной конференции, приуроченной к открытию базовой кафедры ЮНЦ РАН «Технические средства аквакультуры в ДГТУ» (Ростов-на-Дону, 17-18 февраля 2014). – Ростов-на-Дону. 2014. С. 152-153.
123. Krasilnikova A.A., Tikhomirov A.M. Alternative methods of preparation of fish sperm to freeze at ultra-high values of cooling rate // Вестник АГТУ. Сер.: Рыбное хозяйство. 2014. № 2. С. 72-78.
124. Красильникова А.А. Оптимизация процесса подготовки репродуктивных клеток самцов рыб к крио-

- консервации // Вестник рыбохозяйственной науки. 2019. Т. 6. № 4 (24). С. 63-69.
125. Красильникова А.А. Криоконсервация репродуктивных клеток рыб при сверхвысоких скоростях охлаждения // Труды ЮНЦ РАН. 2021. Т. 9. С. 44-51. doi 10.23885/1993-6621-2021-9-44-51
126. Красильникова А.А., Тихомиров А.М. Корреляция объемов внутриклеточной жидкости сперматозоидов и эндоцеллюлярного протектора в криозащитных средах для осетровых рыб // Естественные науки. 2015. № 3 (52). С. 96-102.
127. Пономарева Е.Н., Красильникова А.А., Тихомиров А.М. [и др.] Новые биотехнологические методы криоконсервации репродуктивных клеток осетровых видов рыб // Юг России: экология, развитие. 2016. Т. 11. № 1. С. 59-68. doi 10.18470/1992-1098-2016-1-59-68.
128. Krasilnikova A.A. Quantity dosing of endocellular cryoprotectants during cryopreservation of fish sperm // 7th International Workshop on the Biology of Fish Gametes (Rennes, France, 3-6 sept. 2019): Book of abstracts. Rennes. 2019. Р. 145.
129. Тихомиров А.М., Богатырёва М.М., Джаригазов Е.С. Влияние объемов, режимов замораживания и оттаивания на качество спермы русского осетра при криоконсервации // Рациональное использование пресноводных экосистем – перспективное направление реализации национального проекта «Развитие АПК»: материалы научно-практической конференции (Москва, 17–19 декабря 2007). – М.: Россельхозакадемия. 2007. С. 311-313.
130. Красильникова А.А. Криоконсервация сперматозоидов осетровых рыб при различных скоростях замораживания // Состояние и пути развития аквакультуры в Российской Федерации в свете импортозамещения и обеспечения продовольственной безопасности страны: материалы III национальной научно-практической конференции (Казань, 3-5 октября 2018). – Саратов: Амирит. 2018. С. 179-183.
131. Белая М.М., Красильникова А.А. Влияние скорости замораживания на рыбоводные качества спермы осетровых рыб // Вестник АГТУ. Сер.: Рыбное хозяйство. 2019. № 1. С. 83-90. doi 10.24143/2073-5529-2019-1-83-90
132. Осипова В.П., Коляды М.Н., Антонова Н.А. [и др.] Использование фенольных антиоксидантов для повышения криостойчивости спермы русского осетра // Вестник Южного научного центра РАН. 2010. Т. 6. № 3. С. 68-72.
133. Osipova V.P., Kolyada M.N., Berberova N.T. [et al.] Cryoprotective effect of phosphorous-containing phenolic antioxidant for the cryopreservation of beluga sperm // Cryobiology. 2014. V. 69. Pp. 467-472. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.10.007>
134. Kolyada M.N., Osipova V.P., Berberova N.T. [et al.] Cryoprotective activity of phosphorus-containing phenol // Cryobiology. 2020. V. 96. Pp. 61-67. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.08.002>
135. Osipova V.P., Berberova N.T., Gazzaeva R.A. [et al.] Application of new phenolic antioxidants for cryopreservation of sturgeon sperm // Cryobiology. 2016. V. 72. Pp. 112-118. doi 10.1016/j.cryobiol.2016.02.006
136. Осипова В.П., Коляды М.Н. Применение антиоксидантов нового поколения в качестве криопротек-торов при низкотемпературном консервировании репродуктивных клеток осетровых рыб // Развитие и современные проблемы аквакультуры (Конференция «Аквакультура 2022»): сборник научных трудов II международной научно-практической конференции. – Ростов-на-Дону. 2022. С. 103-105.
137. Осипова В.П., Антонова Н.А., Кудрявцев К.В. [и др.] Исследование амидов 2-(2-гидроксифенилтио)уксусной кислоты в качестве протекторов базовых сред криоконсервации спермы осетровых рыб // Биологически активные вещества и материалы: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения: материалы международной междисциплинарной научной конференции. 2013. С. 35-36.
138. Осипова В.П., Кудрявцев К.В., Берберова Н.Т. Новый протектор базовых сред криоконсервации спермы осетровых рыб // Сборник тезисов докладов четвертого междисциплинарного симпозиума по медицинской, органической и биологической химии и фармацевтике. – 2018. - С. 169.
139. Осипова А.Д., Осипова В.П., Половинкина М.А. [и др.] Новые производные индолина в процессе криоконсервации спермы белуги // Изучение водных и наземных экосистем: история и современность: тезисы докладов II международной научно-практической конференции (Севастополь. 2022). С. 289-290.
140. Фирсова А.В., Половинкина М.А., Григорьев В.А. [и др.] Влияние новых производных фенола с пирролидиновым фрагментом на репродуктивные свойства половых клеток осетровых // Развитие и современные проблемы аквакультуры (Конференция «Аквакультура 2022»): сборник научных трудов II международной научно-практической конференции. – Ростов-на-Дону. 2022. С. 154-156.
141. Осипова В.П., Колумбет А.Д., Половинкина М.А. [и др.] Антиоксидантные свойства фенольных производных пролина // Фундаментальные исследования, инновационные технологии и передовые разработки в интересах долгосрочного развития Юга России: материалы международного научного форума, посвященного 20-летию ЮНЦ РАН. – Ростов-на-Дону. 2023. С. 232-236.
142. Половинкина М.А., Осипова В.П., Колумбет А.Д. [и др.] Активность фенольных производных пирролидина в отношении супероксидного анион-радикала // Фундаментальные исследования, инновационные технологии и передовые разработки в интересах долгосрочного развития Юга России: материалы международного научного форума, посвященного 20-летию ЮНЦ РАН. – Ростов-на-Дону. 2023. С. 237-241.
143. Коляды М.Н., Половинкина М.А., Колумбет А.Д. [и др.] Исследование влияния новых производных пролина на H_2O_2 -утилизирующую активность спермы русского осетра // Состояние и перспективы развития агропромышленного комплекса: сборник научных трудов XVI международной научно-практической конференции в рамках XXVI Агропромышленного форума юга России и выставки «Интерагромаш» и «Агротехнологии». Донской государственный технический университет. – Ростов-на-Дону. 2023. С. 162-164. doi 10.23947/interagro.2023.162-164

144. Коляда М.Н., Осипова В.П., Берберова Н.Т. [и др.] Влияние криоконсервации на уровень пероксидации липидов спермы осетровых рыб в условиях спонтанного и индуцированного окисления // Актуальные проблемы освоения водных биологических ресурсов Российской Федерации: материалы всероссийской конференции ученых и специалистов, посвященной 160-летию Н.М. Книповича. – Мурманск. 2023. С. 262-267.
145. Kolyada M.N., Osipova V.P., Berberova N.T. [et al.] The effect of tin compounds on the lipid peroxidation level of Russian sturgeon fresh and cryopreserved sperm // Environmental Research, Engineering and Management. 2020. V. 76. No 2. Pp. 34-42. <http://dx.doi.org/10.5755/j01.erem.76.2.23407>
146. Цветкова Л.И., Докина О.Б., Пронина Н.Д. [и др.] Технология криоконсервации и хранения в низкотемпературном банке спермы рыб // Сборник научно-технологической и методической документации по аквакультуре. – М.: Изд-во ВНИРО. 2001. С. 152-158.
147. Цветкова Л.И., Докина О.Б., Пронина Н.Д. [и др.] Исследование низкотемпературной консервации спермы рыб // Доклады Первой Всероссийской конференции по генетике, селекции и воспроизведству рыб (Ропша, Ленинградская обл., 29-30 октября 2002). – СПб. 2002. С. 49-50.
148. Цветкова Л.И., Докина О.Б., Пронина Н.Д. [и др.] Криоконсервация спермы осетровых рыб - объектов аквакультуры // Аквакультура осетровых рыб: достижения и перспективы: материалы III международной научно-практической конференции (Астрахань, 22-25 марта 2004). – Астрахань. 2004. С. 213-214.
149. Цветкова Л.И., Докина О.Б., Пронина Н.Д. [и др.] Криотехнологии для сохранения генофонда рыб - объектов аквакультуры // Актуальные вопросы пресноводной аквакультуры: сборник научных трудов ВНИИПРХ. – М.: Спутник +. 2005. Вып. 80. С. 140-144.
150. Цветкова Л.И., Докина О.Б., Пронина Н.Д. [и др.] Перспектива использования криоконсервированной спермы рыб для нужд аквакультуры // Биофизика живой клетки. 2006. Т. 8. С. 163-166.
151. Цветкова Л.И., Пронина Н.Д., Докина О.Б. [и др.] Формирование низкотемпературного генного банка спермы рыб (состояние, развитие, перспективы) // Вопросы рыболовства. 2012. Т. 13. № 3 (51). С. 538-545.
152. Докина О.Б., Цветкова Л.И., Пронина Н.Д. [и др.] Исследование криоконсервации спермы как метода сохранения и восстановления генофонда рыб // Проблемы естественного и искусственного воспроизводства рыб в морских и пресноводных водоемах: тезисы докладов международной научной конференции (Ростов-на-Дону, 9-10 июня 2004). – Ростов-на-Дону: ООО «ЦВВР». 2004. С. 39-40.
153. Докина О.Б., Цветкова Л.И., Пронина Н.Д. [и др.] Метод криоконсервации спермы осетровых рыб – объектов аквакультуры // Аквакультура осетровых рыб: достижения и перспективы развития: материалы докладов международной научно-практической конференции (Астрахань, 13-15 марта 2006). – М: Изд-во ВНИРО. 2006. С. 76-79.
154. Докина О.Б., Цветкова Л.И., Пронина Н.Д. [и др.] Использование метода низкотемпературной консервации спермы для сохранения генофонда осетровых рыб // Тепловодная аквакультура и биологическая продуктивность водоемов аридного климата: материалы и доклады международного симпозиума (Астрахань, 16-18 апреля 2007). – Астрахань. 2007. С. 306-308.
155. Докина О.Б., Ковалев К.В., Пронина Н.Д. [и др.] Эффективные технологии криоконсервации спермы карповых и осетровых рыб // Новейшие генетические технологии для аквакультуры: материалы всероссийской научно-практической конференции с международным участием (Москва, МВЦ «Крокус Экспо», 29-31 января 2020). – М.: «Перо». 2020. С. 119-134.
156. Патент № 2317703 Российской Федерации, А 01 К 61/00, А 01 Н 1/02. Способ криоконсервирования спермы осетровых рыб: опубл. 27.02.2008 / О.Б. Докина, Л.И. Цветкова, Н.Д. Пронина, В.А. Миленко
157. Kovalev K.V., Dokina O.B., Pronina N.D. Influence of the serine amino acid on the viability and sperm fertility of the beluga (*Huso huso*) // CRYO 2020 : Abstracts of the 57th annual meeting of the society for cryobiology (21-23 July 2020). Pp. 55-56.
158. Цветкова Л.И., Карапова М.В., Пронина Н.Д. [и др.] Репродуктивная способность спермиев осетровых и карповых рыб, замороженных в присутствии антифризных гликопротеинов // Актуальные вопросы пресноводной аквакультуры: сборник научных трудов ВНИИПРХ. – Дмитров: ИД «Вести». 2007. Вып. 83. С. 68-71.
159. Цветкова Л.И., Пронина Н.Д., Докина О.Б. [и др.] Использование антифризных гликопротеинов при криоконсервации спермы рыб // Вестник РАСХН. 2009. № 2. С. 57-59.
160. Tsvetkova L.I., Karanova M.V., Pronina N.D. [et al.] Reproductive capacity of sturgeon and carp sperm frozen in the presence of antifreezing glycoproteins // The 1st International Workshop on the Biology of Fish Sperm (Vodnany, Czech Republic, 29-31 August 2007): Abstract Book. Pp. 93-95.
161. Цветкова Л.И., Пронина Н.Д., Докина О.Б. [и др.] Влияние 2-аминоэтансульфоновой кислоты (таурина) на жизнеспособность спермиев осетровых (*Acipenseridae*) рыб после криоконсервации // Рыбное хозяйство. 2012. № 4. С. 77-81.
162. Kovalev K., Dokina O., Pronina N. [et al.] Use of 2-aminoethanesulfonic acid (taurine) for cryopreservation and storage of Siberian sturgeon sperm (*Acipenser baerii*). // E3S Web Conf. 2021. Vol. 273. P. 03010. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202127303010>
163. Цветкова Л.И., Докина О.Б., Пронина Н.Д. [и др.] Низкотемпературные генные банки // Рыбоводство и рыболовство. 2001. № 1. С. 79.
164. Цветкова Л.И., Докина О.Б., Пронина Н.Д. [и др.] Генетические криобанки для сохранения генофонда рыб // Аквакультура начала XXI века: истоки, состояние, стратегия развития: материалы международной научно-практической конференции (п. Рыбное, Моск. обл., 3-6 сентября 2002). – М.: Изд-во ВНИРО. 2002. С. 203-207.
165. Цветкова Л.И., Докина О.Б., Пронина Н.Д. [и др.] Роль низкотемпературных генных банков для раз-

- вития аквакультуры // Повышение эффективности использования водных биологических ресурсов: материалы докладов первой научно-практической конференции (Москва, ВВЦ, 1-2 ноября 2006). – М.: Изд-во ВНИРО. 2006. С.130-131.
166. Kovalev K., Pronina N., Dokina O. [et al.] Method for large-scale production of sturgeon embryos using cryopreserved sperm // 7th International Workshop on the Biology of Fish Gametes (Rennes, France, 3-6 sept. 2019): Book of abstracts. – Rennes. 2019. Pp. 124-125.
167. Цветкова Л.И., Докина О.Б., Пронина Н.Д. [и др.] Криоконсервация спермы рыб: состояние, развитие, перспективы // Избранные труды ВНИИПРХ. – Дмитров: «Север Подмосковья». 2002. Книга 1. Т. II. Ч. 2. С. 358-365.
168. Патент № 2233142 Российская Федерация, 7 А 61 D 19/02, A 01 K 61/00. Способ определения жизнеспособности спермы рыб после криоконсервации: опубл. 27.07.2004 / Мелехова О.П., Цветкова Л.И., Докина О.Б., Коссова Г.В., Падалка С.М., Пронина Н.Д., Миленко В.А.
169. Мелехова О.П., Цветкова Л.И., Коссова Г.В. [и др.] Метаболический критерий для оценки жизнеспособности репродуктивного материала ценных видов рыб после криоконсервации // Биотехнология - охране окружающей среды: труды международного биотехнологического центра МГУ им. М.В.Ломоносова. – М.: «Спорт и Культура». 2004. Ч. 1. С. 124-126.
170. Grunina A.S., Barmintsev V.A., Rekoubratsky A.V. [et al.] Investigation on dispermic androgenesis in sturgeon fish. The first successful production of androgenetic sturgeons with cryopreserved sperm // Int. J. Refrigeration. 2006. V. 29. No 3. Pp. 379-386. doi:10.1016/j.ijrefrig.2005.07.009
171. Грунина А.С., Рекубратский А.В., Цветкова Л.И., [и др.] Диспермный андрогенез у осетровых рыб с использованием криоконсервированной спермы: Получение андрогенетического потомства сибирского осетра и андрогенетических гибридов между сибирским и русским осетрами // Онтогенез. 2011. Т. 42. № 2. С. 133-145.
172. Grunina A.S., Rekoubratsky A.V., Tsvetkova L.I. [et al.] Dispermic androgenesis in sturgeons with the use of cryopreserved sperm: Production of androgenetic Siberian sturgeon and androgenetic hybrids between Siberian and Russian sturgeons // Russian Journal of Developmental Biology. 2011. V. 42. No 2. Pp. 108-119. doi 10.1134/S1062360411020056
173. Грунина А.С., Рекубратский А.В., Цветкова Л.И. Методика оценки генетических последствий криоконсервации спермы рыб с использованием гаплоидного андрогенеза: опыты на осетрах // Академику Л.С. Бергу – 140 лет: сборник научных статей. – Бендеры: Eco-TIRAS. 2016. С. 336-338.
174. Патент № 2683682 Российская Федерация, МПК A 01 N 1/02 (2006.01). Защитная среда для криоконсервации спермы осетровых рыб: опубл. 01.04.2019 / О.Б. Докина, К.В. Ковалев, Н.Д. Пронина, В.А. Миленко.
175. Kovalev K.V., Pronina N.D., Dokina O.B. [et al.] Opportunities of the largest fish sperm cryobank in Russia // Cryobiology. 2018. V. 85. P. 176. doi:10.1016/j.cryobiol.2018.10.213
176. Ковалев К.В., Докина О.Б., Пронина Н.Д. [и др.] Об итогах и перспективах работы крупнейшего в России криобанка спермы рыб // Новейшие генетические технологии для аквакультуры: материалы всероссийской научно-практической конференции с международным участием (Москва, МВЦ «Крокус Экспо», 29-31 января 2020). – М.: «Перо». 2020. С. 243-246.
177. Ковалев К.В., Пронина Н.Д., Докина О.Б. [и др.] Крупнейший в России криобанк генетического материала рыб // Рыбоводство. 2020. № 3-4. С. 38-39.
178. Пуговкин А.Ю., Кононенко И.С., Кононенко Р.В. [и др.] Криоконсервирование спермы стерляди: оптимизация состава криозащитной среды // Проблемы криобиологии и криомедицины. 2016. Т. 26. № 2. С. 160.
179. Kononenko I. Development of cryoprotective media for low-temperature freezing of sterlet (*Acipenser ruthenus*) sperm // Рибогосподарська наука України. 2017. №. 2. Pp. 99-113. <https://doi.org/10.15407/fsu2017.02.099>
180. Кононенко И.С., Пуговкин А.Ю., Кононенко Р.В. [и др.] Оптимизация условий криоконсервирования спермы стерляди (*Acipenser ruthenus* L. 1758) для оплодотворения икры в условиях рыбных хозяйств // Рибогосподарська наука України. 2017. №. 3. С. 83-97. <https://doi.org/10.15407/fsu2017.03.083>
181. Dragan L.P., Mruk A.I., Golian V.M. [et al.] Technology of sterlet reproduction by means of cryopreserved sperm // Biotechnologia Acta. 2017. V. 10. No 5. Pp. 30-35. <https://doi.org/10.15407/biotech10.05.030>
182. Drahon L.P., Veselsky S.P., Rud Yu.P. [et al.] Impact of cryopreservation on lipid composition of sperm cells of male sterlets (*Acipenser ruthenus* L.) // Agricult. Sci. Pract. 2018. V. 5. No 1. Pp. 75-80. doi 10.15407/agrisp5.01.075
183. Judycka S., Szczepkowski M., Ciereszko A. [et al.] New extender for cryopreservation of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) semen // Cryobiology. 2015. V. 70. No 2. Pp. 184-189. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2015.02.005>
184. Judycka S., Szczepkowski M., Ciereszko A. [et al.] Optimal glucose concentration in extender is crucial for successful cryopreservation of sterlet (*Acipenser ruthenus* L.) sperm // 5th Int. Workshop Biol. Fish Gametes (Ancona, Italy, 7-11 Sept. 2015): Book Abstr. 2015 Pp. 151-152.
185. Judycka S., Szczepkowski M., Liszewska E. [et al.] First attempt on standardization of cryopreservation procedure of Atlantic sturgeon (*Acipenser oxyrinchus*) semen // 8th Int. Workshop Biol. Fish Gametes (20-23 Sept. 2022, Gdansk, Poland): Book Abstr. 2022. P. 109.
186. Aramli M.S., Golshahi K., Nazari R.M. [et al.] Effectiveness of glucose-methanol extender for cryopreservation of *Huso huso* spermatozoa // Anim. Reprod. Sci. 2015. V. 162. Pp. 37-42. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2015.09.005.
187. Golshahi K., Aramli M.S., Nazari R.M. [et al.] Disaccharide supplementation of extenders is an effective means of improving the cryopreservation of semen in sturgeon // Aquaculture. 2018. V. 486. Pp. 261-265. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.12.045>.

Материал поступил в редакцию/ Received 10.10.2023
Принят к публикации / Accepted for publication 31.05.2024