

СТОРІНКА МОЛОДОГО ВЧЕНОГО

УДК: [621.59.004.59:597.554.3]:57.08

УДОСКОНАЛЕННЯ КРІОПРОТЕКТОРНОГО СЕРЕДОВИЩА ШЛЯХОМ МОДИФІКАЦІЇ ЙОГО КОФЕРМЕНТОМ ВІТАМІНУ В₁₂ ТА ПЛАЗМОЮ КРОВІ КАРАСЯ (*CARASSIUS AURATUS GIBELIO L.*)

Д. А. Сироватка, denyska1117@gmail.com, Інститут рибного господарства НААН,
м. Київ

Мета. Підвищити вихід живих сперматозоїдів білого амура (*Stenopharyngodon idella*) шляхом використання модифікованих кріопротекторних середовищ.

Методика. Дослідження базуються на теоретичних, експериментальних та лабораторних методах. Виконання їх здійснювалось у відповідності до загальноприйнятих методик кріобіології та селекції.

Результати. Проведеними дослідженнями встановлено негативний вплив на життєві показники дефростованої сперми. Так, при застосуванні стандартного середовища на основі етиленгліколю показник виходу живих спермій знижується у 1,8 рази у порівнянні з нативною спермою і становить 51,87±4,820%. При порівнянні різних кріопротекторів, найкращий результат одержано від середовища, модифікованого коферментом вітаміну В₁₂: при його застосуванні вихід живих сперматозоїдів зменшується у 1,3 рази в порівнянні з нативною спермою, та становить 66,00±7,111%. Малоєфективним виявилось середовище, яке було модифіковане плазмою крові карася: вихід живих спермій становив 58,67±3,721%.

Наукова новизна. Проведено аналіз впливу модифікації кріопротекторного середовища коферментом вітаміну В₁₂ та сироваткою зимової крові карася (*Carassius auratus gibelio L.*) на життєздатність дефростованої сперми білого амура.

Практична значимість. Результати роботи можуть бути використані з метою удосконалення технологічних процесів кріоконсервування сперми коропових риб.

Ключові слова. Кріоконсервування, білий амур, дефростація, сперма.

ПОСТАНОВКА ПРОБЛЕМИ ТА АНАЛІЗ ОСТАННІХ ДОСЛІДЖЕНЬ І ПУБЛІКАЦІЙ

На території України розташована значна кількість прісноводних водойм, які в значній мірі потерпають від надмірного заростання вищою водною рослинністю [1]. Для вирішення цієї проблеми доцільним є використання риб-біомеліораторів, що здатні поїдати вищу водну рослинність. Серед останніх добре себе зарекомендував білий амур (*Stenopharyngodon idella*) [2, 3]. Цей представник далекосхідного іхтіокомплексу має здатність накопичувати масу тіла за рахунок споживання макрофітів, що робить його ефективним біологічним знаряддям у боротьбі з заростанням водойм [4].

У 1954 році до України вперше було завезено білих амурів і протягом наступних років проводились роботи з інтродукції даного виду у водоймах України, а також виробниче впровадження його в вітчизняну аквакультуру [5, 6]. В останні роки однією з проблем у відтворенні риб-інтродуцентів, спільною для всіх видів далекосхідного комплексу, є ізолюваність їх від природного ареалу та тривале культивування за умов обмеженої кількості плідників в окремих ставових господарствах, що призвело до деградації генетичної структури стад внаслідок



інбредної депресії, і негативно віддзеркалилось на показниках темпу росту, виживання та продуктивних властивостях цих риб. Для запобігання вказаним явищам, а також з метою проведення селекційних робіт доцільно використовувати сучасний метод збереження генетичного матеріалу – кріоконсервування сперми. Цей метод досить широко застосовується у тваринництві для зберігання спадкового матеріалу елітних плідників цінних тварин, а також представників рідкісних та зникаючих видів: за його допомогою здійснюють покращення генетичної структури племінних стад.

ВИДІЛЕННЯ НЕВИРІШЕНИХ РАНІШЕ ЧАСТИН ЗАГАЛЬНОЇ ПРОБЛЕМИ. МЕТА РОБОТИ

В рибистві при застосуванні методу кріоконсервування статевих продуктів виникає ряд проблем, пов'язаних з високою варіабельністю якості дефростованих сперматозоїдів. Проте дана методика є достатньо ефективною для вирішення проблем запобігання проявам інбредної депресії в племінних стадах білого амура, оскільки завезення дорослих особин з ареалу поширення даного виду або транспортування сперми, заготовленої під час природного нерестового ходу плідників, є затратними та вимагають експертної ветеринарної та екологічної експертизи. Використання методу кріоконсервування дозволяє спростити транспортування спермодоз на великі відстані, а використання кріосховища дає змогу завчасно заготовляти і використовувати кріоконсервовану сперму від самців з унікальними генотипами і рибицькими показниками.

Практичне застосування методу кріоконсервування статевих продуктів білого амура розпочато порівняно недавно, а існуючі результати дефростації замороженої сперми демонструють невисоку якість отриманого матеріалу. Саме тому мета нашої роботи полягала у підвищенні виходу живих спермійв білого амура після проведення процедури дефростації. Для вирішення цього завдання здійснено ряд експериментів із модифікації кріопротекторного розчину різними кріозахисними компонентами.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

У дослідженнях, спрямованих на підвищення частки живих спермійв та тривалості їх рухливості в дефростованій спермі, використовували загальноприйнятні в рибистві та кріобіології методи. Експериментальна частина досліджень була розділена на два етапи. На першому етапі здійснили кріоконсервування сперми білого амура у відповідності до методичних рекомендацій Є. Ф. Копейки [11]. На другому етапі проводили модифікування кріопротекторного середовища з метою підвищення частки живих спермійв та тривалості їх рухливості в дефростованій спермі. Для цього кріопротекторний розчин модифікували шляхом використання двох малотоксичних речовин, які зменшують негативну токсичну дію кріозахисного середовища.

Перша – кофермент вітаміну В₁₂ – це органічна сполука небілкового походження, яка відноситься до продуктів трансформації вітамінів. При з'єднанні коферменту з білками утворюються ферменти – каталізатори біохімічних реакцій, які, в свою чергу лежать в основі фізіологічних функцій організму. Таким чином, ця низькотоксична сполука була використана як стимулятор активності спермійв у дефростованій спермі [7].

Друга – сироватка зимової крові карася (*Carassius auratus gibelio* L.). Як відомо, деякі пойкилотермні організми водного середовища мають пристосувальні



механізми, які дозволяють їм витримати дію низьких температур. У крові та тканинах риб виявлені сезонні білкові речовини, здатні контролювати утворення кристалів льоду в організмі. Саме тому в проведених нами дослідженнях було вирішено використати плазму крові карасів, які протягом періоду зимівлі піддавались дії низьких температур. Плазма використовувалась у кріопротекторному розчині як малотоксична кріозихистна сполука природного походження [9].

Оцінка якості сперми здійснювалась відповідно до методик, запропонованих Р. В. Козаковим [10]. З метою дослідження впливу методу кріоконсервування застосовували сучасну методику оцінки якості еякуляту з використанням комп'ютерної програми «ВідеоТест-Сперм 2.1», а також лічильної камери Маклера та оптичного мікроскопа «Zeiss Axiostar plus» з відеокамерою «JVC TK-C1480BE» [9]. Об'єм еякуляту визначали за допомогою піпет-дозатора «Erpendorf» з точністю до 0,1 см³. Для проведення кріоконсервування отриману сперму білого амура розділяли навпіл (контроль/дослід) та проводили експрес-оцінку рухливості сперматозоїдів в обох групах досліду. Дослідну сперму розбавляли у співвідношенні 1:3 (сперма : кріопротектор), при цьому досягали розрідження спермій на рівні $(1,0 - 2,5) \times 10^9$ клітин/мл. Розбавлену сперму піддавали заморожуванню за відпрацьованою нами методикою, відповідно до рекомендацій Є. Ф. Копейки [11].

Кріозахистні середовища готували за наступною рецептурою:

17 г трису – три(оксиметил)-амін етану – розчиняли в 1 л дистильованої води з титруванням HCl до pH 8. Для отримання 1 л середовища в 600 – 700 мл буферу розчиняли, за постійного перемішування, такі компоненти: 4,2 г NaCl, 0,06 г хлориду калію, 2,8 г NaHCO₃, 1,37 г сахарози, 0,62 MgSO₄ • 7 H₂O, 0,18 г CaCl₂ • 6 H₂O. За 30 хв. перед початком використання до основного розчину додавали 150 г свіжого жовтка курячого яйця і 180 г етиленгліколю. Об'єм всього розчину доводили до 1 л за допомогою трис – HCl буфера [10]. Модифікацію «базового» розчину проводили за допомогою кофермента вітаміну В₁₂ в кількості 0,3 мг/л або 10% об. плазми крові карася за pH 8. Вказані вище кількості модифікуючих розчинів підбирались експериментально. Перед початком роботи сперма і кріозахистні середовища охолоджувались до +6°C. Охолоджену сперму додавали до охолодженого до тієї ж температури кріозахистного середовища в об'ємному співвідношенні 1:1. Отримані суспензії залишали на еквілібрацію за температури + 6 °C на 30 хв. Отриману суспензію фасували в поліетиленові соломинки об'ємом 0,25 мл. В роботі був використаний наступний режим охолодження:

1) в температурному діапазоні від + 20°C до + 15°C швидкість охолодження складала 2-3°C /хв;

2) в температурному діапазоні від - 15°C до - 70°C швидкість охолодження складала 15°C /хв;

3) повільне занурення в рідкий азот.

Дефростацію проводили за температури водного середовища 35 °C та експозиції у водному середовищі 30 с. Отримані статеві клітини активували за допомогою ставової води.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У першій партії плідників, при використанні кріопротектора з етиленгліколем, середній показник виходу спермій у дефростованій спермі становив 51,87±4,820%, при цьому загальний час рухової активності їх становив



55,47±6,082 с, а поступальний рух – 36,73±5,361 с, що є задовільним результатом при використанні методу кріоконсервування коропових риб (табл. 1).

Таблиця 1. Дані життєздатності дефростованої сперми

№ ♂	Од. вим.	Вихід живих спермій, %		Загальний рух, с		Поступальний рух, с.		
I партія	191	M±m (n=3)	41,33±1,856		58,00±4,619		38,67±7,839	
	192	M±m (n=3)	66,00±1,155		62,33±3,930		45,00±3,464	
	193	M±m (n=3)	43,67±0,882		32,33±3,844		15,67±1,202	
	194	M±m (n=3)	48,00±4,041		67,67±1,202		43,33±2,082	
	195	M±m (n=3)	60,33±4,910		57,00±1,732		40,67±1,764	
	M ± m	(n=5)	51,87±4,820		55,47±6,082		36,73±5,361	
Б	—	10,78		13,60		11,99		
Cv, %	—	20,78		24,52		32,70		
		A*	B*	A*	B*	A*	B*	
II партія	196	M±m (n=3)	78,00± 2,000	60,33± 5,239	90,67± 1,202	61,33± 2,728	40,67± 4,177	43,67± 4,177
	197	M±m (n=3)	74,33± 3,283	63,67± 6,438	87,33± 1,453	62,00± 3,512	45,67± 5,364	45,67± 5,364
	198	M±m (n=3)	46,33± 6,839	44,00± 2,000	52,00± 2,082	40,33± 1,856	35,00± 2,517	35,00± 2,517
	199	M±m (n=3)	80,00± 1,732	63,67± 4,978	67,67± 1,453	48,33± 1,667	63,67± 4,978	42,67± 1,202
	200	M±m (n=3)	51,33± 4,910	61,67± 1,667	73,33± 1,764	38,67± 2,404	61,67± 1,667	32,67± 1,856
	M ± m	(n=5)	66,00± 7,111	58,67± 3,721	74,20± 7,000	50,13± 4,985	58,67± 3,721	39,93± 2,563
	Б	—	15,90	8,32	15,65	11,15	8,32	5,73
Cv, %	—	24,90	14,18	21,09	22,23	14,18	14,35	

A* - кріопротектор модифікований коферментом вітаміну B₁₂, B* - кріопротектор, модифікований плазмою крові карася

З метою підвищення виходу живих дефростованих спермій та покращення результатів рухової активності на другому етапі досліджень використано два кріопротекторних розчини, модифікованих різними сполуками (група А – кофермент вітаміну B₁₂ та група В – сироватка зимової крові карася (*Carassius auratus gibelio* L.)). При порівнянні отриманих результатів другого етапу досліджень кращий результат за показником виходу живих дефростованих сперматозоїдів зафіксований при використанні кріопротектора групи А – цей показник становив 66,00±7,111% (t_d = 1,94, P ≤ 0,95). При порівнянні середніх показників часу рухової активності кращий результат також був зафіксований при використанні кріопротектора групи А. При цьому загальний час становив 74,20±7,000 с (t_d = 1,77, P ≤ 0,95), прямолінійно-поступальний 58,67±3,721 с (t_d = 2,62, P ≤ 0,95; див. табл. 1). За результатами проведених досліджень обох етапів (рис. 1), кращий результат за показником виходу живих спермій у дефростованій спермі був зафіксований при використанні кріопротекторного розчину, модифікованого коферментом вітаміну B₁₂. Так, застосування даного кріопротекторного розчину, модифікованого коферментом вітаміну B₁₂,



знижувало вихід живих спермійв дефростованої сперми у порівнянні з нативною всього в 1,3 рази. В той час як застосування стандартного кріопротекторного розчину з етиленгліколем знижує співвідношення живих спермійв в нативній і дефростованій спермі в 1,8 рази, а кріопротектор, модифікований плазмою крові карася, відповідно, в 2 рази.

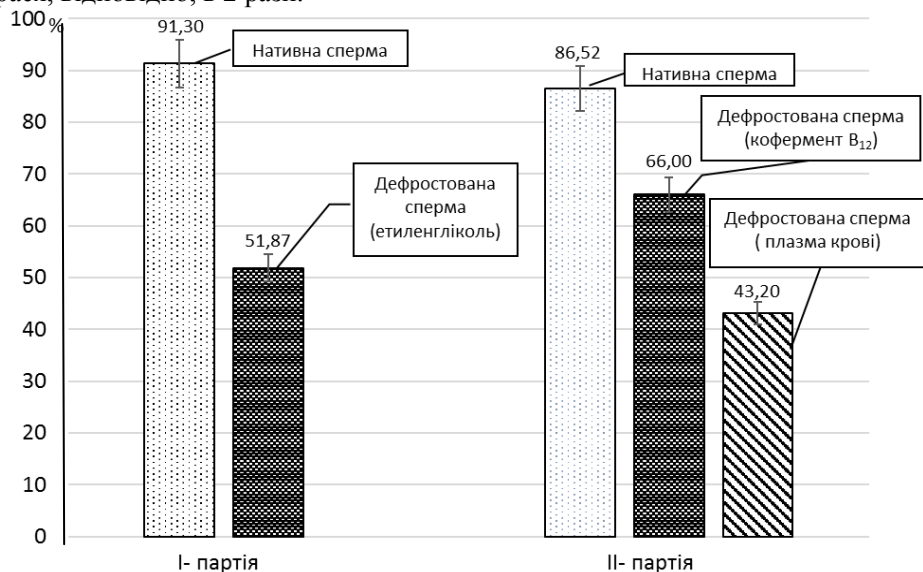


Рис. 1. Відсоток живих спермійв у нативній та дефростованій спермі, за умови застосування стандартного та модифікованих кріопротекторних розчинів

За результатами порівняння загального часу рухової активності дефростованих сперматозоїдів, найкращий результат отримано при застосуванні кріопротекторного розчину, модифікованого коферментом вітаміну В₁₂ (рис. 2).

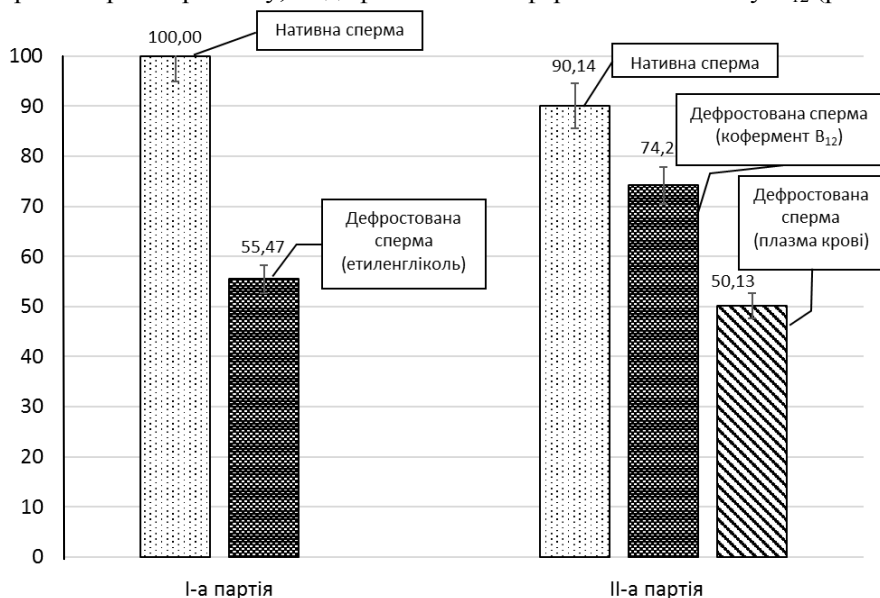
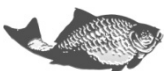


Рис. 2. Показники загального часу рухової активності в контрольній та дослідній групах



Середній показник загального часу рухливості сперматозоїдів у цьому варіанті становив $74,20 \pm 7,000$ с. Значно нижчі результати отримані при використанні стандартного кріопротектора ($55,47 \pm 6,082$ с) та модифікованого плазмою крові карася ($58,67 \pm 3,721$ с).

При проведенні порівняння отриманих даних прямолінійно-поступального руху найкращий результат досягнуто при використанні кріопротектора, до складу якого входив кофермент вітаміну В₁₂: цей показник становив $58,67 \pm 3,721$ с, що є лише в 1,1 рази гіршим, ніж час поступального руху сперматозоїдів у нативній спермі ($70,30 \pm 7,509$ с; рис. 3). Середні показники прямолінійного руху двох інших дослідних груп знаходились в межах від $36,73 \pm 5,361$ с до $39,93 \pm 2,563$ с.

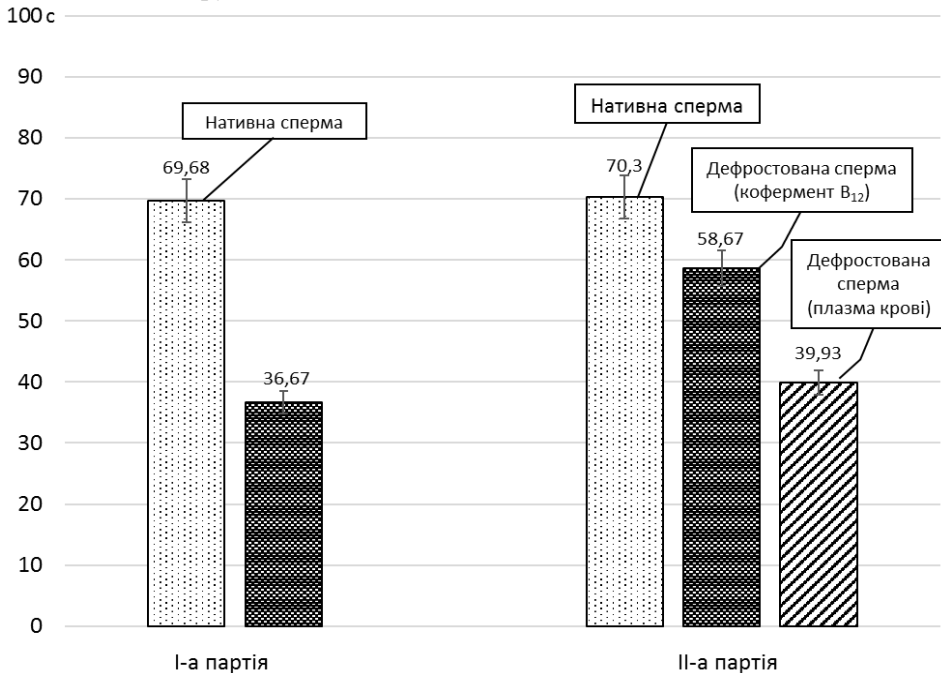


Рис. 3. Тривалість прямолінійно-поступального руху спермій контрольної і дослідної груп, с

ВИСНОВКИ ТА ПЕРСПЕКТИВИ ПОДАЛЬШОГО РОЗВИТКУ

Кріоконсервування сперми білого амура достовірно знижує вихід живих спермій та час їх рухової активності у дефростованій спермі. Однак використання кріопротекторного розчину, модифікованого коферментом вітаміну В₁₂, підвищує показники виходу спермій після дефростації, а також збільшує час їх рухової активності в порівнянні як зі стандартним кріопротекторним розчином (етиленгліколь), так і з розчином, модифікованим плазмою крові карася зимового періоду.

ЛІТЕРАТУРА

1. Балтаджи Р. А. Использование белого амура для мелиорации водоемов как объекта спортивного рыболовства / Р. А. Балтаджи // Рыбогосподарська наука України. — 2009. — № 2. — С 76—81.
2. Никольский Г. В. Основные биологические особенности белого амура и толстолобиков и их акклиматизация в водоемах страны / Г. В. Никольский,



- Б. В. Веригин // Растительная рыба. — М. : Пищевая промышленность, 1966. — С. 30—40.
3. Кончиц В. В. Белый амур обретает новую родину / В. В. Кончиц, В. С. Дашкевич // Белорусское рыбное хозяйство. — 2003. — № 2. — С. 19—20.
 4. Чарьев Р. Опыт использования белого амура для борьбы с зарастанием прудов при выращивании сазана / Р. Чарьев, Д. С. Алиев // Рыбохозяйственное освоение растительных рыб. — М. : Наука, 1966. — С. 77—82.
 5. Вовк П. С. Биология дальневосточных растительных рыб и их хозяйственное использование в водоемах Украины / Вовк П. С. — К. : Наукова думка, 1976. — 248 с.
 6. Бабаян К. Е. Новый этап в разведении растительных рыб / К. Е. Бабаян // Растительная рыба. — М. : Пищевая промышленность, 1966. — С. 3—13.
 7. Wpływ kobamamidu w płynie kriochronnym zamrażanego nasienia na wyniki odchowu narybku karpia (*Cyprinus carpio*) / W. Czerepnin, I. Gryciniak, W. Bech [et al.] // Wiadomości Zootechniczne. — 2012. — Vol. 274, № 3. — S. 61—64.
 8. Применение плазмы крови серебряного карася (*Carassius auratus gibelio*) при криоконсервации спермы аборигенных видов рыб / В. А. Черепнин, И. И. Грициняк, А. Л. Безусый [и др.] // Животный мир Казахстана и сопредельных территорий : Междунар. науч. конф. : мат. — Алматы, 2012. — С. 331.
 9. Тихомиров А. М. Критерии оценки качества спермы рыб при криоконсервации / А. М. Тихомиров // Актуальные проблемы биологии воспроизводства животных : Междунар. науч.-практ. конф. : мат. — [Б. М.] : Всерос. гос. науч.-исслед. ин-т животноводства, 2007. — С. 124—126.
 10. Казаков Р. В. Определения качества половых продуктов самцов рыб (методические указания) / Казаков Р. В. — Л. : ГосНИОРХ, 1978. — 15 с.
 11. Копейка Е. Ф. Инструкция по низкотемпературному консервированию спермы карпа / Копейка Е. Ф. — М. : ВНИИПРХ, 1986. — 11 с.

REFERENCES

1. Baltadzhi, R. A. (2009). Ispol'zovanie belogo amura dlya melioratsii vodoemov kak ob'ekta sportivnogo rybolovstva. *Rybohospodarska nauka Ukrainy*, 2, 76-81.
2. Nikol'skiy, G. V., & Verigin, B. V. (1966). Osnovnye biologicheskie osobennosti belogo amura i tolstolobikov i ikh akklimatizatsiya v vodoemakh strany. *Rastitel'noyadnye ryby*. Moskva: Pishchevaya promyshlennost', 30-40.
3. Konchits, V. V., & Dashkevich, V. S. (2003). Belyy amur obretayet novuyu roдину. *Belorusskoe rybnoe khoz-vo*, 2, 19-20.
4. Charyev, R., & Aliev, D. S. (1966). Opyt ispol'zovaniya belogo amura dlya bor'by s zarastaniem prudov pri vyrashchivaniі sazana. *Rybokhozyaystvennoe osvoenie rastitel'noyadnykh ryb*. Moskva: Nauka, 77-82.
5. Vovk, P. S. (1976). *Biologiya dal'nevostochnykh rastitel'noyadnykh ryb i ikh khozyaystvennoe ispol'zovanie v vodoemakh Ukrainy*. Kiev: Naukova dumka.
6. Babayan, K. E. (1966). Novyy etap v razvedenii rastitel'noyadnykh ryb. *Rastitel'noyadnye ryby*. Moskva: Pishchevaya promyshlennost', 3-13.
7. Czerepnin, W., Gryciniak, I., Bech, W., Bezusyj, A., & Syrowatka, D. (2012). Wpływ kobamamidu w płynie kriochronnym zamrażanego nasienia na wyniki



- odchowu narybku karpia (*Cyprinus carpio*). *Wiadomości Zootechniczne*, 274(3), 61-64.
8. Cherepnin, V. A., Gritsynyak, I. I., Bezusyy, A. L., & Bech, V. V. (2012). Primenenie plazmy krovi serebryanogo karasya (*Carassius auratus gibelio*) pri kriokonservatsii spermy aborigennykh vidov ryb. *Zhivotnyy mir Kazakhstana i sopedel'nykh territoriy: Mezhdunar. nauch. konf.* Almaty, 331.
 9. Tikhomirov, A. M. (2007). Kriterii otsenki kachestva spermy ryb pri kriokonservatsii. *Aktual'nye problemy biologii vosпроизводства zhivotnykh: Mezhdunar. nauch.-prakt. konf.* Vseros. gos. nauch.-issled. in-t zhivotnovodstva, 124-126.
 10. Kazakov, R. V. (1978). *Opredeleniya kachestva polovykh produktov samcov ryb (metodicheskie ukazaniya)*. Leningrad: GosNIORH, 15.
 11. Kopeyka, E. F. (1986). *Instruktsiya po nizkotemperaturnomu konservirovaniyu spermy karpa*. Moskva: VNIIPRKh, 11.

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ КРИОПРОТЕКТОРНОЙ СРЕДЫ ПУТЕМ МОДИФИКАЦИИ КОФЕРМЕНТОМ ВИТАМИНА В₁₂ И ПЛАЗМОЙ КРОВИ КАРАСЯ (*Carassius auratus gibelio* L.)

Д. А. Сыроватка, denyska1117@gmail.com, Институт рыбного хозяйства НААН,
г. Киев

Цель. Повысить выход живых сперматозоидов белого амура (*Ctenopharyngodon idella*) при использовании модифицированных криопротекторных сред.

Методика. Исследования базируются на теоретических, экспериментальных и лабораторных методах. Выполнение их осуществлялось в соответствии с общепринятыми методиками криобиологии и селекции.

Результаты. Проведёнными исследованиями установлено негативное влияние замораживания на жизненные показатели дефростированной спермы. При применении стандартной среды, изготовленной на основе этиленгликоля, показатель выхода живых спермиев снизился в 1,8 раза по сравнению с нативной спермой, и составил 51,87±4,820%. При сравнении разных криопротекторных сред наилучший результат получен при использовании среды, модифицированной коферментом витамина В₁₂. Выход живых сперматозоидов при использовании этой среды уменьшается в 1,3 раза в сравнении с нативной спермой, составляя 66,00±7,111%. Малоэффективной оказалась среда, которая была модифицирована плазмой крови карася: выход живых спермиев составлял всего 58,67±3,721%.

Научная новизна. Проведён анализ влияния модификации криопротекторной среды коферментом витамина В₁₂ и сывороткой зимней крови карася (*Carassius auratus gibelio* L.) на жизнеспособность дефростированной спермы белого амура.

Практическая значимость. Результаты работы могут быть использованы с целью совершенствования технологических процессов криоконсервирования спермы карповых рыб.

Ключевые слова: криоконсервирование, белый амур, дефростация, сперма.

IMPROVEMENT OF CRYOPROTECTIVE MEDIUM BY MODIFYING IT WITH THE COENZYME OF VITAMIN B₁₂ AND PLASMA OF GIBEL CARP (*Carassius auratus gibelio* L.)

D. Syrovatka, denyska1117@gmail.com, Institute of Fisheries NAAS, Kyiv

Purpose. To increase the percent of the output of the alive spermatozooids of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) with the use of modified cryoprotective media.



Methodology. Researches are based on theoretical, experimental and laboratory methods. Implementation of them came true in accordance with the generally accepted methodologies of cryobiology and selection.

Findings. On results undertaken studies negative influence is set on the vital indexes of thawing sperm. At application of standard environment that is made with the use of ethylene glycol middle index to the percent of living unfrozen sperm goes down in 1,8 times, in comparing to native sperm and presents $51,87 \pm 4,820$.

To increase the percentage of live sperm output, after cryopreservation procedures we modified the "basic" kioprotektor coenzyme B₁₂ and gibel carp plasma (*Carassius auratus gibelio L.*). The vitamin B₁₂ coenzyme was used as a stimulator of vital parameters defrosted sperm. Plasma of blood the gibel carp (*Carassius of auratus gibelio L.*) which was subjected to low temperatures, was used as low-toxic connection that is cryoprotective characteristics.

At comparison of different cryoprotectants environments preparation with the use of ethylene glycol, coferment of vitamin of B₁₂ and plasma of blood of the *Carassius auratus gibelio L.*, the best result was shown by an environment modified by the coferment of vitamin of B₁₂. Application of this environment diminishes the percent of living spermatozoa in 1,3 times as compared to native sperm. The percent of living sperm in this variant of experiment presented $66,00 \pm 7,111$. A cryoprotectants environment appeared ineffective plasma of blood of the European carp entered in the complement of that, the middle index of percent of living spermatozoa in this variant presented $58,67 \pm 3,721$. Thus found that the use cryoprotective solution modified coenzyme B₁₂ to get the optimal result.

Originality. Conducted analysis of influence of modification of cryoprotectants environment by the coferment of vitamin of B₁₂ and serum of winter blood of the *Carassius auratus gibelio L.* on viability of the unfrozen sperm of grass carp.

Practical Value. Job performances can be used with the aim of perfection of technological processes that depend with cryopreserved sperm of carp types fishes. Also, the got results will help scientists that work with cryopreserved sperm in development of new high-efficiency cryoprotected environments.

Keywords: cryopreservation, grass carp, defrosting, sperm.

