

Ribogospod. nauka Ukr., 2016; 3(37): 88-98
DOI: <http://dx.doi.org/10.15407/fsu2016.03.088>
УДК 639.3.034.2

ПРОЯВ ЕФЕКТУ КРІОСЕЛЕКЦІЇ У НАЩАДКІВ КОРОПА, ОТРИМАНИХ ВІД ДЕФРОСТОВАНОЇ СУСПЕНЗІЇ СПЕРМИ З МОДИФІКОВАНИМИ КРІОЗАХИСНИМИ РОЗЧИНАМИ

В. О. Черепнін, diglador@ukr.net, Інститут рибного господарства НААН, м. Київ

Мета. Метою дослідження була оцінка ефекту кріоселекції сперматозоїдів різновікових груп коропа в залежності від якості розмороженої сперми після модифікації композитного кріозахисного середовища, що застосовувалось для розбавлення нативної сперми перед заморожуванням.

Методика. Як модифікатори стандартного кріозахисного середовища у дослідженні використовувались: кофермент вітаміну B₁₂ (кобамамід), плазма крові карася (*Carassius gibelio*), який пройшов природну холодову аклімацію, пурифікований протеїн-антифриз tmAFP, виділений з личинок великого борошняного хрущака (*Tenebrio molitor*), який теж пройшов природну холодову аклімацію.

Результати. В результаті проведеного дослідження було встановлено, що якісні та кількісні характеристики дефростованої сперми, результати інкубування, підрощування ембріонів і личинок нивківського лускатого коропа (НЛК), а також рибницькі показники отриманих цьоголіток залежали від складу кріозахисного середовища. Найкращі показники були виявлені у дослідних груп, отриманих з використанням кріозахисного розчину з додаванням пурифікованого протеїну-антифризу tmAFP.

Личинки, отримані з використанням сперми, кріоконсервованої з додаванням до кріозахисного розчину TmAFP, мали кращу опірність до зневоднення, перевершуючи за цим показником дослідні групи, отримані з використанням таких модифікаторів, як плазма крові карася і кобамамід.

Спостерігається консолідованість у дії споріднених екзоцелюлярних кріопротекторів, які були виділені зі стійких до холоду організмів, і які виявили кращі рибницькі показники при вирощуванні отриманих за їх допомогою коропів.

Прояв кріоселективного ефекту залежить від цілісності спадкового матеріалу сперматозоїда і не залежить від впливу наднизьких температур на клітинні мембрани.

Наукова новизна. Вперше були проведені експерименти з використанням як екзоцелюлярних кріопротекторів плазми крові карася і протеїну-антифризу tmAFP.

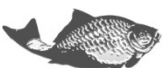
Практична значимість. Розглянуті в представлені роботі модифікації композитних кріозахисних розчинів за допомогою екзоцелюлярних кріопротекторів і кобамамиду можна рекомендувати для кріоконсервування сперми коропа з метою створення кріобанків генетичних ресурсів риб, а також їх масового відтворення.

Ключові слова: короп, сперма, кріозахисне середовище, кріоселекція, tmAFP, плазма крові карася, кобамамід.

ПОСТАНОВКА ПРОБЛЕМИ ТА АНАЛІЗ ОСТАННІХ ДОСЛІДЖЕНЬ І ПУБЛІКАЦІЙ

Потреба у кріоконсервуванні сперми риб зумовлюється низкою причин. По-перше, щорічний відбір плідників господарсько цінних, рідкісних і зникаючих видів риб для використання в штучному відтворенні зумовлює невизначеність щодо очікуваної кількості риб кожного виду, породи або типу, їх рибницької якості, стадії зрілості статевих продуктів тощо.

© В. О. Черепнін, 2016



По-друге, стислі терміни проведення нерестової кампанії найчастіше призводять до використання в процесі відтворення лише малої частки наявних у господарстві елітних плідників. Негативний вплив цього чинника позначається при селекційних роботах та відтворенні високопродуктивних стад риб, які повинні відповідати стандартам тієї чи іншої породи.

По-третє, збереження генофонду господарсько цінних, рідкісних та зникаючих видів риб можна проводити тільки двома шляхами: створенням колекційних стад і зберігання їх сперми в кріобанку.

По-четверте, проблема інбредного виродження, пов'язана з багаторічним відтворенням плідників «у собі», вимагає для свого вирішення привнесення «свіжої крові». У ряді випадків ця проблема ускладнена тим, що стада риб відповідних порід і видів у господарствах даного регіону в тій чи іншій мірі споріднені з вихідним стадом, тому завозити плідників для товарного, і тим більше племінного відтворення, має сенс тільки здалеку, що, природно, пов'язано з чималими витратами, а також неминучим ризиком втрати плідників в процесі транспортування та адаптації до нових умов. Більш ефективно це завдання може бути вирішене шляхом застосування замороженої сперми відповідних видів і порід риб.

Кріоконсервування сперми дозволяє завчасно заготовлювати, використовувати і проводити планову ротацію цінного генетичного матеріалу. Це дозволяє практично реалізувати роботи з підтримки генетичного різноманіття іхтіофауни в природних водоймах, відновлення популяцій цінних і зникаючих видів риб, полегшує запобігання інбредній депресії, спрощує отримання промислових гетерозисних помісей, полегшує транспортування генетичного матеріалу.

Базові кріозахисні середовища, застосування яких дозволяє заморожувати сперму і вдосконалювати методики кріоконсервування статевих продуктів прісноводних риб, зокрема корошових, розроблені вже досить давно [1]. Для прісноводних і прохідних видів, що нерестяться в прісних водах, використовують середовища, близькі за кількісним і якісним складом до плазми крові або сперми. Зазвичай, до складу таких середовищ входять неорганічні солі, цукри, фосфоліпіди і ліпопротеїни, які поєднуються в буферному розчині [2].

Однак, не завжди вдається досягти прийнятної рівня виживання дефростованих сперматозоїдів, і результати бувають часто невідтворювані при використанні сперми від плідників одного виду, отриманих з різних водойм. Це пов'язано з тим, що якісні та кількісні показники нативної сперми залежать від комплексного впливу на плідників абіотичних, біотичних і антропогенних чинників довкілля, які варіюють в досить широких межах від водойми до водойми.

Але специфічні проблеми існують і в справі кріоконсервування сперми прісноводних і напівпрісних видів риб. При вивченні розмороженої сперми за допомогою світлової і електронної мікроскопії визначаються аглютинація спермій, руйнація мембран сперматозоїдів, мітохондріальні і акросомальні пошкодження, втрата структур, які зумовлюють рухову активність, пошкодження хвоста сперматозоїдів, а також інші морфологічні зміни [3–5].

У той же час, в процесі кріоконсервування з використанням як загально-прийнятих, так і модифікованих кріозахисних середовищ відбувається вибіркова кріоселекція сперматозоїдів у відношенні носіїв певних генотипів [6]. Загибель або інактивізація певної частки сперматозоїдів дозволяє зробити припущення про



існування відбору на користь певних ізоферментів на фоні біохімічної адаптації до мінливих умов навколишнього середовища [7]. Існування селективності генотипів при заморожуванні/розморожуванні підтверджується даними ряду дослідників, які використовували розморожену сперму для відтворення у рибицтві [8]. Також залишається відкритим питання про те, якою мірою модифікація кріозахисних середовищ з метою покращення якісно-кількісних характеристик розмороженої сперми може здійснювати вплив на ймовірність прояву тих чи інших генетично зумовлених варіантів фенотипу. Вивчення селекційного впливу заморожування на сперму риб, так само як і визначення можливого спрямування такого впливу, вкрай важливе для отримання племінного матеріалу риб з високими господарськими характеристиками.

ВИДІЛЕННЯ НЕВИРІШЕНИХ РАНІШЕ ЧАСТИН ЗАГАЛЬНОЇ ПРОБЛЕМИ. МЕТА РОБОТИ

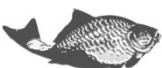
Хоча кріобіологія за останні 65 років дала певну кількість добре відпрацьованих технологій для кріоконсервування, досі не існує повної ясності щодо збереження генетичної цілісності репродуктивних клітин. Критерії якості потомства, отриманого від кріоконсервованих статевих клітин, залишаються незмінними — відсутність фенодевіацій та новоутворень при народженні і фертильність. У контрасті з більшістю соматичних клітин, у спермі відсутня ефективна репараційна система. Вважається, що генетичні ушкодження, індуковані в ДНК сперми при впливі мутагенних чинників, можуть бути відновлені в запліднених яйцеклітинах в період між потраплянням сперматозоїда в цитоплазму яйцеклітини і початком наступної S-фази. Для вивчення механізму цього явища використовують штучно викликане блокування репаруючої системи ферментів полі(АДФ-рибоза)-полімерази (PARP) [12].

Враховуючи вищесказане, метою роботи було дослідження впливу пошкоджувальних чинників на коропів в ранній стадії онтогенезу, отриманих від дефростованої сперми, замороженої з використанням кріозахисних розчинів різного складу.

Теоретичною передумовою проведеного дослідження слугувало припущення про збільшення рівня виживання розморожених сперматозоїдів, зменшується усереднений показник терморезистентності ембріонів (отриманих від них і нативної ікри), які знаходяться на критичних стадіях розвитку [9], що є доказом прояву кріоселективного ефекту.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Ембріони на одній з критичних стадій розвитку (стадія закладки органів) були піддані різкому впливу високої сублетальної температури і високотоксичної для риб хімічної сполуки. Для отримання води заданої температури був використаний термостат типу ТС-80. Для цього ікру коропа на чашках Петрі швидко переносили з водного середовища з температурою 20°C в ексикатори з температурою води 40°C, або з розчином пестициду хлордану ($C_{10}H_6Cl_8$) з концентрацією 10 мг/л, і після 60-секундної експозиції повертали в акваріуми з початковою температурою. Підрошування передличинок проводилось в акваріумах. Після переходу на зовнішнє живлення годівля личинок проводилась живими інфузоріями. Концентрація кисню у воді становила 5,5–6,5 мг O_2 /дм 3 .



Показники якості води знаходилися в межах ГДК для ставової води. Результати, отримані під час інкубування ікри, представлені в таблиці 2.

Також для визначення ефекту кріоселекції у дослідних групах коропів, отриманих від суспензії сперми і композитних кріозахисних розчинів, до складу яких входили кріопротектори різного походження, була використана методика оцінки порівнюваних груп риб за стійкістю до впливу зневоднення як стресового чинника в личинковому віці. Матеріалом для експерименту також слугували личинки нивківського лускатого коропа на етапі переходу до активного плавання, отримані з використанням дефростованої суспензії сперми і композитних кріозахисних розчинів, до складу яких входили кобамамід, плазма крові карася і пурифікований глікопротеїн-антифриз TmAFP великого борошняного хрущака *Tenebrio molitor*. Для визначення залежності між виживання личинок при зневодненні і продуктивністю цьоголіток в залежності від використання як модифікатора стандартного кріозахисного розчину екзоцелюлярних кріопротекторів TmAFP і плазми крові карася, а також кобамамиду, був використаний метод канонічного аналізу, який дозволяє одночасно досліджувати кілька різних груп змінних, що оцінюють одні й ті ж об'єкти.

Для штучного блокування репаруючої системи ферментів полі(АДФ-рибоза)-полімерази (PARP) було використано 3-амінобензамід, як інгібітор PARP, яким оброблялась частина заплідненої дефростованою спермою ікри коропів. Частина ікри запліднювалась дефростованою спермою за стандартною процедурою, без спеціального оброблення. Позаяк незапліднена партеногенетична ікра припиняє свій розвиток ще до настання стадії гастрული і добре розпізнається візуально, було досить просто визначити ікринки з пошкодженнями ДНК методом простого підрахунку і порівняння з розвитком ікри у контрольній групі. Після осіменіння дефростованою суспензією сперми з композитними кріозахисними розчинами, які мали у своєму складі кобамамід, плазму крові карася або пурифікований білок-антифриз tmAFP, дослідні ембріони були оброблені через 3 хв. 10 мл 10 mM розчину 3-амінобензидину. Ікринки з пошкодженнями ДНК визначали в процесі розвитку методом простого підрахунку і порівняння з розвитком ікри у контрольній групі [12].

Кожен експеримент проводили з триразовою повторністю. Для порівняння контрольних і дослідних показників використовували непараметричний аналіз, проводячи обчислення W-критерію (Вайта) для виявлення істотних відмінностей між експериментальними групами ($p < 0,05$).

Для відбору сперми використовували трьох шестирічних самців нивківського лускатого коропа (НЛК) індивідуальною масою 5,3–6,5 кг. За 14 днів до початку робіт (друга декада травня) в окремий став відсаджували відібраних плідників коропа, годівля яких проводилась комбікормом із вмістом повноцінного протеїну не менш ніж 20%. Стимулювання самців проводилося препаратом ацетонованих гіпофізів ляща і сазана, з розрахунку 0,3 мг на 1 кг маси тіла риб. Сперма відбиралася через 8 годин після ін'єкції гіпофізу.

Об'єм еякуляту визначали за допомогою піпет-дозатора «Eppendorf» з точністю до 0,1 см³, якість сперми — з використанням оптичного мікроскопа «Zeiss Axiostar plus» з фазовоконтрастним об'єктивом 20x/0.40, відеокамерою «JVC ТК-С1480ВЕ», рахувальною камерою Маклера з програмним забезпеченням «Відео Тест Сперм 2.1».



Замороженню піддавалась сперма, в якій знаходилось не менше ніж 60% сперматозоїдів, що рухались прямолінійно-поступально.

Використання програми «Відео Тест Сперм 2.1» для проведення комп'ютерного аналізу еякуляту (CASA) дозволило отримати високу точність вимірювань і достовірні дані щодо рухливості і морфологічних критеріїв сперматозоїдів.

Кріоконсервування сперми коропа проводили за методикою кріоконсервування сперми коропових риб, яка передбачає модифікацію стандартного кріозахисного середовища біологічно активними речовинами. З цією метою до складу стандартного кріозахисного розчину [1] було введено пурифікований глікопротеїн-антифриз TmAFP у кількості 20 мкг/мл, отриманий з личинок великого борошняного хрущака (*Tenebrio molitor*) [10], і плазму крові сріблястого карася (*Carassius gibelio*) в кількості 10% заг./об., які пройшли холодову аклімацію [11]. Також, як біологічно активну домішку в одному з варіантів експерименту використовували кобамамід в кількості 0,5 мг/мл. Для заморожування, дефростації, активації спермів і осіменіння використовувався стандартний протокол [1].

Вихідним матеріалом для експерименту слугувала ікра шестирічних самок НЛК. Відібрана ікра поділялася на кілька частин, одна з яких запліднювалася нативною спермою, а для запліднення інших порцій використовувалася дефростована сперма. Для проведення експериментів ікра коропа, запліднена нативною і дефростованою спермою, в кількості 100 шт. рівномірно наносилася на дно чашок Петрі, які потім занурювалися в акваріуми з активною аерацією води для інкубування. Розвиток ікри контролювався за допомогою бінокулярного препарувального мікроскопа МБС-1.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

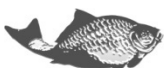
В результаті проведеної роботи були отримані наступні дані:

Таблиця 1. Характеристика дефростированої сперми коропів, отриманої з використанням стандартного і модифікованого tmAFP кріозахисного середовища

Показник	Експериментальна група	
Відносна кількість живих сперматозоїдів, %	Стандартний розчин	60,44±1,24
	TmAFP	96,80±1,21
Тривалість активного поступального руху сперматозоїдів, с	Стандартний розчин	148,10±0,99
	TmAFP	150,19±0,81

Примітка. Відмінності між показниками нативної і дефростованої сперми статистично достовірні ($p < 0,05$). Було проведено по п'ять спостережень за характеристиками активованої сперми кожної групи.

З наведених у таблиці 1 даних випливає, що за використання кріозахисного розчину, модифікованого протеїном-антифризом TmAFP, виживання сперматозоїдів було на 36,3% вищим, ніж за використання розчину, виготовленого за стандартною рецептурою. За тривалістю активного поступального руху сперматозоїди цих двох груп майже не відрізнялись.



Таблиця 2. Вихід вільноплаваючих ембріонів від закладеної на інкубування ікри, яка розвивалась після впливу пошкоджуючих чинників, і личинок після 14-добового підрощування (%)

n=100 для кожної групи	Стандартний кріозахисний розчин			Кріозахисний розчин, модифікований TmAFP			Ембріони, отримані від нативної сперми		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Термошок	85	78	7	82	68	14	70	51	19
Хлордан		74	11		64	18		55	15
Підрощування	87			80			71		

Примітка. 1 — вихід ембріонів без впливу пошкоджувальних чинників; 2 — вихід ембріонів після впливу пошкоджувальних чинників; 3 — різниця між колонками 1 і 2.

Аналізуючи приведені у таблиці 2 дані, можна зробити висновок про те, що вихід живих ембріонів, отриманих з використанням розмороженої сперми, був очікувано нижчим, ніж у контролі з нативною спермою. При цьому звертає увагу на себе той факт, що показники виходу живих ембріонів в дослідних групах (дефростована сперма) менше відрізнялися від таких варіантів із застосуванням пошкоджувальних чинників і без них.

Звідси випливає висновок, що загальне зниження виходу живих ембріонів дослідних партій є, насамперед, наслідком заморожування/розморожування сперми (з різними варіантами складу кріозахисного середовища), а не впливу низької температури. При цьому ікра, що розвивається після запліднення сперміями, які вижили після дефростації, менш схильна до дії пошкоджувальних чинників. Таким чином, в наведеній вище таблиці цифри в кожній третій колонці (виділені напівжирним шрифтом) можуть слугувати критерієм для оцінки ефекту кріоселекції. Даний ефект тим більше виражений, чим меншими будуть показники в третій колонці. Найбільший селекційний ефект можна отримати в разі застосування стандартного кріозахисного середовища. Результати підрощення личинок до 14-добового віку вказують на те, що коропи, отримані з використанням як стандартного протоколу кріоконсервування, так і модифікованого кріозахисного розчину, за рівнем виживання перевершують контрольну групу на 16 і 9% відповідно.

За результатами досліджень визначення стійкості до зневоднення, наведених у таблиці 3, можна зробити висновки про те, що личинки, отримані від сперми, кріоконсервованої з додаванням до кріозахисного розчину TmAFP, мали кращу опірність до зневоднення, перевершуючи за цим показником дослідні групи, отримані з модифікаторами плазми крові карася і кобамамиду на 17,50 і 4,44% відповідно. За середньою масою вони перевершили дві інші групи на 5,1 і 4,3 г відповідно. За виживанням ці цьоголітки випередили відповідні групи на 4,4 і 1,9%. За рибопродуктивністю група, отримана від сперми, консервованої кріозахисним розчином, з додаванням кобамамиду, випередила відповідні дослідні групи на 39 і 32% відповідно. Таким чином, дослідні групи проявили кріоселекційний ефект за комплексом ознак [13].



Таблиця 3. Рибицькі показники цьоголіток НЛК, відібраних за стійкістю до зневоднення

Модифікатори криозахисного розчину	Вживання личинок при зневодненні, %	Середня маса цьоголіток, г	Вживання цьоголіток, %	Продуктивність цьоголіток, кг/га
TmAFP	52,64±11,7	40,42±0,3	62,50±3,4	778,97±44,2
Кобамамід	47,56±5,2	36,08±0,9	60,61±2,5	592,38±41,5
Плазма крові карася	35,11±6,9	35,30±0,5	58,05±5,1	560,45±74,2

Примітка. Для порівняння контрольних і дослідних показників використовували непараметричний аналіз, шляхом обчислення W-критерію (Вайта) для виявлення істотних відмінностей між експериментальними групами ($p < 0,05$).

Канонічний аналіз виявив залежність між рівнем виживання личинок при зневодненні і продуктивністю цьоголіток в залежності від використання як модифікатора стандартного криозахисного розчину екзоцелюлярних криопротекторів TmAFP і плазми крові карася, а також кобамамиду (рис. 1). Спостерігається консолідованість у впливі споріднених екзоцелюлярних криопротекторів, які були виділені зі стійких до холоду організмів, та показали кращі рибицькі показники при вирощуванні отриманих з їх допомогою коропів.

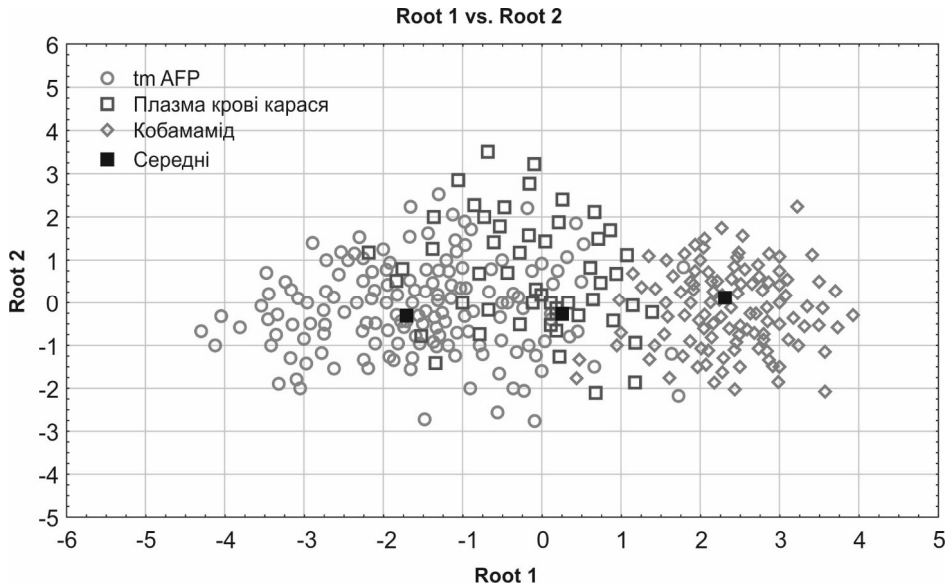
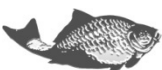


Рис. 1. Залежність між виживанням личинок при зневодненні і продуктивністю цьоголіток при використанні екзоцелюлярних криопротекторів TmAFP і плазми крові карася, а також кобамамиду

Аналізуючи дані з таблиці 4, отримані після вивчення впливу 3-амінобензидину на ембріони, можна зробити висновки про те, що кращі криозахисні властивості має білок-антифриз TmAFP, який забезпечив виживання 85% ембріонів, підданих блокуванню репаруючої системи ферментів PARP. Найнижчі показники продемонстрував стандартний криозахисний розчин — 55%, що пояснюється властивостями його екзоцелюлярного криопротектора.



Для порівняння контрольних і дослідних показників використовували непараметричний аналіз, шляхом обчислення W-критерію (Вайта) для виявлення істотних відмінностей між експериментальними групами ($p < 0,05$).

Таблиця 4. Вихід вільноплаваючих ембріонів (%) від закладеної на інкубування ікри, яка розвивалась після впливу 3-амінобензидину (3-АВ)

Живі личинки, %	Кріозахисний розчин з TmAFP	87±1,20
	Кріозахисний розчин з TmAFP + 3-АВ	85±0,98
	Кріозахисний розчин з плазмою крові карася	82±1,01
	Кріозахисний розчин з плазмою крові карася + 3-АВ	68±1,14
	Кріозахисний розчин з кобамамідом	70±0,95
	Кріозахисний розчин з кобамамідом + 3-АВ	51±0,86
	Стандартний кріозахисний розчин	70±1,08
	Стандартний кріозахисний розчин + 3-АВ	55±0,99

Примітка. n=100 для кожної групи.

ВИСНОВКИ ТА ПЕРСПЕКТИВИ ПОДАЛЬШОГО РОЗВИТКУ

В результаті проведеного дослідження встановлено, що якісні та кількісні характеристики дефростованої сперми і результати інкубування та підрощування ембріонів і личинок нивківського лускатого коропа залежали від складу кріозахисного середовища.

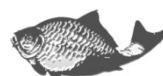
Личинки, отримані від сперми, кріоконсервованої з додаванням до кріозахисного розчину TmAFP, мали кращу опірність до зневоднення, перевершуючи за цим показником дослідні групи, отримані з модифікаторами плазми крові карася і кобамаміду.

Спостерігається консолідованість у дії споріднених екзоцелюлярних кріопротекторів, які були виділені зі стійких до холоду організмів, і які показали кращі рибницькі показники при вирощуванні отриманих з їх допомогою коропів.

Прояв кріоселективного ефекту залежить від цілісності спадкового матеріалу сперматозоїда і не залежить від впливу наднизьких температур на клітинні мембрани, оскільки вони захищені екзоцелюлярними кріопротекторами глікопротеїном-антифризом tmAFP і протеїнами-антифризами AFP плазми крові карася.

ЛІТЕРАТУРА

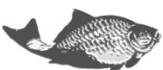
1. Копейка Е. Cryopreservation of Fish Sperm. Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols / Е. Копейка, Т. Zhang // Methods in Molecular Biology. — 2007. — Vol. 368. — P. 203—217.
2. Цветкова Л. И. Создание низкотемпературных коллекций геномов рыб и амфибий / Л. И. Цветкова // Консервация генетических ресурсов : совещание : матер. — Пущино, 1996. — С. 89—93.
3. Повреждения сперматозоидов рыб при криоконсервации / Е. Ф. Копейка, С. И. Дрокин, О. В. Бибенко [и др.] // Достижения и перспективы развития криобиологии и криомедицины : междунар. конф. : тез. докл. — Харьков, 1988. — С. 69—70.



4. Акимочкина Т. И. Цитологические особенности спермиев ценных видов рыб Волго-Каспийского бассейна и их изменение в зависимости от условий криоконсервации : автореф. дис. на соискание степени канд. биол. наук / Акимочкина Т. И. — Астрахань, 2010. — 24 с.
5. Земков Г. В. Цитоморфологические и функциональные изменения спермиев русского осетра (*Acipenser güldenshtädti* V.) после криоконсервации / Г. В. Земков, Т. И. Акимочкина // Цитология. — 2009. — Т. 51, № 11. — С. 945—952.
6. Черепнин В. А. Оценка эффекта криоселекции при использовании оптимизированных криозащитных сред для замораживания спермы карповых рыб / В. А. Черепнин, А. Л. Безусый, Д. А. Сыроватка // Известия высших учебных заведений. Уральский регион. — 2014. — № 1. — С. 112—117.
7. Хочачка П. Биохимическая адаптация / П. Хочачка, Дж. Сомеро. — М. : Мир, 1988. — 568 с.
8. Шишанова Е. И. Влияние криоконсервации спермы на выживаемость и генетический полиморфизм личинок русского осетра / Е. И. Шишанова, И. В. Тренклер, А. С. Мамонова // Вестник АГТУ. — 2012. — № 2. — С. 105—111. — (Серия : Рыбное хозяйство).
9. Трифонова А. Н. Критические периоды эмбрионального развития / А. Н. Трифонова // Успехи современной биологии. — 1949. — Т. 28, вып. 4. — С. 154—168.
10. Extraction and Isolation of antifreeze proteins from plant / Hon Wai-Ching [et al.] / Plant Physiol. — 1994. — Vol. 104, iss. 3. — P. 971—980.
11. Количество продуктов ПОЛ и активность каталазы у чернотелки *Tenebrio molitor* при длительном холодовом воздействии / А. К. Гулевский, Л. И. Релина, Е. А. Грищенкова [и др.] // Проблемы криобиологии. — 2004. — № 2. — С. 50—55.
12. Effect of DNA repair inhibitor (3-aminobenzamide) on genetic stability of loach (*Misgurnus fossilis*) embryos derived from cryopreserved sperm / J. Kopeika, E. Kopeika, T. Zhang [et al.] // Theriogenology. — 2004. — Vol. 69, № 9. — P. 1661—1673.
13. Черепнін В. О. Оцінка виживаності личинок коропа, отриманих від сперми, криоконсервованої в присутності криопротекторів різного походження / В. О. Черепнін // Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнології ім. С.З. Гжицького. — 2015. — Т. 17, № 1(61), ч. 3. — С. 255—258.

REFERENCES

1. Kopeika, E., & Zhang, T. (2007). Cryopreservation of Fish Sperm. Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols. *Methods in Molecular Biology*, 368, 203-217.
2. Tsvetkova, L. I. (1996). Sozdanie nizkotemperaturnykh kollektсий genomov ryb i amfibiy. *Konservatsiya geneticheskikh resursov : materialy soveshchaniya*. Pushchino, 89-93.
3. Kopeyka, E. F., Drokin, S. I., Bibenko, O. B., & Neyfakh, A. A. (1988). Povrezhdeniya spermatozoidov ryb pri kriokonservatsii. *Dostizheniya i perspektivy razvitiya kriobiologii i kriomeditsiny : Mezhdunarodnaya konferentsiya : mezisy*. Har'kov, 69-70.
4. Akimochkina, T. I. (2010). Tsitologicheskie osobennosti spermiev tsennykh vidov ryb Volgo-Kaspiyskogo basseyna i ikh izmenenie v zavisimosti ot usloviy kriokonservatsii. *Extended candidate's thesis*. Astrakhan', 24.
5. Zemkov, G. V., & Akimochkina, T. I. (2009). Tsitomorfologicheskie i funktsional'nye izmeneniya spermiev russkogo osetra (*Acipenser güldenshtädti* V.) posle kriokonservatsii. *Tsitologiya*, 51, 945-952.



6. Cherepnin, V. A., Bezusyy, A. L., & Syrovatka, D. A. (2014). Otsenka efekta krioselekcii pri ispol'zovanii optimizirovannykh kriozashchitnykh sred dlya zamorazhivaniya spermy karpovykh ryb. *Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedeniy. Ural'skiy region*, 1, 112-117.
7. Khochachka, P., & Somero, Dzh. (1988). Biokhimicheskaya adaptatsiya. Moskva : Mir.
8. Shishanova, E. I., Trenkler, I. V., & Mamonova, A. S. (2012). Vliyanie kriokonservatsii spermy na vyzhivaemost' i geneticheskii polimorfizm lichinok russkogo osetra. *Vestnik AGTU. Rybnoe khozyaystvo*, 2, 105-111.
9. Trifonova, A. N. (1949). Kriticheskie periody embrional'nogo razvitiya. *Uspekhi sovremennoy biologii*, 28, 154-168.
10. Wai-Ching, Hon, Criffith, Marilyn, Chong, Pele, & Daniel, S. C. Yang. (1994). Extraction and Isolation of Antifreeze Proteins from Winter Rye (*Secale cereale* L.) Leaves. *Plant Physiol.*, 104(3), 971-980.
11. Gulevskiy, A. K., Relina, L. I., Grishchenkova, E. A., Ryazantsev, V. V., Fedulova, E. S., & Kal'nitskaya, O. N. (2004). Kolichestvo produktov POL i aktivnost' katalazy u chernotelki *Tenebrio molitor* pri dlitel'nom kholodovom vozdeystvii. *Problemy kriobiologii*, 2, 50-55.
12. Kopeika, J., Kopeika, E., Zhang, T., Rawson, D. M., & Holt, W. V. (2004). Effect of DNA repair inhibitor (3-aminobenzamide) on genetic stability of loach (*Misgurnus fossilis*) embryos derived from cryopreserved sperm. *Theriogenology*, 69, 9, 1661-1673.
13. Cherepnin, V. O. (2015). Otsinka vyzhyvanosti lychynok koropa, otrymanykh vid spermy, kriokonservovanoi v prysutnosti krioprotektoriv riznoho pokhodzhennya. *Naukovyy visnyk L'vivs'koho natsional'noho universytetu veterynarnoyi medytsyny ta biotekhnolohiyi im. S.Z. Gzhyts'koho*, 17, 1(61), 3, 255-258.

ПРОЯВЛЕНИЕ ЭФФЕКТА КРИОСЕЛЕКЦИИ У ПОТОМКОВ КАРПА, ПОЛУЧЕННЫХ ОТ ДЕФРОСТИРОВАННОЙ СУСПЕНЗИИ СПЕРМЫ С МОДИФИЦИРОВАННЫМИ КРИОЗАЩИТНЫМИ РАСТВОРАМИ

В. А. Черепнин, diglador@ukr.net, Институт рыбного хозяйства НААН, г. Киев

Цель. Целью исследования была оценка эффекта криоселекции сперматозоидов разновозрастных групп карпа в зависимости от качества размороженной спермы после модификации композитной криозащитной среды, применяемой для разбавления нативной спермы перед замораживанием.

Методика. В качестве модификаторов использовались кофермент витамина B₁₂ (кобамамид), плазма крови карася (*Carassius gibelio*), который прошел естественную холододовую акклимацию и пурифицированный протеин-антифриз tmAFP, выделенный из личинок большого мучного хрущака (*Tenebrio molitor*), которые тоже прошли естественную холододовую акклимацию.

Результаты. В результате проведенного исследования было установлено, что качественные и количественные характеристики дефростированной спермы, результаты инкубации, подращивания эмбрионов и личинок нивчанского чешуйчатого карпа (НЧК), а также рыболовные показатели полученных сеголеток зависели от состава криозащитной среды. Лучшие показатели были выявлены у экспериментальных групп, полученных с использованием криозащитной среды с добавлением пурифицированного протеина-антифриза tmAFP.

Личинки, полученные при использовании спермы, криоконсервированной с добавлением к криозащитной среде TmAFP, имели лучшую сопротивляемость к обезвоживанию, превосходя по этому показателю подопытные группы, полученные с использованием модификаторов плазмы крови карася и кобамамида.

Наблюдается консолидация в действии родственных экзоцеллюлярных



криопротекторов, которые были выделены из устойчивых к холоду организмов, и которые выявили лучшие рыбоводные показатели при выращивании полученных с их помощью карпов.

Проявление криоселективного эффекта зависит от целостности наследственного материала сперматозоида и не зависит от влияния сверхнизких температур на клеточные мембраны.

Научная новизна. Впервые были проведены эксперименты с использованием в качестве экзоцеллюлярных криопротекторов плазмы крови карася и протеина-антифриза tmAFP.

Практическая значимость. Рассмотренные в данной работе модификации композитных криозащитных сред при помощи экзоцеллюлярных криопротекторов и кобамамидов можно рекомендовать для криоконсервации спермы карпов с целью создания криобанков генетических ресурсов рыб, а также их массового воспроизводства.

Ключевые слова: карп, сперма, криозащитная среда, криоселекция, tmAFP, плазма крови карася, кобамамид.

MANIFESTATION OF THE EFFECT OF CRYOSELECTION IN CARP OFFSPRINGS OBTAINED FROM DEFROSTED SPERM SUSPENSION WITH MODIFIED CRYOPROTECTIVE SOLUTIONS

V. Cherepnin, diglador@ukr.net, Institute of Fisheries NAAS, Kyiv

Purpose. The purpose of these studies was to evaluate the effect of the cryoselection of carp sperm of multiple age groups depending on the quality of thawed sperm after modification of the composite cryoprotective medium, which was used for the dilution of native sperm before freezing.

Methodology. Coenzyme B12 (cobamamide), blood plasma of Prussian carp (*Carassius gibelio*), which was subjected to natural cold-acclimation, and purified protein antifreeze tmAFP isolated from larval mealworm (*Tenebrio molitor*), which also was subjected to natural cold-acclimation, were used as modifiers.

Findings. The results of the study demonstrated that qualitative and quantitative characteristics of the defrosted sperm, results of the incubation, rearing of embryos and larvae of Nyvky scaled carp (NLC), as well as fish culture parameters of produced young-of-the-year depended from on the composition of cryoprotective medium. The best results were demonstrated for the experimental groups, obtained with the use of the cryoprotective solution supplemented with purified antifreeze protein tmAFP.

The larvae obtained from the sperm cryopreserved with the addition of cryoprotective medium TmAFP had better resistance to dehydration, surpassing the experimental groups obtained from the modifiers of Prussian carp plasma and cobamamide.

There is a consolidation in the action of the related extracellular cryoprotectors, which were isolated from the cold-resistant organisms. And carp produced with their used demonstrated better performance during their rearing.

The fact can be established that the manifestation of cryoselective effect depends on the integrity of sperm hereditary material and does not depend on the effect of extremely low temperatures on the cell membranes.

Originality. There were the first experiments, where Prussian carp plasma and antifreeze protein tmAFP were used as extracellular cryoprotectors.

Practical value. The modifications of composite cryoprotective media with the use of extracellular cryoprotectants and cobamamide examined in this paper can be recommended for the cryopreservation of carp sperm with a goal to create cryobanks of fish genetic resources as well as for their large scale reproduction.

Keywords: carp, sperm, cryoprotective medium, cryoselection, tmAFP, plasma of Prussian carp, cobamamide.

