

Ribogospod. nauka Ukr., 2017; 3(41): 83-97

DOI:

УДК 639.212./3.034.2:502.7

ОПТИМІЗАЦІЯ УМОВ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ СПЕРМИ СТЕРЛЯДІ (*ACIPENSER RUTHENUS*, L. 1758) ДЛЯ ЗАПЛІДНЕННЯ ІКРИ В УМОВАХ РИБНИХ ГОСПОДАРСТВ

І.С. Кононенко, kononenko_irina88@ukr.net, Національний університет біоресурсів і природокористування України, м. Київ

А.Ю. Пуговкін, lima@online.ua, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

Р.В. Кононенко, ruslan_kononenko@ukr.net, Національний університет біоресурсів і природокористування України, м. Київ

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

К.І. Буцький, cryo@online.kharkov.ua, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

Є.Ф. Копейка, ekopeik@yahoo.com, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

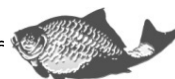
Мета. Оптимізувати умови кріоконсервування сперми стерляді для проведення робіт щодо запліднення ікри та отримання життєстійкого потомства в умовах рибних осетрових господарств. Проаналізувати вплив заморожування сперми у різних формах на показники виживаності сперматозоїдів та запліднення ікри. Порівняти результати використання для заморожування сперми стерляді різних за складом компонентних криозахисних розчинів та проаналізувати їх вплив на якість отриманого потомства.

Методика. Завдання з оптимізації умов кріоконсервування сперми стерляді для запліднення ікри в умовах рибних господарств вирішувалися згідно з загальноприйнятими методиками у кріобіології. Роботи щодо вирощування молоді стерляді проводилися відповідно до загальноприйнятих методів в осетрівництві.

Результати. Дослідженнями встановлено, що оптимізація умов кріоконсервування сперми стерляді дозволила зберегти властивості відігрітих сперматозоїдів на рівні показників нативної сперми. Встановлено, що функції кріоконсервованої в парах рідкого азоту сперми в гранулах та ампулах у розчинах із метанолом або диметилсульфоксидом (ДМСО), краще зберігались у гранулах при використанні метанолу. В умовах рибного господарства оцінено функції сперми після її заморожування в криозахисних розчинах №№ 5 та 6. Встановлено, що запліднююча здатність кріоконсервованої сперми в розчині № 5 (85,6%; з нижчою осмотичністю) майже не відрізнялась від контролю (87,6%) при використанні 25–60 г ікри. У криозахисному розчині № 6 даний показник був на 17,6% нижчим. Приріст маси та довжини тіла 3-місячних особин, одержуваних від ікри заплідненої спермою, кріоконсервованою в обох розчинах був більшим, ніж у контрольному варіанті.

Наукова новизна. Введення до криозахисного розчину креатину та фруктози дозволило підвищити його захисні властивості та зберегти показники активності сперматозоїдів після розморожування на рівні нативної сперми. Кріоконсервування сперми у гранулах дозволило оптимізувати умови низькотемпературного заморожування сперми цього представника осетрових видів риб та отримати якісне життєстійке потомство.

© І.С. Кононенко, А.Ю. Пуговкін, Р.В. Кононенко, В.О. Черепнін, К.І. Буцький,
Є.Ф. Копейка, 2017



Практична значимість. Отримані результати можуть використовуватися осетрівниками в умовах рибних господарства для робіт з отримання життєстійкого потомства стерляді як для товарних потреб, так і для відновлення її популяції у природних водоймах, та кріобіологами для робіт з іншими видами риб.

Ключові слова: кріоконсервування, стерлядь, сперма, запліднення, гранули, ампули, креатин, сироватка крові карася.

ПОСТАНОВКА ПРОБЛЕМИ ТА АНАЛІЗ ОСТАННІХ ДОСЛІДЖЕНЬ І ПУБЛІКАЦІЙ

Відомо, що осмотичність кріозахисного середовища в кілька разів може перевищувати осмотичність сперми риб. Існує думка, що зниження осмотичності кріозахисного середовища підвищує запліднюючу здатність розмороженої сперми лососевих, осетрових і корошових риб [1, 2, 3, 4, 5]. Через велике різноманіття видів риб, різну реакцію сперматозоїдів на зміни навколишнього середовища та за відсутності теорії формування кріорезистентності сперматозоїдів, на сьогодні не розроблено уніфікованого способу їх збереження.

На думку А. Хорвача та співавторів [3], осмотичність середовища є ключовим чинником кріопошкоджень сперматозоїдів. Дослідження властивостей сперми риб, які нерестяться в прісній і солоній воді, показало, що осмотичний градієнт – один із головних чинників кріопошкоджень [1, 6, 7]. Ступінь цих пошкоджень залежить як від температури води, так і від її солоності, тобто від екологічної ніші нересту риб [6], яка формує кріорезистентність сперматозоїдів при взаємодії з геномом клітин та організмів. Харвей та співавтори [8, 9] першими почали використовувати низькомолекулярний кріопротектор метанол та показали його ефективність під час кріоконсервування сперми риб *Sarotherodon mossambicus* та *Danio rerio*. З 2000 р. активно розроблялися нові методи кріоконсервування сперми лососевих, осетрових і корошових риб [3, 10, 11, 12, 13, 14] на основі з використанням середовищ, які містять метанол та сахарозу, що дозволило значно підвищити ефективність низькотемпературного заморожування сперми риб, однак не повністю вирішило всі проблеми.

В еякулятах прісноводних риб сперматозоїди знаходяться в нерухомому стані. Під час кріоконсервування сперми в різних частинах контейнера, в якому заморожують зразок, змінюється концентрація солей, що приводить до активації частини клітин та зменшення запліднюючої здатності сперми [15]. Так, через 5 хв після розморожування запліднююча здатність сперми райдужної форелі *Salmo gairdneri* знижувалась з 70 до 10,7 % [16]. При збільшенні об'єму контейнера підвищується вірогідність цих змін. Але за умов високої концентрації сперматозоїдів лососевих риб, їхня запліднююча здатність була такою ж, як і після кріоконсервування в ампулах 0,5 та 1,2 мл [12]. У разі зменшення об'єму сперми вдвічі до такої ж самої маси ікри, запліднююча здатність сперми з ампул 1,2 мл була значно нижчою, ніж із ампул 0,5 мл. Це свідчило про меншу збереженість сперматозоїдів, заморожених у більших ампулах.

Аналогічний результат був отриманий і під час запліднення відігрітою спермою як лососевих, так і корошових видів риб [6, 11, 17]. При збільшенні маси ікри для запліднення з 80 до 120 г необхідно було підвищувати й об'єм



розмороженої сперми. При цьому її запліднююча здатність істотно знижувалася – з 65 ± 18 до 21 ± 14 %. Таким чином, збільшення об'єму сперми риб при кріоконсервуванні знижувало її якість [12, 17].

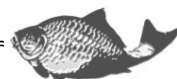
Існують дані щодо більш високих показників запліднення кріоконсервованою спермою великих об'ємів ікри ленського осетра [18, 19]. Автори розводили сперму кріозахисним розчином, який містив сахарозу, хлорид калію, метанол та гліцерин. Після 60-хвилинної еквілібрації за 5°C суспензію клітин розфасовували в ампули (1,5 мл) і заморожували за тріетапною програмою. Для запліднення 100 г ікри використовували 3 або 6 мл розмороженої сперми, а до 300 г ікри додавали від 9 до 18 мл сперми. У разі збільшення відношення об'єму сперми до маси ікри показник запліднення змінювався з 50 до 75 %. Однак, після запліднення 100 г ікри білуги або сибірського осетра результати були значно нижчими (16,5–48,8 %). Недоліком запропонованого О.Б. Докіною та співавторами [18] способу можна вважати низьку активність (10–40 %) розмороженої сперми – в спермі стерляді після розморожування здатними до руху залишалося лише 10 і 30 % клітин. Запліднення такою спермою може призвести до збіднення геному популяції осетрових риб внаслідок селекції, як впливає з роботи [20], в якій ікру російського осетра *Acipenser güldenstädtii Brandt* запліднили розмороженою спермою з активністю сперміїв 20–30 % і методом електрофорезу в поліакриламідному гелі вивчили зміни ферментів малатдегідрогенази та естерази в тканинах личинок на стадії переходу на активне живлення. Автори встановили, що використання кріоконсервованої сперми з низькою активністю підвищувало показник смертності личинок на ранніх стадіях ембріонального розвитку. В результаті селективної дії екстремальних чинників кріоконсервування значно зменшилася кількість активних клітин у розмороженій спермі до 30 %, а личинки втратили рідкісний алель *e* в локусі естерази. Крім того, встановлено підвищення гетерозиготності за алелями малатдегідрогенази та естерази відносно контролю.

ВИДЛЕННЯ НЕВИРШЕНИХ РАНІШЕ ЧАСТИН ЗАГАЛЬНОЇ ПРОБЛЕМИ. МЕТА РОБОТИ

Головним завданням робіт щодо низькотемпературного заморожування сперми рідкісних та зникаючих видів риб є підвищення ефективності методів кріоконсервування, тобто збереження рухливості та запліднюючої здатності розморожених сперматозоїдів. Для цього, на наш погляд, необхідно оптимізувати всі етапи кріоконсервування сперми та її використання після розморожування в умовах рибних господарств.

Підвищення кріозахисту сперми можливе шляхом введення до кріозахисного розчину антифризів риб [21], або сироватки крові карася, у якого в зимовий період під час адаптації до навколишньої температури середовища збільшується кількість вільних амінокислот [22]. Тому існує вірогідність, що додавання до кріозахисного розчину сироватки крові карася може підвищити збереження кріоконсервованої сперми. Крім того, для зменшення селективної дії екстремальних чинників необхідно також визначитись з оптимальною осмотичністю кріозахисного середовища, кращим кріопротектором та способом заморожування сперми.

У зв'язку з вищевказаним, метою даного дослідження була оптимізація умов кріоконсервування сперми стерляді, що дозволить зберегти властивості



розморожених сперматозоїдів (активність та запліднюючу здатність) близькими до нативної сперми, та не втратити їх під час запліднення незалежно від об'єму ікри.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Експеримент проводили з використанням п'яти самців масою 0,9–1,45 кг та восьми самиць стерляді масою 1,2–1,6 кг. Витримування плідників проводили в басейнах з установками замкнутого водопостачання за температури води 14⁰С. Для отримання сперми та ікри плідників стимулювали дворазовою ін'єкцією суспензії гіпофіза ляща *Abramis brama* в розрахунку 3 мг/кг маси самця та 5 мг/кг маси самиці. Репродуктивні клітини отримували на наступний день. Охолоджену до 4⁰С сперму розводили 1:1 ізотермічними кріозахисними розчинами. Після цього суспензію клітин накрапували на фторопластову пластину по 100 мкл, або розливали в поліетиленові ампули об'ємом 0,5 та 1,5 мл. Для підтримання необхідного режиму охолодження змінювали висоту пластини над поверхнею азоту.

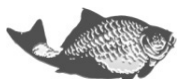
Сперму охолоджували за такою програмою: швидкість охолодження 3–5⁰/хв до температури –15⁰С із затравленням кристалізації вологим повітрям [7] або вібрацією. Далі зі швидкістю охолодження 15–20 град/хв до температури – 70⁰С з подальшим зануренням пластини в рідкий азот. Температуру гранул або ампул контролювали за допомогою термопари від цифрового термометра «UT320» («*Digital Thermometer UT320 series*», Китай) з реєстрацією на комп'ютері. Розморожування ампул сперми проводили на водяній бані за 40⁰С до появи рідкої фази за інтенсивного перемішування води.

Сперму в гранулах також інтенсивно перемішували зі ставковою водою за 15⁰С і додавали по 1 мл у кожен чашку Петрі, в якій знаходилося по 2 г ікри. Ікру (25–60 г) через 3–5 хв після її запліднення промивали 0,6%-м розчином таніну для видалення клейковини. Інкубація ікри проходила в апаратах Вейса.

У першій серії експериментів при визначенні кращих умов кріоконсервування сперму розводили в чотирьох розчинах (№№ 1–4) із кріопротекторами метанол або диметилсульфоксид і заморожували в гранулах та ампулах. Після 17 діб зберігання зразків у рідкому азоті сперму розморожували та оцінювали активність сперматозоїдів за активації ставковою водою (1:50) та їх запліднюючу здатність у чашках Петрі.

У другій частині експериментів для кріоконсервування використовували суміш сперми від двох самців, яку розводили 1:1 кріозахисним середовищем № 5 (КНСО₃ – 8,9 мМ; креатин – 3,8 мМ; сахароза – 11,7 мМ; фруктоза – 5,6 мМ; метанол – 3,75 М) – дослідна група № 1; та середовищем № 6 (КНСО₃ – 8,9 мМ; креатин – 7,6 мМ; сахароза – 11,7 мМ; фруктоза – 5,6 мМ; метанол – 3,75 М; плазма крові карася *Carassius auratus* 1:800 (v/v)) – дослідна група № 2; і відразу ж накрапували по 100 мкл на фторопластову пластину, яка знаходилася в парі азоту за температури 5⁰С.

Розморожували по 10 гранул сперми (1 мл) шляхом додавання до 50–60 мл ставкової води за температури 14⁰С, після інтенсивного перемішування запліднювали порції ікри від 25 до 120 г. У контрольному варіанті запліднювали ікру (100 г) сумішшю нативної сперми від двох самців у такому співвідношенні: 1



мл сперми : 200 мл ставкової води. Для оцінки якості нативної та кріоконсервованої сперми використовували ікру від чотирьох самиць.

Рівень активності нативних та розморожених сперматозоїдів, які були активовані ставковою водою, визначали візуально за допомогою мікроскопа за відсотковим співвідношенням клітин із прямолінійним рухом до загальної кількості видимих у полі зору клітин.

Запліднюючу здатність сперматозоїдів оцінювали на стадії чотирьох бластомерів.

Вплив кріоконсервування на властивості сперматозоїдів визначали за довжиною (під бінокуляром) та масою отриманих личинок та молоді. У контрольному та кожному варіанті експериментів, починаючи з личинки та до 3-місячного віку, кількість проб складала 50.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

На перших етапах роботи були спрямовані на дослідження впливу об'єму сперми, кріоконсервованої в різних середовищах, на активність та запліднюючу здатність сперматозоїдів після розморожування. Від самців було отримано по 10–20 мл сперми, оцінка якості якої показала, що при активації ставковою водою здатності до прямолінійного руху набувають 95–100% клітин.

Загальний аналіз розвитку ембріонів, отриманих через 24 год. після запліднення ікри розмороженою спермою, показав відставання у розвитку; та нерівномірний розвиток ембріонів, які в одній пробі знаходилися на різних стадіях розвитку.

В результаті проведених досліджень встановлено, що об'єм кріоконсервованого зразка сперми впливав на активність та запліднюючу здатність розморожених сперматозоїдів (табл. 1).

При збільшенні об'єму кріоконсервованої сперми в ампулах до 0,5 або 1,5 мл досліджувані показники були нижчими, ніж після кріоконсервування в гранулах ($p \leq 0,05$). Отримані дані узгоджуються з результатами досліджень Х. Штейна [23].

Порівняння впливу кріозахисних розчинів та процесу кріоконсервування на властивості сперматозоїдів показало, що активність статевих клітин, які заморожували-розморожували в гранулах, була найвищою в середовищі № 1 з кріопротектором ДМСО, та майже вдвічі перевищувала активність сперматозоїдів, заморожених у розчині з метанолом та незначним додаванням гліцерину (№ 2). При цьому, запліднююча здатність сперми із даним розчином була на 10 % нижчою, ніж при додаванні метанолу. Ці результати узгоджуються з даними, які були отримані в експериментах зі спермою осетрових та лососевих риб [3, 12, 24], в яких після кріоконсервування в розчинах із ДМСО краще зберігається рухова активність сперматозоїдів, однак знижується запліднююча здатність, а кріоконсервування в розчинах із метанолом, навпаки, підвищує показник запліднення.

Таким чином, результати експериментів підтвердили кращу захисну дію кріопротектора метанолу, порівняно з ДМСО, а також вищу ефективність заморожування сперми стерляді в гранулах, ніж в ампулах.



Таблиця 1. Склад криозахисних розчинів, умови кріоконсервування та характеристика розмороженої сперми

№ кріорозчину	Компонентний склад	Спосіб заморожування (об'єм)	Активність сперматозоїдів після: (%)		№♀	Запліднення ікри, %	
			розведення	розморожування			
1	2,115 М ДМСО, 13,4 мМ КСІ,	ампули (1,5 мл)	83,75± 1,44	40,0±2,36	18	38,3	
				56,25±2,76		20	45,0
	14,6 мМ сахарози, 74,9 мМ гліцину	ампули (0,5 мл) гранули (0,1 мл)			77,5±1,67		55,0
					27,5±1,67		10
2	3,73 М метанол, 20,5 мМ гліцерин, 13,4 мМ КСІ, 14,6 мМ сахарози	ампули (0,5 мл) гранули (0,1 мл)	76,26± 1,44	50,0±2,36		65,0	
				41,25±2,76		20	55,0
3	1,057 М ДМСО, 1,86 М метанол, 13,4 мМ КСІ, 14,6 мМ сахарози, 66,6 мМ гліцину	гранули (0,1 мл)	80,0± 2,36	41,25±2,76	20	55,0	
				63,75±1,44		14	41,0
4	3,73 М метанол, 8,9 мМ КНСО ₃ , 14,6 мМ сахарози, 3,8 мМ креатин	гранули (0,1 мл)	78,75± 1,44	63,75±1,44	14	41,0	
КОНТРОЛЬ ♂ № 17)		-	-	-	14	80,7	
КОНТРОЛЬ ♂ № 19)		-	-	-	18	79,4	
					20	85,0	
					10	83,5	

У другій серії експериментів в умовах рибного господарства було скорочено до мінімуму проміжок часу між отриманням сперми та її кріоконсервування, розморожену сперму одразу ж використовували для запліднення ікри. Крім того, було вдвічі зменшено розведення сперми ставковою водою під час запліднення. Оскільки у попередніх дослідах [25] було встановлено тенденцію кращого збереження сперми в розчині, який містив сироватку крові карася, для підтвердження цього ефекту її включили до нового криозахисного розчину № 6. Додатково у криозахисні розчини було включено КНСО₃, який раніше неодноразово успішно використовувався для кріоконсервування сперми різних організмів [26, 27], а також креатин та фруктозу. Зменшення об'єму кріоконсервованої сперми до 100 мкл та затравлення кристалізації парою вологого повітря [7] дозволили стандартизувати режим кріоконсервування для всіх гранул.

За результатами запліднення були встановлені більш високі захисні властивості кріорозчину № 5, порівняно із № 6 (табл. 2).



Таблиця 2. Умови запліднення та кількість (%) ікри, заплідненої нативною та розмороженою спермою (стадія 4-х бластомерів)

№ інкуб. апарату	№ кріосеред овища	Маса ікри, г	Кількість ікринок, екз.			Запліднення ікри, %	Відпо-відно до контро-лю, %
			всього	незаплідне них	заплідне них		
1	Контроль	90	218	25	193	88,5	-
			256	34	222	86,7	
			183	22	161	88,0	
						<i>Серед. – 87,7</i>	
2		80	197	25	172	87,3	-
			283	37	246	86,9	
			264	31	233	88,3	
						<i>Серед – 87,5</i>	
3		40	201	68	133	66,2	76,5
			243	75	168	69,1	
			213	73	140	65,7	
						<i>Серед. – 67</i>	
4	№ 6	40	187	27	160	85,6	97,7
			198	28	170	85,9	
			205	30	175	85,4	
						<i>Серед. – 85,6</i>	
5		40	273	110	163	59,7	65,6
			247	105	142	57,5	
			217	97	120	55,3	
						<i>Серед. – 57,5</i>	
6		40	246	88	158	64,2	70,7
			179	70	109	60,9	
			221	87	134	60,6	
						<i>Серед. – 61,9</i>	
7		60	241	27	214	88,8	100
			287	38	249	86,8	
			201	26	175	87,1	
						<i>Серед. – 87,6</i>	
8	№ 5	60	147	28	119	81,0	91,2
			139	27	112	80,6	
			252	55	197	78,2	
						<i>Серед. – 79,9</i>	
9		25	245	26	219	89,4	101,8
			236	23	213	90,3	
			248	30	218	87,9	
						<i>Серед. – 89,2</i>	



Низьке запліднення спермою, кріоконсервованою в розчині № 6, пов'язане з недостатнім захистом сперми від негативного впливу екстремальних температур та можливими пошкодженнями сперматозоїдів під час заморожування-розморожування. Розчин № 6 відрізняється від розчину № 5 більш високою осмотичністю за рахунок вдвічі більшої концентрації креатину та вмістом плазми крові карася. Однією з причин відсутності очікуваного кріозахисту сперми від плазми крові карася в цьому експерименті можливо була занадто висока осмотичність кріозахисного розчину № 6, можливо була його більша осмотичність, ніж розчину № 5. За результатами дослідження впливу розчину № 5 на сперму та за показником її запліднення після розморожування можна зробити висновок, що на ранніх стадіях ембріогенезу кількість незапліднених та загиблих ікринок, не відрізнялася від таких контролю, як і показник запліднення ($p < 0,05$).

Оптимізація умов кріоконсервування та запліднення сперми дозволила зберегти більш високу запліднювальну здатність сперматозоїдів, заморожених у середовищі № 5 – майже на рівні контролю, та запліднити від 25 до 60 г ікри. На підвищення досліджуваного показника також вплинув об'єм води, який був вдвічі меншим, ніж при заплідненні нативною спермою. Запліднювальну здатність розморожених сперматозоїдів із розчином № 6 оцінювали за менших об'ємів ікри (40 г), ніж із розчином № 5 (60 г). Це могло підвищити запліднювальну здатність сперми та компенсувати незначний вплив різниці в розведенні за рахунок зменшення впливу сперматозоїдів, що втратили активність. Середня кількість ембріонів, отриманих після запліднення ікри спермою, кріоконсервованою в розчині № 6 була 68,0% (інкубаційні апарати 3–6), а в розчині 5 – 85,6% (інкубаційні апарати 7–9). Сумарна кількість ембріонів у двох контрольних варіантах, отриманих від запліднення нативною спермою, складала 87,6% (інкубаційні апарати 1–2).

Менший вплив чинників кріоконсервування на сперму, заморожену в розчині № 5, встановлений і при порівнянні характеристик молоді, отриманої після запліднення ікри розмороженою спермою (табл. 3). Довжину та масу мальків визначали впродовж трьох місяців, при цьому на дев'яту добу відмічався перехід на активне живлення, а починаючи з сімнадцятої доби їх почали підгодовувати комбікормом.

На стадії передличинки у молоді стерляді, яку отримали від запліднення ікри кріоконсервованою спермою з використанням розчинів № 5 (група 1) та № 6 (група 2), відмічалась тенденція до збільшення маси відносно контрольних. Довжина тіла передличинок обох дослідних груп була більшою, порівняно з контрольною.

Аналіз маси та довжини тіла молоді групи 2 свідчить про те, що майже на всіх вивчених нами етапах розвитку та до кінця третього місяця досліджень маса і довжина тіла молоді групи 2 перевищували результати, отримані в групі 1 та в контрольній. Миловановим В.К. [28] вперше було повідомлено про можливі зміни маси молоді, отриманої від розмороженої сперми. Так, після витримування сперми баранів в атмосфері водню було вирошено молодняк, маса якого була меншою від такої контрольної групи.



Таблиця 3. Результати вимірювань молоді стерляді, $M \pm m$

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

* - відмінність статистично значуща відносно контролю за $p \leq 0,005$,

** - відмінність статистично значуща між дослідними групами за $p \leq 0,005$.

Протилежні результати були отримані під час запліднення ікри сазанів кріоконсервованою спермою німецького коропа [26]. У результаті цієї роботи був отриманий гетерозисний гібрид, маса та швидкість росту якого були значно більшими, ніж при заплідненні ікри сазана нативною спермою сазана. С.І. Савушкіна та співавтори [30] повідомили про збільшення маси та швидкості росту короїв та осетрів при заплідненні ікри кріоконсервованою спермою, але активність розмороженої сперми була майже вдвічі нижчою, порівняно з результатами, отриманими в результаті проведення наших дослідів.

ВИСНОВКИ ТА ПЕРСПЕКТИВИ ПОДАЛЬШОГО РОЗВИТКУ

Основним чинником, який впливав на кількість пошкоджених сперматозоїдів під час розведення сперми є осмотичність кріозахисного середовища. За кріоконсервування осмотичність розчину та об'єм заморожуваного зразка сперми мали визначальний вплив на запліднювальну здатність сперматозоїдів та на збільшення розмірів і маси отриманої молоді, порівняно з молоддю від запліднення ікри нативною спермою. При цьому пошкоджуючий вплив був значно меншим для сперми, яку кріоконсервували в розчині № 5 з нижчою осмотичністю.

Маса та довжина тіла молоді, отриманої при заплідненні ікри розмороженою спермою, протягом трьох місяців, були більшими від таких у контролі. Приріст маси молоді був меншим за використання сперми, кріоконсервованої в розчині № 5 без плазми крові карася. Збільшення маси молоді, яку отримали після запліднення ікри відігрітою спермою, після кріоконсервування в обох розчинах залежить від селективного впливу екстремальних чинників кріоконсервування на сперму плідників; зміною проникності мембран сперматозоїдів під час кріоконсервування та більшого накопиченням креатину в сперматозоїдах,



кріоконсервованих у розчині № 6 з вищою осмотичністю, та більшою пошкоджувальною дією.

Менший приріст маси молоді від запліднення спермою, кріоконсервованою в розчині № 5 свідчить про краще збереження сперми в цьому розчині.

Мінімальний вплив чинників кріоконсервування на сперматозоїди відбувається на метаболізмі отриманої молоді, однак він не може бути шкідливим для виживання отриманої молоді.

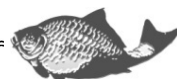
Для вирішення питання щодо впливу креатину або різного ступеня пошкодження мембран на збільшення довжини та маси молоді необхідне проведення додаткових експериментів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Каранова М. В., Гахова Э. Н. Биохимическая стратегия выживания пресноводного моллюска *Lymnaea stagnalis* при околонулевых температурах // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 2007. Т. 43, № 3. С. 258—264.
2. Дрокин С. І., Копейка Є. Ф. Середовище для кріоконсервування сперми коропа : пат. 49236 Україна. № u 200910499 ; заявл. 16.10.2009; опубл. 26.04.2010. Бюл. № 8.
3. The relationship of the cryoprotectants methanol and dimethylsulfoxide and hyperosmotic extenders on sperm cryopreservation of two North-American sturgeon species / Horvath A. et al. // Aquaculture. 2005. Vol. 247, № 1–4. P. 243—251.
4. Stein H., Bayrle H. Cryopreservation of the sperm of some freshwater teleosts // Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys. 1978. Vol.18, № 4. P. 1073—1076.
5. Stoss J., Holtz W. Cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) sperm. The effect of DMSO concentration and equilibration time on sperm survival, sucrose and KCL as extender components and the osmolality of the thawing solution // Aquaculture. 1983. Vol. 32. P. 321—330.
6. Вплив осмотичності кріозахисного середовища, форми та об'єму контейнерів на виживання кріоконсервованих сперматозоїдів коропів *Cyprinus carpio* / Копейка Є. Ф. та ін. // Рибне господарство. 2009. Вип. 66. С. 89—93.
7. Kopeika E., Kopeika J. Variability of sperm quality after cryopreservation in fish // Fish Spermatology. Oxford, U.K., 2008. P. 347—396.
8. Harvey B. Cryopreservation of *Sarotherodon mossambicus* spermatozoa // Aquaculture. 1983. Vol. 32, iss. 3–4. P. 313—320.
9. Harvey B., Kelley N. R., Ashwood-Smith M. J. Cryopreservation of zebrafish spermatozoa using methanol // Can. J. Zool. 1982. Vol. 60, iss. 8. P. 1867—1870.
10. Relationships between selected sperm characteristics and fertilization success in the beluga sturgeon, *Huso huso* (Linnaeus, 1758) / Aramli M.S. et al. // Veterinarni Medicina. 2015. Vol. 60, № 9. P. 509—514.
11. Fertilising rate of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*, Brandt) milk cryopreserved with methanol / Glogowski J. et al. // Aquaculture. 2002. Vol. 211, iss. 4. P. 367—373.
12. Studies on the semen biology and sperm cryopreservation in the sterlet, *Acipenser ruthenus* L. / Lahnsteiner F. et al. // Aquaculture Research. 2004. Vol. 35. P. 519—528.
13. Motility and fertilizing capacity of fresh and frozen-thawed spermatozoa in sturgeons *Acipenser baeri* and *A. ruthenus* / Tsvetkova L.I. et al. // J. of Applied Ichthyology. 1996. Vol. 12, № 2. P. 107—112.



14. Urbany B., Horvath A., Kovacs B. Successful hybridization of *Acipenser* species using cryopreserved sperm // *Aquaculture International*. 2004. Vol. 12. P. 47—56.
15. Пуговкін А. Ю., Копейка Є. Ф. Проникність плазматичних мембран сперматозоїдів коропа (*Cyprinus carpio*, L., 1758) для молекул води та кріопротекторів на різних етапах кріоконсервування // *Проблеми криобіології та криомедицини*. 2016. Т. 26, № 4. С. 340—348.
16. Stoss J., Holtz W. Cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) sperm. Effect of thawing solution, sperm density and interval between thawing and insemination // *Aquaculture*. 1981. Vol. 22. P. 97—104.
17. Cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio*) sperm in 1.2 and 5 ml straws and occurrence of haploids among larvae produced with cryopreserved sperm / Horvath A. et al. // *Cryobiology*. 2007. Vol. 54, iss. 3. P. 251—257.
18. Метод кріоконсервації сперми осетрових рыб — об'єктів аквакультури / Докина О. Б. и др. // *Аквакультура осетровых рыб: достижения и перспективы развития* : IV Междунар. науч.-практ. конф. : матер. Москва : ВНИРО, 2006. С. 76—79.
19. Способ кріоконсервирования спермы осетровых рыб : пат. МПК А01К 61/00, А0Н 1/02 РФ ; заявл. 02.06.2006; опубл. 27.02.2008. Бюл. № 6.
20. Шишанова Е. И., Тренклер И. В., Мамонова А. С. Влияние кріоконсервации спермы на выживаемость и генетический полиморфизм личинок русского осетра // *Вестник АГТУ*. 2012. № 2. С. 105—110. (Серия : Рыб. хоз-во).
21. Hypotonic treatment prior to freezing improves cryoresistance of common carp (*Cyprinus carpio* L.) spermatozoa / Dzyuba B. et al. // *Cryobiology*. 2013. Vol. 66. P. 192—194.
22. Каранова М. В. Состав свободных аминокислот крови и мышц ротана *Perccottus glehni* в период подготовки и завершения гибернации // *Журнал эволюционной биохимии и физиологии*. 2009. Т. 45, № 1. С. 59—67.
23. Stein H. Zum Einfluss von Schutzsubstanz und Konfektionierung auf das Befruchtungsergebnis mit tiefgefrorenem Bachforellensperma (*Salmo trutta forma fario* L.) // *Berl. Munch. Tierärztliche Wochenschrift*. 1979. Vol. 92. P. 420—421.
24. Lahnsteiner F., Weismann T., Patzner R.A. Methanol as cryoprotectant and the suitability of 1.2 ml and 5 ml straws for cryopreservation of semen from salmonid fishes // *Aquaculture Research*. 1997. Vol. 28. P. 471—479.
25. Кріоконсервирование спермы стерляди: оптимизация состава криозащитной среды / Пуговкин А. Ю. и др. // *Проблемы криобіології та криомедицини*. 2016. Т. 26, № 2. С. 160.
26. Mounib M. S. Cryogenic preservation of fish and mammalian spermatozoa // *J. Reprod. Fert.* 1978. Vol. 53, № 1. P. 13—18.
27. Mounib M. S., Hwang P. C., Idler R. R. Cryogenic preservation of Atlantic Cod (*Gadus morhua*) sperm // *J. Fish. Res. Board. Can.* 1968. Vol. 25, № 12. P. 2623—2632.
28. Милованов В. К. Биология воспроизводства и искусственное осеменение животных. Москва : Сельхозиздат, 1962. 696 с.
29. Использование кріоконсервированной спермы карпа для коммерческой гибридизации на теплых водах Приморской ГРЭС / Копейка Е. Ф. и др. // *Рыбохоз. использование теплых вод* : IV Всесоюз. совещ., окт., 1990. : тезисы докл. Москва, 1990. С. 145—146.
30. Савушкина С. И. Выращивание рыбопосадочного материала, полученного с использованием кріоконсервированной спермы // *Рациональное*



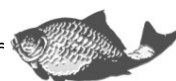
использование пресноводных экосистем — перспективное направление реализации национального проекта «Развитие АПК»: науч.-практ. конф., 17–19 дек. 2007 г. : матер. Москва : Россельхозакадемия, 2007. С. 303—305.

REFERENCES

1. Karanova, M. V., & Gahova, Je. N. (2007). Biohimicheskaia strategija vyzhivaniia presnovodnogo molljuska *Lymnaea stagnalis* pri okolonulevyh temperaturah. *Zhurnal jevoljucionnoj biohimii i fiziologii*, 43, 3, 258-264.
2. Drokyn, S.I., & Копьежка, Ye.F. (2010). *Seredovyshhe dlya kriokonservuvannya spermy koropa*. Patent of Ukraine. № 49236.
3. Horvath A., Wayman W.R., Urbányi B. et al. (2005). The relationship of the cryoprotectants methanol and dimethylsulfoxide and hyperosmotic extenders on sperm cryopreservation of two North-American sturgeon species. *Aquaculture*, 247 (1–4), 243-251.
4. Stein, H., & Bayrle, H. (1978). Cryopreservation of the sperm of some freshwater teleosts. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys*, 18, 4, 1073-1076.
5. Stoss, J., & Holtz, W. (1983). Cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) sperm. The effect of DMSO concentration and equilibration time on sperm survival, sucrose and KCL as extender components and the osmolality of the thawing solution. *Aquaculture*, 32, 321-330.
6. Копьежка, Ye. F., Drokin, S. I., & Gordiyenko, Ye. O. et al. (2009). Vplyv osmotychnosti kriozahysnogo seredovyshha, formy ta ob'yemu kontejneriv na vyzhyvannya kriokonservovanyh spermatozoidiv koropiv *Cyprinus carpio*. *Rybne gospodarstvo*, 66, 89-93.
7. Kopeika, E., & Kopeika, J. (2008). Variability of sperm quality after cryopreservation in fish. *Fish Spermatology*. Oxford, U.K., 347-396.
8. Harvey, B. (1983). Cryopreservation of *Sarotherodon mossambicus* spermatozoa. *Aquaculture*, 32 (3–4), 313-320.
9. Harvey, B., Kelley, N. R. & Ashwood-Smith, M. J. (1982). Cryopreservation of zebrafish spermatozoa using methanol. *Can. J. Zool.*, 60 (8), 1867-1870.
10. Aramli, M. S., Kalbassi, M. R., Nazari, R. M., & Sarvi, K. (2015). Relationships between selected sperm characteristics and fertilization success in the beluga sturgeon, *Huso huso* (Linnaeus, 1758). *Veterinarni Medicina*, 60 (9), 509-514.
11. Glogowski, J., Kolman, R., & Szczepkowski, M. et al. (2002). Fertilising rate of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*, Brandt) milk cryopreserved with methanol. *Aquaculture*, 211 (4), 367-373.
12. Lahnsteiner, F., Berger, B., Horvath, A., & Urbanyi, B. (2004). Studies on the semen biology and sperm cryopreservation in the sterlet, *Acipenser ruthenus* L. *Aquaculture Research*, 35, 519-528.
13. Tsvetkova, L. I., Cosson, J., & Linhart, O., et al. (1996). Motility and fertilizing capacity of fresh and frozen-thawed spermatozoa in sturgeons *Acipenser baeri* and *A. ruthenus*. *J. of Applied Ichthyology*, 12 (2), 107-112.
14. Urbany, B., Horvath, A., & Kovacs, B. (2004). Successful hybridization of *Acipenser* species using cryopreserved sperm. *Aquaculture International*, 12, 47-56.
15. Pugovkin, A. Yu., & Копьежка, Ye.F. (2016). Pronyknist plazmatychnykh membran spermatozoidiv koropa (*Cyprinus carpio*, L., 1758) dlya molekul vody ta krioprotektoriv na riznykh etapah kriokonservuvannya. *Problemy kriobiologii i kriomedycyny*, 26 (4), 340-348.



16. Stoss, J., & Holtz, W. (1981). Cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) sperm. Effect of thawing solution, sperm density and interval between thawing and insemination. *Aquaculture*, 22, 97-104.
17. Horváth, Á., Miskolczi, E., & Mihálffy, S. et al. (2007). Cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio*) sperm in 1.2 and 5 ml straws and occurrence of haploids among larvae produced with cryopreserved sperm. *Cryobiology*, 54 (3), 251-257.
18. Dokina, O. B., Cvetkova, L. I., Pronina, N. D., & Milenko, V. A. (2006). Metod kriokonservacii spermy osetrovih ryb — obektov akvakul'tury. *Akvakul'tura osetrovih ryb: dostizheniya i perspektivy razvitija: IV Mezhdunarodnaya nauch-prakt. konf.* Moskva: VNIRO, 76-79.
19. Dokina, O. B., Cvetkova, L. I., Pronina, N. D., & Milenko, V. A. (2008). *Sposob kriokonservirovaniya spermy osetrovih ryb*. Patent of RF № A01K 61/00, A0N 1/02.
20. Shishanova, E. I., Trenkler, I. V., & Mamonova, A. S. (2012). Vliyanie kriokonservacii spermy na vyzhivaemost' i geneticheskij polimorfizm lichinok russkogo osetra. *Vestnik AGTU. Ser.: Ryb. hoz-vo*, 2, 105-110.
21. Dzyuba, B., Cosson, J., & Yamaner, G. et al. (2013). Hypotonic treatment prior to freezing improves cryoresistance of common carp (*Cyprinus carpio* L.) spermatozoa. *Cryobiology*, 66, 192-194.
22. Karanova, M. V. (2009). Sostav svobodnyh aminokislot krovi i myshc rotana *Perccottus glehni* v period podgotovki i zaversheniya gibernacii. *Zhurnal jevoljucionnoj biohimii i fiziologii*, 45 (1), 59-67.
23. Stein, H. (1979). Zum Einfluss von Schutzsubstanz und Konfektionierung auf das Befruchtungsergebnis mit tiefgefrorenem Bachforellensperma (*Salmo trutta morpha fario* L.). *Berl. Munch. Tierarztliche Wochenschrift*, 92, 420-421.
24. Lahnsteiner, F., Weismann, T., & Patzner, R. A. (1997). Methanol as cryoprotectant and the suitability of 1.2 ml and 5 ml straws for cryopreservation of semen from salmonid fishes. *Aquaculture Research*, 28, 471-479.
25. Pugovkin, A. Ju., Kononenko, I. S., & Kononenko, R. V., et al. (2016). Kriokonservirovanie spermy sterljadi: optimizacija sostava kriozashhitnoj sredy. *Problemy kriobiologii i kriomeditsiny*, 26 (2), 160.
26. Mounib M. S. (1978). Cryogenic preservation of fish and mammalian spermatozoa. *J. Reprod. Fert.*, 53 (1), 13-18.
27. Mounib, M. S., Hwang, P. C., & Idler, R. R. (1968). Cryogenic preservation of Atlantic Cod (*Gadus morhua*) sperm. *J. Fish. Res. Board. Can.*, 25 (12), 2623-2632.
28. Milovanov, V. K. (1962). *Biologija vosproizvodstva i iskusstvennoe osemenenie zhivotnyh*. Moskva: Sel'hozizdat.
29. Kopejka, E. F., Cherepanov, V. V., Ajushin, B. N., & Rachek, E. I. (1990). Ispol'zovanie kriokonservirovannoj spermy karpa dlja kommercheskoj gibridizacii na teplyh vodah Primorskoj GRES. *Rybohozyaystvennoe ispol'zovaniju teplykh vod: IV Vses. soveshh.* Moskva, 145-146.
30. Savushkina, S. I. (2007). Vyrashhivanie ryboposadochnogo materiala, poluchennogo s ispol'zovaniem kriokonservirovannoj spermy. Racional'noe ispol'zovanie presnovodnyh jekosistem — perspektivnoe napravlenie realizacii nacional'nogo proekta «Razvitie APK»: nauch.-prakt. konf.: mater. Moskva: Rossel'hozakademija, 303-305.



**ОПТИМІЗАЦІЯ УСЛОВИЙ КРІОКОНСЕРВІРОВАНИЯ СПЕРМЫ
СТЕРЛЯДИ (*ACIPENSER RUTHENUS*, L. 1758) ДЛЯ ОПЛОДОТВОРЕНИЯ
ИКРЫ В УСЛОВИЯХ РЫБНЫХ ХОЗЯЙСТВ**

И. С. Кононенко, kononenko_irina88@ukr.net, Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, г. Киев

А. Ю. Пуговкин, lima@online.ua, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Р. В. Кононенко, ruslan_kononenko@ukr.net, Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, г. Киев

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

К. И. Буцкий, cryo@online.kharkov.ua, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Е. Ф. Копейка, ekopeik@yahoo.com, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Цель. Оптимизировать условия криоконсервирования спермы стерляди для проведения работ по оплодотворению икры и получения жизнестойкого потомства в условиях рыбных осетровых хозяйств. Проанализировать влияние замораживания спермы в разных формах на показатели выживания сперматозоидов и оплодотворения икры. Сравнить результаты использования для замораживания спермы стерляди разных по составу компонентных криозащитных растворов и проанализировать их влияние на качество полученного потомства.

Методика. Задачи по оптимизации условий криоконсервирования спермы стерляди для оплодотворения икры в условиях рыбных хозяйств выполнялись согласно общепринятым методикам в криобиологии. Работы с полученным потомством стерляди проводились согласно общепринятым методам в осетроводстве.

Результаты. Исследованиями установлено, что оптимизация условий криоконсервирования спермы стерляди разрешила сохранить свойства отогретых сперматозоидов на уровне показателей нативной спермы. Установлено, что функции криоконсервированной в парах жидкого азота спермы в гранулах в растворах с метанолом или диметилсульфоксидом (ДМСО), лучше сохранялись в гранулах при использовании метанола. В условиях рыбного хозяйства оценено функции спермы после её замораживания в криозащитных растворах №№ 5 и 6. Установлено, что оплодотворяющая способность криоконсервированной спермы в растворе № 5 (85,6 %) (с меньшей осмотичностью) почти не отличалась от контроля (87,6%) при использовании 25–60 г икры. В криозащитном растворе № 6 данный показатель был на 17,6% ниже. Прирост массы и длины тела 3-месячных особей, полученных в результате оплодотворения икры спермой, криоконсервированной в обоих растворах, был больше, чем в контроле.

Научная новизна. Введение в криозащитный раствор креатина и фруктозы позволило повысить его защитные свойства и сохранить показатели активности сперматозоидов после размораживания на уровне нативной спермы. Криоконсервирование спермы в гранулах позволило оптимизировать условия низкотемпературного замораживания спермы данного представителя осетровых видов рыб и получить качественное жизнестойкое потомство.

Практическая значимость. Полученные результаты могут использоваться осетроводами в условиях рыбных хозяйств для работ по получению жизнестойкого потомства стерляди как для товарных потребностей, так и для восстановления её популяций в природных водоёмах, и криобиологами для работ с другими видами рыб.

Ключевые слова: криоконсервирование, стерлядь, сперма, оплодотворение, гранулы, ампулы, креатин, сыворотка крови карася.



**OPTIMIZATION OF THE CONDITIONS OF STERLET
(*ACIPENSER RUTHENUS*, L. 1758) SPERM CRYOPRESERVATION
FOR EGG FERTILIZATION IN FISH FARM CONDITIONS**

I.S. Kononenko, kononenko_irina88@ukr.net, National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kyiv

A.Yu. Pugovkin, lima@online.ua, Institute of Cryobiology and Cryomedicine Problems NAS of Ukraine, Kharkov

R.V. Kononenko, ruslan_kononenko@ukr.net, National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kyiv

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

K.I. Buts'kyi, cryo@online.kharkov.ua, Institute of Cryobiology and Cryomedicine Problems NAS of Ukraine, Kharkov

Ye.F. Kopeika, ekopeik@yahoo.com, Institute of Cryobiology and Cryomedicine Problems NAS of Ukraine, Kharkov

Purpose. To optimize the conditions of sterlet sperm cryopreservation for works on egg fertilization and for producing viable offspring in the conditions of sturgeon farms. To analyze the effect of sperm freezing in different forms on spermatozoa survival and egg fertilization. To compare the results of cryoprotective solutions with compositions on the results of their use of sterlet sperm fertilization and to analyze their effect on the quality of the produced offspring.

Methodology. The task aimed at optimizing the conditions of sterlet sperm cryopreservation for egg fertilization in the conditions of fish farms were carried out according to generally accepted methods in cryobiology and recommendations of Ye.F. Kopeika. The works with the produced sterlet offspring were carried out according to conventional sturgeon culture methods.

Findings. The studies showed that the optimization of the conditions of sterlet sperm cryopreservation allowed preserving the properties of thawed spermatozoa at the level of native sperm. It was found that the functions of the sperm cryopreserved in liquid nitrogen vapors in granules in solutions with methanol or dimethyl sulfoxide (DMSO) were better preserved in granules when using methanol. The functions of the sperm after its freezing in cryopreservation solutions №№ 5 and 6 were evaluated in the conditions of a fish farm. It was found that the fertilizing capacity of the cryopreserved sperm in the solution № 5 (85.6 %) (with lower osmolality) did not virtually differ from the control (87.6 %) when using 25-60 g of eggs. In the cryopreservation solution № 5, this value was 17.6 % lower. The weight and length gain after egg fertilization with the sperm cryopreserved in both solutions in 3-month fish was higher than in the control.

Originality. Introduction of creatine and fructose into the cryopreservation solution allowed increasing its protective properties and preserving spermatozoa activity after thawing at the level of the native sperm. Sperm cryopreservation in granules allowed optimizing the conditions of low temperature freezing of this sturgeon species and producing high quality viable offspring.

Practical value. The obtained results can be used by sturgeon culturists in the conditions of fish farms for works aimed at producing viable sterlet offspring both for commercial purposes and for restocking into natural water bodies as well as by cryobiologists for works with other fish species.

Key words: cryopreservation, sterlet, sperm, fertilization, granules, ampoules, creatine, Prussian carp serum.

