

ТОВАРНАЯ АКВАКУЛЬТУРА И ИСКУССТВЕННОЕ ВОСПРОИЗВОДСТВО РЫБ

УДК 576.371:57.086.13

А. М. Тихомиров, М. М. Богатырёва, А. А. Красильникова

РАЗРАБОТКА КРИОЗАЩИТНЫХ СРЕД ДЛЯ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО КОНСЕРВИРОВАНИЯ СПЕРМАТОЗОИДОВ БЕЛОРЫБИЦЫ (*STENODUS LEUCICHTHYS GÜLDENSTÄDTI*, 1772) В ЦЕЛЯХ СОХРАНЕНИЯ ГЕНОФОНДА

Введение

Первые признаки уменьшения запасов белорыбицы (*Stenodus leucichthys* *Güldenstädti*, 1772) отмечались уже в конце XIX в. [1]. На ее численность сильно повлиял процесс индустриализации советского государства в 1930-е гг., следствием которого стало загрязнение р. Камы и ее притоков нефтепродуктами. Из-за этого были потеряны нерестилища белорыбицы на реках Чусовой, Уфе, Белой, что стало причиной снижения уловов в 1940-е гг. [2].

Развернувшийся в конце XX – начале XXI в. нелегальный промысел почти полностью уничтожил нерестовую популяцию белорыбицы. Она включена в Красные книги Российской Федерации, Астраханской и Волгоградской областей, Республики Дагестан [3]. В сложившейся ситуации первостепенной задачей стало найти способ сохранения ее генофонда. Одним из перспективных методов является применение криотехнологий для долговременного хранения генома живых организмов в низкотемпературных генетических банках [4, 5].

При температуре жидкого азота (–196 °С) большинство химических процессов прекращается. Замороженные клетки могли бы оставаться жизнеспособными многие сотни лет в отсутствие воздействия ионизирующей радиации [6]. Однако абсолютное большинство живых объектов гибнет, как показано криобиологами, еще в интервале значений температуры от 0 до –50 °С, если до замораживания не были приняты меры по их защите [4].

Для защиты клеток от криоповреждений наиболее важны оптимальный выбор криопротекторов и режимы самого охлаждения [7].

Создание эффективных криопротекторов для защиты клеток от повреждений при низкотемпературном хранении биологического материала остается одной из актуальных задач современной криобиологии [8].

В 1998 г. В. И. Ананьев с соавторами изучали влияние разных криопротекторов на выживаемость сперматозоидов после дефростации. В ходе исследований установлено увеличение времени подвижности спермиев после разморозки на 150 % при использовании антифризных гликопротеинов и снижение данного показателя при добавлении в криосреду 10 % диметилсульфоксида (ДМСО) [9]. Работы по криоконсервации, хранению и оплодотворению икры дефростированной спермой белорыбицы проводились Г. В. Земковым с соавторами [10].

Однако проведенные исследования не показали высоких результатов, поэтому необходимо дальнейшее изучение влияния криоконсервации на сперму белорыбицы и поиск оптимальных составов криосред для предохранения клеток от повреждений.

В связи с этим целью исследований являлось определение оптимального уровня солёности раствора, на базе которого готовятся криозащитные среды, а также поиск протекторов, наиболее эффективно обеспечивающих выживаемость половых клеток в процессе низкотемпературного консервирования.

Материалы и методы исследований

Исследования проводились в лаборатории «Криотехнологии в аквакультуре» Астраханского государственного технического университета в 2009 г.

Материалом для исследований служила сперма белорыбицы, полученная на Александровском осетровом рыбозаводе и Волжском рыбопитомнике (Астраханская область). Получение спермы осуществляли методом гипофизарных инъекций. Микроскопированием определяли активность половых клеток по 5-балльной шкале Г. М. Персова [11], отмечая процентное отношение спермиев с поступательным и колебательным движением к общему количеству живых сперматозоидов. В работе использовали сперму активностью 4 и 5 баллов. Время жизни определяли с помощью секундомера. Активность сперматозоидов устанавливали с помощью видеоокуляра НВ-200 и персонального компьютера. Процесс замораживания осуществляли в программируемом автоматическом криозамораживателе.

На первом этапе работ устанавливали оптимальную соленость базового раствора для криозащитной среды, подходящей для спермы белорыбицы. При планировании экспериментов использовали «однофакторный блочный эксперимент» или «латинские квадраты» с последующим дисперсионным анализом. Значимость различий действия факторов устанавливали по F -критерию Фишера [12].

На втором этапе работ устанавливали состав протекторов, предохраняющих половые клетки от разрушения. Данные подвергали статистической обработке по Г. Ф. Лакину [13].

На процесс криоконсервации оказывает влияние большое число факторов, от комплекса которых зависит выживаемость половых клеток после размораживания. Большое значение для успеха замораживания имеют физиологическое состояние и возраст рыб, взяты ли спермии в пик нереста, как бралась сперма – с помощью катетера или без него. Во время этой процедуры следует избегать попадания мочи, крови, воды в сперму во избежание активации спермиев и изменения осмотических характеристик семенной плазмы [14, 15]. Все это означает, что на результаты криоконсервации воздействует много факторов, учесть которые и свести к минимуму их негативное действие не всегда представляется возможным.

Большое значение имеет соленость криозащитной среды. Как отмечает В. В. Хлебович [16], соленость окружающей среды влияет как на весь организм в целом, так и на его отдельные клетки, в частности сперматозоиды.

Первая серия опытов была посвящена определению солености базового раствора для криоконсервации сперматозоидов белорыбицы. Нативную сперму помещали в раствор NaCl соленостью 3, 5, 7 и 9 ‰. Под микроскопом регистрировали активность сперматозоидов в указанных растворах. При величине солености, когда сперма теряла подвижность, ее активировали чистой водой. Время жизни сперматозоидов регистрировали по стандартной методике. Испытания проводили в трех повторностях. Средние значения результатов эксперимента приведены в табл. 1.

Таблица 1

Время жизни сперматозоидов белорыбицы в растворах различной солености, с

Вариант опыта	Соленость базового раствора, ‰			
	3	5	7	9
1	45,0 ± 0,01	14,0 ± 0,12	0	0
2	58,0 ± 0,50	31,0 ± 0,21	0	0
3	34,0 ± 0,07	18,0 ± 0,34	0	0

После статистической обработки результатов установлено: соленость исследуемых растворов (факторы) и сперма от разных самцов (блоки) между собой достоверно различаются ($F_{кр} = 12,5$ между факторами; $F_{кр} = 8,4$ между блоками), что говорит о возможности исключения вариантов с соленостью 3 и 5 ‰ из дальнейших исследований.

В результате исследований установлено, что 7 ‰ – оптимальная соленость среды для спермы белорыбицы. Кроме того, при солености более 7 ‰ наблюдалась гибель сперматозоидов.

Установление оптимального состава криопротектора является одной из основных задач криобиологии, особенно учитывая тот факт, что криопротекторы являются специфичными не только среди классов животных, но и видоспецифичными [4, 9].

В настоящее время известно около ста различных веществ, обладающих криопротекторным действием и апробированных на различных биологических объектах [17], однако наиболее детально изучены биологическое действие и криопротекторные свойства только нескольких десятков веществ, широко используемых в практике низкотемпературного криоконсервирования.

С учетом представленных возможностей, а также на основании полученных ранее результатов исследований экспериментальные работы были ориентированы на сравнительный анализ действия криопротекторов разного состава на сперматозоиды белорыбицы. Для экспериментов было отобрано шесть составов криопротекторов (различные варианты сочетания ДМСО с полисахаридами, желток куриного яйца), приготовленные на основе базового раствора соленостью 7 ‰.

В результате серии опытов отобрано два состава криопротекторов, наиболее эффективно защищающих половые клетки белорыбицы от повреждений в процессе криоконсервации.

Криозащитная среда № 3 включает в себя сахарозу, маннит, ДМСО и желток куриного яйца; а среда № 4 – ДМСО и желток куриного яйца. Результаты экспериментов представлены в табл. 2.

Таблица 2

Изменение активности сперматозоидов белорыбицы в процессе криоконсервации

Сперма	Активность, %	Время жизни, с
Нативная	91,37 ± 7,1	150,45 ± 54,7
Разбавленная		
Среда № 3	64,7 ± 23,6	117,3 ± 40,9
Среда № 4	49,0 ± 18,5	93,2 ± 19,8
Дефростированная		
Среда № 3	15,0 ± 8,9	113,1 ± 19,5*
Среда № 4	10,8 ± 5,8	91,7 ± 11,7*

* Различия достоверны при $p \leq 0,05$.

Как видно из табл. 2, лучшие рыбоводные качества дефростированной спермы отмечены при использовании криозащитной среды № 3, однако достоверные различия отмечены только по времени жизни сперматозоидов. Это указывает на возможность использования также и криосреды № 4.

На рис. 1 и 2 представлена динамика активности спермы белорыбицы и времени жизни сперматозоидов на разных этапах процесса криоконсервации.

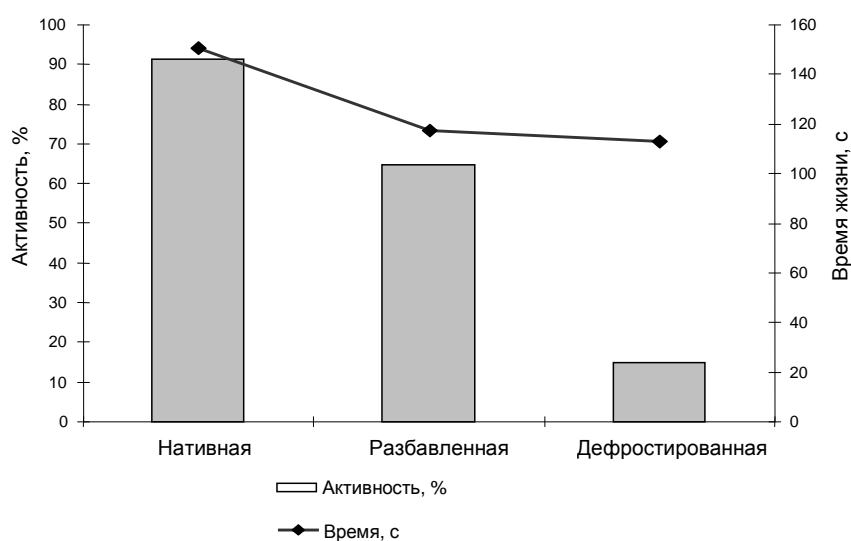


Рис. 1. Изменение качества спермы белорыбицы при использовании криосреды № 3

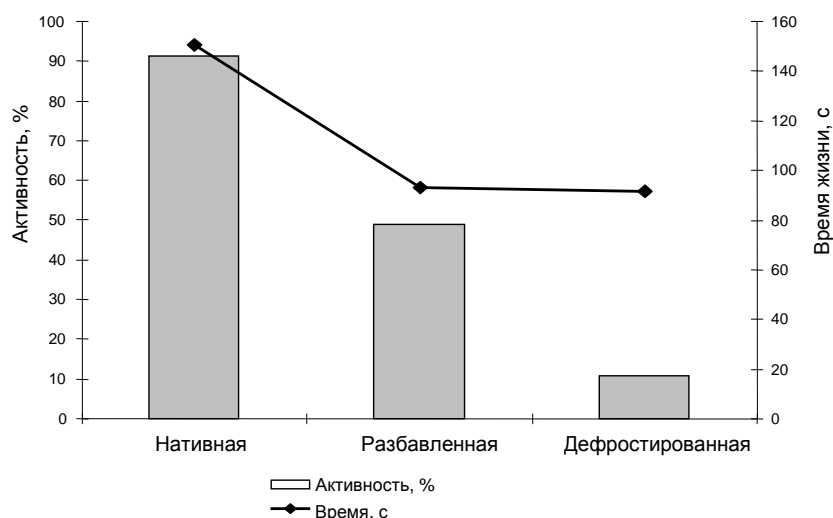


Рис. 2. Изменение качества спермы белорыбицы при использовании криосреды № 4

При исследовании изменения активности и времени жизни сперматозоидов белорыбицы в процессе низкотемпературного консервирования в двух криосредах установлена закономерность снижения качества разбавленной и дефростированной спермы. Подобное явление отмечает ряд исследователей [18–22].

Таким образом, в результате исследований определен оптимальный состав криозащитной среды для низкотемпературного консервирования спермы белорыбицы.

Заключение

В результате исследований по использованию криосред различной солёности установлено, что оптимальная солёность, при которой спермии деактивируются, но при этом остаются жизнеспособными, составляет 7 ‰ для спермы белорыбицы. Это позволяет рекомендовать данный уровень солёности для составления криозащитных сред.

При проведении процесса глубокого замораживания и долгосрочного хранения при температуре $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ подобраны оптимальные криосреды для спермы белорыбицы. Установлено, что большее количество выживших активных спермиев наблюдается при использовании в качестве криозащитной среды № 3, в состав которой входят сахароза и маннит.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Струбалина Н. К. Из истории освоения рыбных богатств Каспия и Астраханского края. – Волгоград: Нижне-Волж. книж. изд-во, 1989. – 145 с.
2. Сокольский А. Ф., Сокольская Н. И., Сокольская Е. А. Состояние запасов и пути сохранения белорыбицы в Волго-Каспийском бассейне // Фундаментальные аспекты биологии и решение актуальных экологических проблем: материалы Междунар. науч.-практ. конф. – Астрахань: Изд-во АГТУ, 2008. – С. 230–233.
3. Белорыбица и кумжа Каспийского бассейна / Г. Г. Матишов, В. П. Иванов, Г. М. Магомедов и др. / под ред. акад. Г. Г. Матишова. – Ростов на/Д: Изд-во ЮНЦ РАН, 2010. – 84 с.
4. Методическое пособие по криоконсервации спермы карпа, лососевых и осетровых рыб / Л. И. Цветкова, С. И. Савушкина, Л. Н. Титарева. – М.: ВНИИПРХ, 1997. – 10 с.
5. Савушкина С. И. Качество производителей сибирского осетра, при получении которых использована криоконсервированная сперма // Аквакультура и интегрированные технологии: проблемы и возможности: материалы Междунар. науч.-практ. конф., посвященной 60-летию Московской рыбноводно-мелиоративной опытной станции и 25-летию ее реорганизации в ГНУ ВНИИР, Москва, 11–13 апреля 2005 г. / ГНУ ВНИИ ирригационного рыбноводства. – Т. 2. – М., 2005. – С. 227–232.
6. Цветкова Л. И., Каранова М. В. Влияние антифризных гликопротеинов на качество криоконсервированной спермы рыб // Цитология. – 1994. – Т. 36, № 11. – С. 1157–1163.
7. Белоус А. М., Гордиенко Е. А., Розанов Л. Ф. Биохимия мембран. Замораживание и криопротекция. – М.: Высш. шк., 1987. – 80 с.

8. *Фазовые переходы и стеклование в водных растворах оксиэтилированного глицерина при температурах ниже 273 К* / Е. Н. Животова, А. В. Зинченко, Л. Г. Кулешова и др. // *Биофизика живой клетки*. – 2008. – Т. 9. – С. 52–53.
9. *Опыт криоконсервации спермы белорыбицы и белуги* / В. И. Ананьев, А. А. Андреев, Т. С. Голованова и др. // *Рыбное хозяйство. Сер.: Аквакультура. Аналит. информ. «Проблемы сохранения геномов лососевых и осетровых рыб»*. – М.: ВНИЭРХ, 1998. – Вып. 1. – С. 25–36.
10. *Оплодотворяемость икры белорыбицы после криоконсервации репродуктивных клеток в условиях сверхнизкой температуры* / Г. В. Земков, М. А. Егоров, А. М. Тихомиров, Т. И. Акимочкина // *Материалы VIII Междунар. науч. конф. «Эколого-биологические проблемы бассейна Каспийского моря»*, 11–12 октября 2005 г. – Астрахань: Изд. дом «Астраханский университет», 2005. – С. 88–89.
11. *Персов Г. М. Дозирование спермиев как способ управления оплодотворением яйцеклеток осетровых* // *Докл. АН СССР*. – 1953. – Т. 90, № 6. – С. 1183–1185.
12. *Адлер А. П. Введение в планирование эксперимента*. – М.: Металлургия, 1969. – 271 с.
13. *Лакин Г. Ф. Биометрия*. – М.: Высш. шк., 1973. – 343 с.
14. *Cryopreservation of rainbow trout sperm by deep freezing* / Billard R. et al. // *Reprod. Nutr. Dev.* – 1980. – Vol. 20. – P. 1859–1868.
15. *Sperm physiology and quality // Broodstock Management and egg and larval quality* / R. Billard, J. Cosson, L. W. Crim, M. Suquet / N. Bromage and R. J. Roberts. Eds. Blackwell Science, 1995. – P. 25–52.
16. *Хлебович В. В. Критическая соленость биологических процессов*. – Л.: Наука, 1974. – 238 с.
17. *Исследование влияния ультразвука на мембраны клеток* / В. Д. Купник, С. В. Мысик, В. Н. Ткаченко, В. В. Товстяк // *Взаимодействие ультразвука с биологической средой: тез. докл. Всесоюз. конф.*, Ереван, 1–4 июня 1983 г. – М., 1983. – С. 43.
18. *Копейка Е. Ф., Новиков А. Н. Криоконсервирование спермы рыб* // *Криоконсервирование клеточных суспензий* / под ред. А. А. Цуцаевой. – Киев: Наук. думка, 1983. – С. 204–215.
19. *Fahy G. M. The relevance of cryoprotectant «toxicity» to cryobiology* // *Cryobiology*. – 1986. – Vol. 23. – P. 1–13.
20. *The basis for toxicity of certain cryoprotectants: a hypothesis* / T. Aracawa, J. F. Carpenter, Y. A. Kita, J. H. Crowe // *Cryobiology*. – 1990. – Vol. 27. – P. 401–405.
21. *Розанова Н. А., Розанов С. И. Биохимические аспекты проблемы криоконсервации* // *Биофизика живой клетки*. – 1994. – Т. 6. – С. 40–46.
22. *Drokin S. I., Kopeika E. F. Motility of and Phospholipid Content in Cryoreserved Spermatozoa of Three Sturgeon Species* // *Sturgeon Quarterly*. Oct. – 1996. – Vol. 4, N 4. – P. 8–10.

Статья поступила в редакцию 28.02.2011

**DEVELOPMENT OF CRYOPROTECTIVE MEDIUMS
FOR LOW TEMPERATURE PRESERVATION
OF WHITE SALMON'S
(STENODUS LEUCICHTHYS GÜLDENSTÄDTI, 1772) SPERM
WITH A VIEW OF GENE POOL CONSERVATION**

A. M. Tikhomirov, M. M. Bogatyreva, A. A. Krasilnikova

Illegal trade has nearly full destroyed spawning population of white salmon. In this situation the main object is to find the way of its gene pool conservation. Cryopreservation is one of the most attractive and highly developed directions of conservation of rare vanishing species. The urgent object of modern cryobiology is an elaboration of effective cryoprotectants to defend cells from damage in the process of deep freezing and storage of biological material. The salinity of medium for low temperature conservation of white salmon sperm is fixed. The optimal composition of cryoprotective medium is found.

Key words: cryopreservation, white salmon, sperm, medium, cryoprotectant.