



004609121

На правах рукописи

АКИМОЧКИНА ТАТЬЯНА ИВАНОВНА

**ЦИТОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ СПЕРМИЕВ ЦЕННЫХ
ВИДОВ РЫБ ВОЛГО-КАСПИЙСКОГО БАССЕЙНА И ИХ
ИЗМЕНЕНИЕ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УСЛОВИЙ
КРИОКОНСЕРВАЦИИ**

03.03.04 – клеточная биология, цитология и гистология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Астрахань – 2010

Работа выполнена на кафедре биотехнологии и биозкологии
Государственного образовательного учреждения высшего
профессионального образования «Астраханский государственный
университет» Федерального агентства по образованию

Научный руководитель: доктор биологических наук
Земков Герман Вениаминович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Алтуфьев Юрий Владимирович

доктор биологических наук, профессор
Каниева Нурия Абдрахимовна

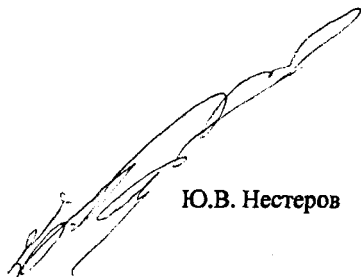
Ведущая организация: Всероссийский институт
экспериментальной ветеринарии
им. Я.Р. Коваленко
(ВИЭВ РАСХН, г. Москва)

Защита состоится «30» июня 2010 года в 14:30 часов на заседании
объединенного диссертационного совета ДМ 212.009.01 при Астраханском
государственном университете по адресу: 414000, г. Астрахань, пл.
Шаумяна, 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Астраханского
государственного университета по адресу: 414000, г. Астрахань, пл.
Шаумяна, 1.

Автореферат разослан «28» мая 2010 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук



Ю.В. Нестеров

Общая характеристика работы

АКТУАЛЬНОСТЬ ПРОБЛЕМЫ

Сокращение численности ценных и редких видов животного и растительного царства приводит к необходимости принятия срочных мер для их сохранения во всем генетическом многообразии (Державин А.Н., 1947; Кожин Н.И., 1953). В Волго-Каспийском бассейне наряду с традиционными отраслями промышленности, развивается добыча и переработка ископаемых углеводородов. Еще до нефтеразведки, на Каспии насчитывалось несколько ценных видов рыб, занесенных в Красную книгу (Васильченко, 1997; Кокоза, 1997).

Из имеющихся в настоящее время способов сохранения генофонда наиболее перспективным в сложившихся условиях является долговременная криоконсервация генетического материала с последующей возможностью его реализации для получения полноценных особей, как резерва восстановления численности (Вепринцев Б.Н. с соавт., 1984, 1989; Карнаухов В.Н., 1994; Багиров В.А. с соавт., 2004; Грищенко В.И. с соавт., 2004).

Одна из наиболее разработанных отраслей криобиологии - глубокое замораживание сперматозоидов. Это связано как с биологическими особенностями спермиев, делающими их наиболее подходящим объектом для замораживания, так и с большим практическим значением этих работ. Сперматозоиды обладают уникальными морфологическими, биохимическими и физиологическими характеристиками, резко отличающими их от остальных клеток. Разработка методов оценки качества семени животных в настоящее время чрезвычайно актуальна. Знание цитологических и функциональных особенностей спермиев даст возможность прогнозировать изменение их качества под действием различных факторов.

К настоящему времени накоплен обширный материал по криосохранению семенной жидкости различных пород сельскохозяйственных животных и различных диких видов млекопитающих (Курбатов А.Д. с соавт., 1988; Дьяконов Л.П. с соавт., 2004; Айбазов В.М. с соавт., 2004; Максудов Г.Ю., 2004; Жильцов Н.З. с соавт., 2007). Известно, что криоустойчивость спермиев сельскохозяйственных животных превышает таковую у рыб. Для теплокровных животных, в отличие от рыб, разработаны разнообразные методы оценки качества половых клеток как до, так и после хранения их в криосреде (Максудов Г.Ю. с соавт., 1987). Изучению цитологических особенностей спермиев сельскохозяйственных животных посвящены многочисленные работы ряда авторов (Ойвадис Р.Н., 1980, 1985; Ойвадис Р.Н. с соавт., 1984; Соколовская И. с соавт., 1981; Буров В. А. с соавт., 1985; Наук В.А., 1991; Осташко Ф.И., 1978). Работы по цитологическим

особенностям спермиев рыб немногочисленны и посвящены преимущественно особенностям строения сперматозоидов осетровых видов, как наиболее важных объектов аквакультуры (Гинзбург А.С. с соавт., 1975; Детлаф Т.А. с соавт., 1981; Копейка Е.Ф., 1992). Имеются немногочисленные опубликованные данные по химическому составу семенной жидкости и спермиев карповых видов рыб (Жукинский В.Н. с соавт., 1988).

Что касается морфологических изменений спермиев рыб под влиянием низких и сверхнизких температур, и особенно в зависимости от состава криопротекторов, имеющиеся в научной литературе сведения также немногочисленны. Кроме того, отсутствуют публикации, отражающие перечень криповреждений клеток рыб на различном уровне организации. Именно цитоморфологический анализ служит вполне доступным методом оценки качества спермиев на этапе разработки криопротекторных смесей, что и было положено в основу настоящей исследовательской работы.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ. Изучить цитологические особенности спермиев некоторых ценных видов рыб Волго-Каспийского бассейна (осетровых, карповых, белорыбицы, окуня) и их изменение в зависимости от состава криозащитной среды, условий замораживания, хранения и размораживания биоматериала.

ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Изучить цитологические и функциональные особенности спермиев разных видов рыб в нативном состоянии.
2. Изучить морфофункциональные особенности сохранения спермиев рыб после воздействия низких температур в зависимости от состава искусственных криозащитных сред, температуры и других условий замораживания и хранения биоматериала.
3. Определить оплодотворяющую способность и цитоморфологическое состояние дефростированных спермиев рыб после различных сроков хранения в криосреде при использовании стандартных и модифицированных по составу криозащитных сред.
4. Разработать морфологические критерии оценки качества половых клеток после размораживания и разработать базу данных морфологических нарушений спермиев рыб в зависимости от состава криозащитной среды, условий замораживания, хранения и размораживания биоматериала.
5. Разработать способы повышения подвижности и оплодотворяющей способности спермиев рыб после дефростации.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучены и обобщены морфофункциональные особенности спермиев ценных видов рыб Волго-Каспийского бассейна, ранее фрагментарно описанных в современных информационных источниках. В настоящей работе на основе микроскопического анализа впервые дана цитологическая характеристика сперматозоидов белорыбицы, речного окуня и карповых видов рыб, а также проведен сравнительный анализ особенностей головной и хвостовой частей спермиев данных видов рыб.

Впервые дана характеристика морфофункциональных изменений спермиев рыб до и после криоконсервации в зависимости от состава криопротекторных сред, условий замораживания, хранения и размораживания. Выявлены наиболее типичные криоповреждения спермиев рыб на клеточном уровне организации.

Разработана матрица степени морфофункциональных нарушений спермиев рыб в зависимости от различного состава стандартных криопротекторных сред и их модификаций, а также разработаны и апробированы оригинальные составы криопротекторных сред, удовлетворяющих сохранению основных морфофункциональных показателей спермиев после криоконсервации.

На основании результатов проведенных серийных экспериментальных работ доказаны приемлемость замораживания и хранения семенной жидкости рыб в условиях низкой температуры (минус 22 градуса по Цельсию), что является альтернативой криоконсервации биоматериала в жидком азоте.

На основании проведенных опытов по оценке оплодотворяющей способности дефростированной семенной жидкости зарегистрировано оплодотворение яйцеклеток, что указывает на необходимость дальнейших корректив традиционной биотехники искусственного воспроизводства рыб.

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

Содержанием данной работы являются материалы цитологической и функциональной характеристики половых клеток рыб в норме и на фоне низкотемпературного воздействия. Полученные данные позволили выявить цитологические особенности строения спермиев в зависимости от ряда условий криоконсервации, а именно от состава криопротекторной среды, способа замораживания, температурных условий хранения и дефростации биоматериала.

Практическая значимость работы заключается в расширении существующих представлений о характере повреждения половых клеток в результате воздействия низких и сверхнизких температур. Основным показателем негативного влияния замораживания спермиев является набухание их головной части, что рекомендуется использовать в качестве

тест-критерия качественного состояния спермиев после хранения их в замороженном виде в условиях криобанка.

Полученные данные являются основой для последующих исследований с целью использования криоконсервированной семенной жидкости в практике искусственного осеменения репродуктивных клеток ценных видов рыб, а также позволит снизить затраты на содержание производителей на рыбоводных заводах.

Результаты проведенного комплекса исследований рекомендуется использовать в рыбоводной практике, а также специалистам в области криобиологии и криоконсервации спермиев и других видов клеток и тканей животных и человека.

Полученные данные могут быть внедрены для преподавания соответствующих разделов цитологии, гистологии, физиологии человека и животных, криобиологии. Результаты исследования могут быть использованы для написания монографий, и служить в качестве методической основы для последующих исследований в этой области.

ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ

1. По внешним морфологическим признакам спермии различных видов рыб отличаются формой и размерами головной части, а также продолжительности поступательного и колебательного движения, отражающего различные энергетические ресурсы в зависимости от вида рыб.

2. Одной из причин морфофункциональных нарушений спермиев при замораживании семенной жидкости является гиперосмотичность плазмы за счет внесения водных растворов различных компонентов криопротекторной среды. Дополнительное введение воды в семенную жидкость перед замораживанием усиливает акустическую эмиссию, что приводит к деструктивным изменениям спермиев.

3. Семенная жидкость рыб после хранения ее при низкой и сверхнизкой температуре сохраняет способность к оплодотворению яйцеклеток, однако необходимо внести коррективы в традиционные способы искусственного осеменения.

4. Функциональную активность дефростированной семенной жидкости рыб возможно увеличить за счет внесения биологически активных веществ различной природы.

АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ

Результаты работы доложены и обсуждены на VIII Международной научной конференции «Эколого-биологические проблемы бассейна Каспийского моря» (Астрахань, 2005); на студенческой конференции Астраханского государственного университета (Астрахань, 2006); на IX Международной научной конференции «Эколого-биологические проблемы

бассейна Каспийского моря» (Астрахань, 2006); в докладах Московского общества испытателей природы «Биотехнология - охране окружающей среды (Москва, 2006); на Международной научной студенческой конференции «Научный потенциал студенчества - будущему России» (Ставрополь, 2007); на Четвертом Московском международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2007); на Международной конференции «Биоресурсы, биотехнологии, экологически безопасное развитие регионов Юга России» (Сочи, 2007); на Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы биологии воспроизводства животных» (Дубровицы, 2007); на Международном конгрессе молодых ученых, студентов и аспирантов «Перспектива - 2007» (п. Эльбрус, 2007); на Международной конференции «Генетика, селекция, гибридизация, племенное дело и воспроизводство рыб» (Санкт-Петербург, 2008); на II Международной научно-практической конференции «Экология биосистем: проблемы изучения, индикации и прогнозирования» (Астрахань, 2009).

ПУБЛИКАЦИИ

По теме диссертации опубликовано 22 работы, из них 3 в изданиях, рекомендованных ВАК.

ОБЪЕМ И СТРУКТУРА ДИССЕРТАЦИИ

Диссертация изложена на 153 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материала и методов исследований, глав собственных исследований, обсуждения, выводов, практических рекомендаций и списка использованной литературы. Указатель литературы включает в себя 134 отечественных и 152 иностранных источников. Работа содержит 8 таблиц, 34 фотографии, 1 приложение.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования являлись репродуктивные клетки самцов русского осетра (*Acipenser guldenshtadti*), севрюги (*Acipenser stellatus*), белорыбицы (*Stenodus leucichthys leucichthys*), пестрого толстолобика (*Aristichthys nobilis*), белоро амура (*Stenopharyngonod idella*), а также самок севрюги (*Acipenser stellatus*). Семенную жидкость и икру отбирали у репродуктивных самцов и самок рыб, резервированных для искусственного воспроизводства на Александровском, Кизанском, Бертольском и Волжском рыбоводных заводах Астраханской области. Кроме того, в весенний период для сравнительного анализа отлавливали половозрелых самцов и самок речного окуня (*Perca fluviatilis*).

Качество нативной спермы определяли по двум показателям: по морфологической целостности спермиев и их подвижности.

Для морфологической оценки спермиев приготавливали мазки семенной жидкости, взяв за основу методику, используемую для изготовления и окраски мазков крови (Иванова Н.Т., 1982). Препараты окрашивали азур-эозином по Романовскому. Микроскопировали мазки спермы при увеличении 8×40 и 8×100 . Морфологические особенности описывали и затем фотографировали с помощью видеоокуляра НВ 35, копируя с монитора компьютера.

Подвижность спермиев оценивали по времени поступательного и колебательного движения спермиев по общепринятой методике (Гинзбург А.С. с соавт., 1969). По шкале Персова (Персов Г.М., 1941) оценивали процент подвижных клеток в пределах поля зрения микроскопа.

При криоконсервации семенной жидкости были использованы ряд стандартных (Ананьев В.И. с соавт., 1998 а) и модифицированных нами криозащитных сред. Качество спермиев после дефростации также оценивали по морфологической целостности спермиев и их подвижности.

Для разработки и модификации криозащитных сред на специально подготовленной воде приготавливали растворы веществ в объеме 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1; 1,5; 2 мл на 0,5 мл спермы. После определения оптимальной концентрации, которую оценивали по подвижности спермиев, все вещества смешивали. Приготовленную смесь (криозащитную среду) вносили в семенную жидкость в расчете по объему 1:1 (общепринятое соотношение) и вновь наблюдали за подвижностью спермиев.

Было испытано два способа криоконсервации семенной жидкости русского осетра: ступенчатое замораживание в пробирках Эпендорфа и сверхбыстрое замораживание в гранулах до 80-и градусов с последующим погружением в жидкий азот для длительного хранения. Также было испытано два уровня температурного режима замораживания и хранения семенной жидкости рыб: при минус 196 в условиях жидкого азота и минус 22 градуса по Цельсию в морозильной камере.

Размораживание криоконсервированной семенной жидкости осуществляли тремя способами: в термостате при температуре 37°C , в холодильнике при 8°C и при комнатной температуре.

Для стимуляции подвижности спермиев применяли следующие химические активаторы: растворы эпина 10^{-6} и 10^{-4} мг/л, циркона 10^{-4} мг/л, Na_2CO_3 0,7%, NaHCO_3 0,7%, селенактива, метилтестостерона, глюкозы 0,7%, MgSO_4 0,7%, K_2HPO_4 0,7%, KCl 0,7%, CaCl_2 0,7%, аскорбиновой кислоты 0,7%, α -токоферола 0,7%, сыворотка эмбриональная телячья. Для стимуляции двигательной активности спермиев на предметное стекло рядом с каплей семенной жидкости наносили каплю раствора стимулятора, быстро смешивали ее со спермой и микроскопировали, фиксируя

количество активных спермиев в процентах, время подвижности, а также характер движения. Контролем служила семенная жидкость, которую активировали водопроводной водой.

Осеменение икры севрюги дефростированной семенной жидкостью осуществляли полусухим способом. В связи с использованием дефростированных спермиев, подвижность которых была значительно ниже нативных, семенную жидкость севрюги разводили водой в 10 раз. Оплодотворение осуществляли в течение 20 мин, из расчета 30 мл спермы на 300 икринок. Икру обесклеивали тальком в течение 10 мин. Развитие икры происходило в инкубационных аппаратах. В качестве контроля служили аппараты с нативной икрой.

Осеменение икры речного окуня осуществляли мокрым способом. Для этого икру размещали в чашки Петри по 100 штук, далее приливали речную воду, вносили порцию семенной жидкости и перемешивали в течение 5 мин, после этого икру отмывали той же водой. Осеменение проводили при комнатной температуре. Инкубацию икры осуществляли в лабораторных условиях. Во время инкубации три раза в сутки меняли воду на свежую, и ежедневно регистрировали стадии развития эмбрионов под микроскопом. Наблюдения проводили в течение пяти дней после обнаружения явных признаков деструкции зародышей.

Для установления достоверности полученных данных при анализе результатов исследования все материалы были подвергнуты статистической обработке (Лакин Г.Ф., 1973; Плохинский Н.А., 1980). При этом определяли средние арифметические величины (M), средние ошибки (m) и вероятность различия (p) по критерию Стьюдента (Плохинский Н.А., 1980).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты проведенного микроскопического анализа позволили выявить, ряд цитологических и функциональных особенностей у спермиев изученных нами видов рыб. Спермии осетровых видов рыб имеют удлиненную головку палочковидной формы с расширением у основания. Хвостовая часть вытянута, отчетливо видна, без признаков искривления и фрагментации (Рис. 1 А, Б).

По данным опубликованным в научной литературе общая длина спермиев осетровых составляет около 0,05 мм, длина головки 0,01 мм, а ширина 0,001-0,002 мм (Детлаф Т.А. с соавт., 1981). Соотношение длины головной и хвостовой части спермия составляет примерно 1:4. Сравнивая спермии различных видов рыб, указанное соотношение сохраняется. Кроме того, средняя часть сперматозоида - место соединения жгутика с

головной частью имеет незначительное утолщение (по сравнению со спермием теплокровных животных), а длина жгутика заметно больше.

Спермии белорыбицы в норме имеют округлую форму головной части со значительным расширением у основания. Хвостовая часть также вытянута и без признаков повреждения и деформации (Рис. 1 В). Спермии карповых видов рыб и речного окуня, в отличие от осетровых и белорыбицы, имеют заметно меньшие размеры. Головки спермиев округлой формы, хвостовые части короткие и изогнутые (Рис. 1 Г, Д, Е).

Сперматозоиды неподвижны в спермиальной жидкости и приобретают подвижность только в воде. При активации спермиев водой они совершают быстрые поступательные движения, которые спустя некоторое время замедляются, переходят в колебательные, и наконец, полностью прекращаются.

Время активности сперматозоидов русского осетра и севрюги в норме составляет 10-15 мин., причем время поступательного движения длится около 3 мин. Время поступательного движения спермиев белорыбицы 45-70 сек, колебательная активность может длиться до 7 мин. Общее время подвижности нативных спермиев карповых видов рыб и речного окуня составляет 0,20-0,50 мин. При этом спермии совершают очень активные вращательные движения, колебательная подвижность непродолжительна.

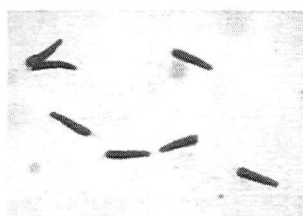
По данным ряда авторов (Гинзбург А.С. с соавт., 1975; Детлаф Т.А. с соавт., 1981), основной структурой, обеспечивающей движение спермиев, является осевой комплекс фибрилл, который расположен в хвостовой части спермия, по бокам от этого комплекса отходят два тонких выроста, которые, как полагают авторы, обеспечивают ундуляцию жгутика. Фибриллярная структура ресничек и жгутиков свойственна всем клеткам, в том числе и сперматозоидам, имеющим в своем составе сократительный белок, близкий по своим свойствам актомиозину поперечнополосатых мышц, обладающий АТФазной активностью (Крепс Е.М., 1979). Имеются данные, свидетельствующие об открытии белка динеина, который, как полагают авторы, обеспечивает ундуляцию хвостовой части спермиев мышцы (Vorobjev et al., 2001; McGrath et al., 2003).

Сравнительная цитологическая характеристика спермиев осетровых, карповых видов рыб, а также белорыбицы и речного окуня представлена на рис. 1.

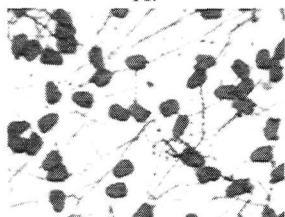
Таким образом, выявленные цитологические и физиологические особенности спермиев изученных нами видов рыб заключаются в различной форме и размерах головной части спермиев, длине хвостовой части, а также времени и интенсивности движения, что оказывает влияние на их криоустойчивость и характер изменений после воздействия низких температур. Как показали исследования, наиболее чувствительной к низкотемпературным воздействиям является головная часть спермиев.



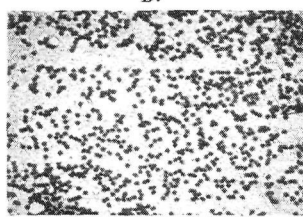
А.



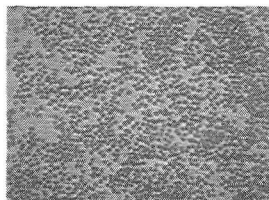
Б.



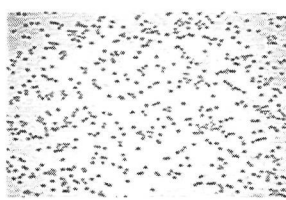
В.



Г.



Д.



Е.

Рис. 1. Нативная семенная жидкость русского осетра (А), севрюги (Б), белорыбицы (В), пестрого толстолобика (Г), белого амура (Д) и речного окуня (Е). Окрашивание азу-эозином по Романовскому. Ув. об. $\times 100$ (А-В), $\times 40$ (Г-Е), ок. $\times 8$.

После дефростации при использовании различных по составу стандартных криозащитных сред у спермиев русского осетра и севрюги были обнаружены различные нарушения с явными признаками деструкции: изменение формы головок спермиев, их сморщивание или, напротив, набухание, шизоцитоз, а также разрушение хвостовой части

(Рис. 2 А). Данные нарушения удалось предотвратить, используя стандартные криозащитные среды без включения в их состав углеводов, что приводило к склеиванию морфологически полноценных спермиев друг с другом (Рис. 2 Б), а также путем разработки и использования для защиты клеток от повреждений модифицированных криозащитных сред.

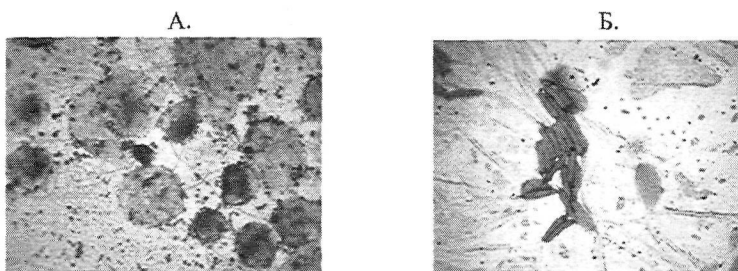


Рис. 2. Дефростированная семенная жидкость русского осетра, замороженная с добавлением (А) и без добавления (Б) углеводов в криозащитную среду. Окрашивание азур-эозином по Романовскому. Ув. об. $\times 100$, ок. $\times 8$.

При использовании модифицированных криозащитных сред различного состава удавалось сохранить без изменений головки спермиев, в то время как хвостовые части разрушались (Рис. 3). Это, по всей видимости, и явилось одной из причин снижения подвижности дефростированных спермиев.

Оценивая качественное состояние спермиев осетровых по их подвижности после дефростации, нами отмечен факт явной инактивации половых клеток во всех использованных стандартных и модифицированных криозащитных средах. Количество подвижных клеток после дефростации составляло 5-15%. Общее время подвижности дефростированных спермиев севрюги сокращалось в два раза, а русского осетра оставалось без изменений.



Рис. 3. Мазок дефростированной семенной жидкости русского осетра с добавлением модифицированной криозащитной среды. Окрашивание азур-эозином по Романовскому. Ув. об. $\times 100$, ок. $\times 8$.

Нарушения в виде набухания спермиев, деформации головки и потери хвостовой части были обнаружены и у дефростированных спермиев карповых видов рыб при использовании стандартных криозащитных сред (Рис. 4 А). В ряде случаев происходило гелеобразование семенной плазмы, в связи с чем, сперматозоиды не удавалось выявить микроскопически (Рис 4 Б).

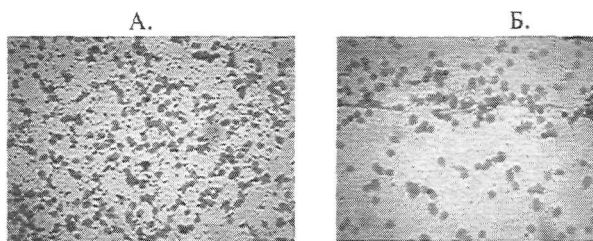


Рис. 4. Мазок дефростированной семенной жидкости белого амура (А) и пестрого толстолобика (Б) с добавлением стандартных криозащитных сред. Окрашивание азур-эозином по Романовскому. Ув. об. $\times 40$, ок. $\times 8$.

Добавление модифицированных криозащитных сред позволило избежать данные нарушения, однако были получены противоречивые результаты при использовании в качестве коагулянта гепарина. Отсутствие в составе криозащитной среды гепарина вызывало коагуляцию семенной жидкости толстолобика после дефростации (Рис. 5 А). И наоборот, использование среды без внесения гепарина, позволило избежать коагуляции семенной жидкости амура и сохранить клетки целыми (Рис. 5 Б). В целом, семенная жидкость этих видов рыб была очень густой и спермии не имели поступательного движения, в редких случаях отдельные спермии совершали слабые колебательные движения.

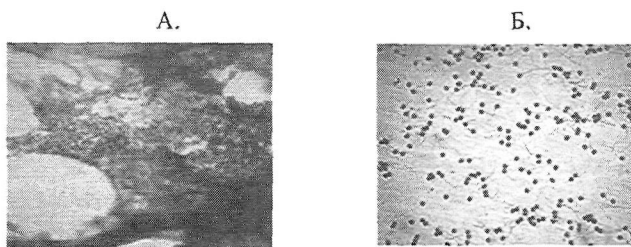


Рис. 5. Мазок дефростированной семенной жидкости белого амура (А) и пестрого толстолобика (Б) с добавлением модифицированной криозащитной среды. Окрашивание азур-эозином по Романовскому. Ув. об. $\times 40$, ок. $\times 8$.

В плане обсуждения экспериментальных данных по криоконсервации семенной жидкости белорыбицы в первую очередь важно отметить, что в дефростированной семенной жидкости по скорости и по характеру движения спермии белорыбицы не отличались от осетровых. Также показана зависимость деструктивных признаков клеток белорыбицы от состава криозащитных сред. Наиболее выраженные изменения на клеточном уровне заключались в том, что спермии белорыбицы имели округлую форму, с набуханием спермиев и их хвостовой части в одних случаях (Рис. 6 А) и явными признаками разрушения спермиев в других (Рис. 6 Б).

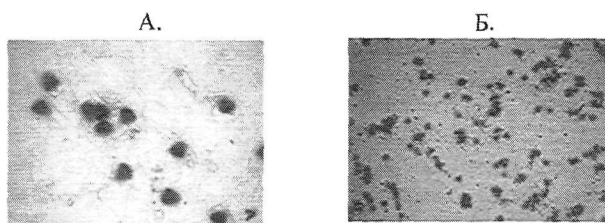


Рис. 6. Дефростированная семенная жидкость белорыбицы. Окрашивание азур-эозином по Романовскому. Ув. об. $\times 100$, ок. $\times 8$.

Из всех изученных нами видов спермии окуня оказались наиболее устойчивыми при хранении в условиях низких и сверхнизких температур. После дефростации спермии оставались неповрежденными и сохраняли свою активность при использовании разнообразных по составу стандартных и модифицированных криозащитных сред (Рис. 7). После дефростации количество подвижных спермиев окуня снижалось незначительно. По характеру и продолжительности движения клетки окуня

также заметно превосходили спермии остальных изученных видов рыб. Возможно, такая криорезистентность спермиев окуня связана с размерами и формой их головной части по сравнению с осетровыми, а именно, чем меньше по размеру клетки, тем меньше они испытывают физическое напряжения во время замораживания. Таким образом, морфологическая целостность, высокая функциональная активность, целостность ядра спермиев окуня указывает на высокую толерантность не только клетки, но и ее генетического материала.



Рис. 7. Дефростированная семенная жидкость речного окуня. Окрасивание азур-эозином по Романовскому. Ув. об. x40, ок. x8.

Помимо состава криозащитных сред, одну из главных ролей в практике криоконсервации играют условия замораживания и хранения биологического материала. Существуют различные технологии замораживания спермиев: замораживание в гранулах, поливиниловых соломинках, хлорвиниловых ампулах, пробирках Эпендорфа и другие. Выбор контейнера напрямую определяет способ замораживания и размораживания. Чаще всего при работе со спермой рыб применяют многоступенчатые режимы охлаждения, когда скорости его варьируют в разных интервалах температур на разных этапах замораживания. При этом во многих случаях отклонения на десятые доли градуса от оптимального температурного режима консервации чреваты критическими последствиями (Ананьев В.И. с соавт., 1998 б).

При криоконсервации семенной жидкости русского осетра ступенчатым способом в пробирках Эпендорфа в одном случае спермии после дефростации изменили свою форму и частично утратили хвостовую часть, в другом случае были близки к нативной. Что, по всей видимости, было связано с составом используемых криозащитных сред: в первом случае использовался стандартная среда, в состав которой входили сахара и маннит, во втором стандартная среда без внесения углеводов.

Сверхбыстрое замораживание в гранулах с использованием тех же криозащитных сред привело к противоположному результату. Спермии, замороженные сверхбыстрым способом в гранулах с использованием стандартной среды с углеводами, морфологически более близки к нативным, в то время как спермии, замороженные с использованием

стандартной среды без углеводов, изменили свою форму и частично утратили хвостовую часть.

Таким образом, варьирование способов замораживания не позволило получить однозначного результата, что вероятно связано с различиями в криоустойчивости спермиев рыб.

Обращаясь к источникам научной информации по данной проблеме все опубликованные материалы за редким исключением, посвящаются вопросам замораживания и хранения репродуктивных клеток рыб при сверхнизкой температуре. Однако полученные нами данные показали, что в семенной жидкости русского осетра, замороженной с использованием стандартных криозащитных сред и хранившейся при -196°C и при -22°C цитоморфологически спермии не отличаются друг от друга (Рис. 8 А, Б). Замораживание семенной жидкости осетровых при низкой температуре -22°C существенно не снижает процент подвижных спермиев.

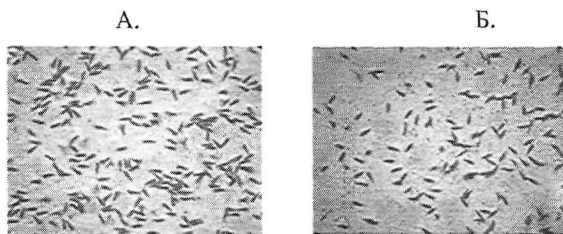


Рис. 8. Дефростированная семенная жидкость русского осетра, замороженная и хранившаяся при -196°C (А) и при -22°C (Б). Окрашивание азур-эозином по Романовскому. Ув. об. $\times 40$, ок. $\times 8$.

При резком изменении температурного режима наблюдается деформация спермиев, изменение формы и набухание головной части спермиев, разрушение хвостовой части, а также резкое снижение их числа (Рис. 9).

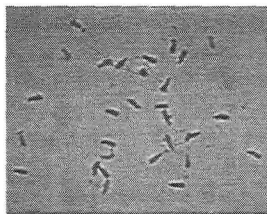


Рис. 9. Дефростированная семенная жидкость русского осетра, температурные условия хранения которой были нестабильными. Окрашивание азур-эозином по Романовскому. Ув. об. $\times 40$, ок. $\times 8$.

Набухание и предшествующие лизису признаки, по всей вероятности, происходят в результате изменения осмотического давления плазмы и внутриклеточной жидкости. В настоящее время нет общей теории, объясняющей механизмы повреждения клеток и степени денатурации белков в процессе криоконсервации биологического материала.

Не меньшее значение для успеха криоконсервации имеет способ размораживания и последующего манипулирования дефростированной спермой. Семенная жидкость белорыбицы, дефростированная в термостате при 37°C, была очень густой, при смешивании с водой происходило гелеобразование семенной плазмы. Головки спермиев оставались без изменений, незначительная часть набухала и была деформирована. Хвостовая часть разрушалась полностью и спермии были неподвижны. При дефростации семенной жидкости медленным способом в холодильнике при 8°C происходила деструкция спермиев. В большинстве случаев головки спермиев разрушались полностью, немногочисленная часть набухала. Частично сохранялись хвостовые части спермиев. Наиболее оптимальным способом дефростации семенной жидкости оказалось размораживание при комнатной температуре. Семенная жидкость после дефростации при комнатной температуре была нормальной консистенции. Микроскопический анализ показал, что головки спермиев также остались без изменений, незначительная часть набухала. Хвостовые части спермиев также не разрушались и были отчетливо видны (Рис. 10). Однако после дефростации спермии теряли подвижность, что, возможно было вызвано агрегацией спермиев и спутыванием их хвостовых частей.

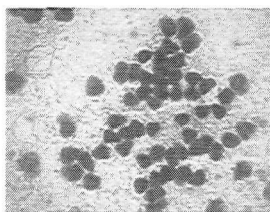


Рис. 10. Семенная жидкость белорыбицы, дефростированная при комнатной температуре. Окрашивание азу-эозином по Романовскому. Ув. об. x100, ок. x8.

Решая многие вопросы по проблеме криоконсервации репродуктивных клеток животных и, в частности, спермиев, основным и широко распространенным критерием качества являлась и до сих пор используется их подвижность. Вместе с тем накапливались и результаты

морфологических нарушений спермиев в результате замораживания семенной жидкости в жидком азоте, что привело в использовании результатов структурного анализа. В последующих исследованиях появилось несколько работ, в которых авторы привели данные применения оплодотворяющей способности спермиев после дефростации в качестве основного критерия функционального состояния спермиев (Ананьев В.И. с соавт., 1998 б; Пронина Н.Д., 2004). Связь морфологических нарушений и оплодотворяющей способности спермиев показана многими авторами (Соколовская И. с соавт., 1981; Blom E., 1973; Saacke R.G., 1968, 1970, 1972; Sato H. et al., 1984; Schoysman R. et al., 1985).

После дефростации семенной жидкости для осеменения икры севрюги наибольшее количество подвижных спермиев составляла 10-15 %, а скорость подвижности клеток по сравнению с нативными была крайне низкой. Несмотря на столь низкие показатели качественной характеристики половых клеток, нами зарегистрирован факт оплодотворения и дальнейшего развития эмбрионов севрюги до выклева предличинок. Количество оплодотворенной икры (оценка на стадии гастрюлы) по трем самкам колебалось и составило 11; 13; 22 %. Считая от общего количества оплодотворенной икры, заложенной на инкубацию, выклев предличинок составил лишь в одном случае на уровне около 5%. От остальных самок выклева предличинок не наблюдали, в связи с тем, что после стадий дробления и гастрюляции развитие приостановилось.

Несмотря на столь низкие результаты опытов по оплодотворению икры севрюги дефростированной семенной жидкостью, полученные нами фактические данные согласуются с опубликованными работами (Ананьев В.И. с соавт., 1998 а, 1998 б; Савушкина С.И., 1999; Цветкова Л.И. с соавт., 1999). Для дальнейших исследований полученные данные, прежде всего, доказывают возможность практического использования криоконсервированной жидкости в рыбоводной практике, а также свидетельствуют о функциональной активности генетического материала.

Несмотря на отсутствие видимых нарушений в половых клетках окуня, оплодотворяемость в искусственных условиях практически равна нулю. Аномалии дробления-деления оплодотворенной икры окуня мы относим к несовершенству биотехники искусственного осеменения ооцитов. Биотехника искусственного осеменения икры речного окуня практически не разработана, поэтому полученные нами фактические материалы следует считать предварительными, но весьма необходимыми для совершенствования приемов и способов не только для оплодотворения *in vitro*, но и для разработки условий инкубации эмбрионов. Причем, как показали результаты, наиболее высокий отход икры происходит на ранних стадиях развития. Потомство осетровых видов рыб, полученное с использованием криоконсервированной спермы, по рыбоводно-биологическим показателям не отличается от такового, полученного

традиционным способом, за исключением нескольких худших показателей на ранних стадиях зародышевого развития (Савушкина С.И., 1999).

Большое значение для достижения максимального оплодотворения икры криоконсервированной спермой имеет иницирование подвижности сперматозоидов после размораживания. Испытание различных активаторов, составленных на основе буферных растворов с разными значениями pH и водных растворов солей, сахаров, фитогормона эпина, АТФ, аминокислот позволило определить оптимальные стимуляторы движения спермиев для каждого вида рыб.

Из всех веществ положительный эффект на дефростированные спермии русского осетра оказали метилтестостерон и раствор эпина 10^{-6} мг/л. Под влиянием метилтестостерона время поступательного движения дефростированных спермиев было значительно выше, чем до криоконсервации. Процент подвижных спермиев с нуля поднялся до 6,33%. Раствор эпина 10^{-6} активировал около 5% спермиев. Клетки начинали активные колебательные движения спустя 2,12 мин после воздействия стимулятора. При использовании раствора эпина 10^{-4} слабые колебательные движения были зарегистрированы у единичных клеток.

Полученные данные по воздействию различных стимуляторов на спермии русского осетра представлены в таблице 1.

Таблица 1

Влияние растворов стимуляторов на двигательную активность дефростированных спермиев русского осетра

	Процент подвижных				Время подвижности (мин)			
	$M \pm m$	n	δ	CV %	$M \pm m$	n	δ	CV %
Раствор эпина 10^{-6}	4.33 ± 0.67	3	1.15	26.65	3.22 ± 0.15	3	0.26	7.98
Раствор Na_2CO_3 0,7%	2.67 ± 0.33	3	0.58	21.65	3.5 ± 0.30	3	0.53	15.05
Раствор метилтестостерона	6.33 ± 0.88	3	1.53	24.12	5.46 ± 0.32	3	0.55	10.11
Раствор селенактива	0	-	-	-	0	-	-	-

Обсуждая полученные результаты по стимуляции подвижности спермиев белорыбицы после их хранения в жидком азоте, существенное значение оказало внесение питательных веществ. Использование сыворотки эмбриональной телячьей для активации подвижности дефростированных спермиев белорыбицы позволило повысить процент подвижных спермиев с нуля до 3,67%. Время подвижности составило пять минут, что близко к показателям нативной семенной жидкости. Составление питательных сред носит исследовательский характер из-за

недостатка фактических данных по механизму криповреждений (Котляров Г.Ю. с соавт., 2004; Шишова Н.В. с соавт., 2004).

Сравнительные данные по активности спермиев белорыбицы после воздействия стимуляторов приведены в таблице 2.

Таблица 2

Влияние различных по составу растворов стимуляторов на двигательную активность спермиев белорыбицы после дефростации

Экспериментальные условия	Процент подвижных				Время подвижности (мин)			
	$M \pm m$	n	δ	CV %	$M \pm m$	n	δ	CV %
Раствор эпина 10^{-6} мг/л	3.5 ± 1.19	4	2.38	68.01	6.25 ± 4.62	4	9.2	148.02
Раствор эпина 10^{-4} мг/л	0	-	-	-	0	-	-	-
Раствор Na_2CO_3 , 0,7%	2.66 ± 1.45	4	2.52	93.37	3.67 ± 2.73	4	4.73	128.88
Сыворотка эмбриональная телячья	3.67 ± 0.67	4	1.15	31.49	5 ± 0.58	4	1	20
Раствор метилтестостерона	0	-	-	-	0	-	-	-
Раствор селенактива	0	-	-	-	0	-	-	-

Таким образом, комплексное использование различных способов стимуляции подвижности в целом сводятся к процессам репарации структурных элементов, ренатурации белковых соединений и восполнению питательных веществ, необходимых для обмена веществ в процессе жизнедеятельности клеток.

На основе проведенных исследований была разработана база данных «Морфологические нарушения спермиев рыб при различных условиях замораживания» и получено свидетельство об ее государственной регистрации (№ 2008620286). База данных предназначена для систематизации и хранения информации о цитологических особенностях спермиев различных видов рыб, а также о морфологических изменениях половых клеток в зависимости от условий замораживания. В ней содержится несколько сотен фотографий с подробным описанием особенностей строения спермиев, характера и длительности подвижности, изменений в структуре клеток, а также условий их замораживания и хранения.

В доступной нам литературе нет аналогичных сведений по морфологическому описанию спермиев рыб до и после замораживания клеток. Полученные нами данные по подвижности и морфологическому описанию спермиев после их замораживания служат одним из надежных критериев, с помощью которого возможно проводить целенаправленные

исследования на важном участке разработки оптимальных условий криоконсервации генетического материала.

ВЫВОДЫ

1. Цитофизиологические особенности спермиев изученных видов рыб заключаются в различных размерах и форме головной части клеток, а также продолжительности их поступательного и колебательного движения. Так, спермии осетровых видов рыб и белорыбицы имеют значительно большие размеры головной и хвостовой частей, время их подвижности более продолжительно, в отличие от спермиев карповых видов рыб и речного окуня, имеющих маленькие головные и короткие хвостовые части, что определяет их различную криоустойчивость.

2. Для оценки качества нативных и дефростированных спермиев рыб необходимо учитывать комплекс показателей, таких как их морфологическая целостность, физиологическая активность и оплодотворяющая способность. Разработанная электронная база данных «Морфологические нарушения спермиев рыб при различных условиях замораживания» отражает изменения данных показателей в зависимости от состава криозащитной среды, условий замораживания, хранения и размораживания биоматериала.

3. Анализ морфофункционального состояния спермиев изученных видов рыб после криоконсервации семенной жидкости показал, что применение стандартных криозащитных сред приводит к смещению изотоничности плазмы, что и является основной причиной утраты подвижности клеток и сопровождается в различной степени морфологическими нарушениями головной и особенно хвостовой части спермиев. Использование модифицированной криозащитной среды, в состав которой входят диметилсульфоксид, глицерин и гепарин, позволяет заметно снизить степень нарушений спермиев.

4. Замораживание и хранение семенной жидкости рыб при температуре минус 22 градуса по Цельсию по морфофункциональному состоянию спермиев не уступает технике криоконсервации в жидком азоте при температуре минус 196 градусов по Цельсию, и служит приемлемым и доступным способом сохранения генетического материала ценных видов рыб.

5. Одним из способов повышения подвижности и оплодотворяющей способности дефростированных спермиев рыб является использование стимуляторов различной природы. Наиболее эффективными для спермиев осетровых видов рыб и белорыбицы оказались растворы на основе препаратов «Эпин», «Метилтестостерон», также питательные среды.

6. Дефростированная семенная жидкость после различных сроков хранения при низкой (-22°C) и сверхнизкой (-196°C) температуре в криозащитных средах стандартного и модифицированного состава может быть использована для оплодотворения яйцеклеток рыб. Низкая оплодотворяемость икры севрюги и речного окуня при использовании дефростированной семенной жидкости указывает на необходимость внести изменения в традиционную биотехнику искусственного осеменения.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. На основании полученных результатов по качеству дефростированных спермиев разных видов рыб и их оплодотворяющей способности, в практике искусственного осеменения промысловых видов рыб рекомендуем увеличить объем семенной жидкости, время оплодотворения, а также испытать процесс осеменения при различных вариантах обесклеивания икры.

2. В процессе искусственного осеменения яйцеклеток рыб целесообразно применение активирующих растворов для оттаивания криоконсервированной спермы и осеменения ею икры. Активирующие растворы, возможно, использовать и при работе с нативной семенной жидкостью, в связи с понижением жизнеспособности спермы и оплодотворяемости икры.

СПИСОК РАБОТ ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Акимочкина Т.И. Оплодотворяемость икры белорыбицы после криоконсервации репродуктивных клеток в условиях сверхнизкой температуры. / Г.В. Земков, М.А. Егоров, А.М. Тихомиров, Т.И. Акимочкина // Эколого-биологические проблемы бассейна Каспийского моря: материалы 8 Международной научной конференции. 11-12 октября 2005 г. / отв. ред. В.Н. Пилипенко. - Астрахань: Издательский дом «Астраханский университет», 2005. - С. 88-89.
2. Акимочкина Т.И. Альтернативные хладоагенты для реализации методов криосохранения репродуктивных клеток ценных видов животных. / Т.И. Акимочкина // Естественные науки. - № 3-4 (16-17). - Астрахань: Издательский дом «Астраханский университет», 2006. - С. 26-29.
3. Акимочкина Т.И. Микроскопический анализ дефектов репродуктивных клеток русского осетра после хранения при сверхнизкой температуре. / Г.В. Земков, Т.И. Акимочкина // Эколого-биологические проблемы бассейна Каспийского моря:

- материалы 9 Международной научной конференции. 10-11 октября 2006г. / отв. ред. В.Н. Пилипенко. - Астрахань: Издательский дом «Астраханский университет», 2006. - С. 261-262.
4. Акимочкина Т.И. Разработка методов криосохранения генеративных клеток белорыбицы. / Т.И. Акимочкина // Доклады Московского общества испытателей природы, том 38: Биотехнология - охране окружающей среды (под ред. проф. Садчикова А.П., к.б.н. Котелевцева С.В.) - М.: Изд-во «Грификон», 2006. - С. 15.
 5. Акимочкина Т.И. Особенности технологии криосохранения репродуктивных и соматических клеток осетровых и белорыбицы. / Т.И. Акимочкина // Четвертый Московский международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 12-16 марта, 2007 г.). - М.: ЗАО «Экспо-биохим-технологии», РХТУ им. Д.И. Менделеева, 2007. - С. 252.
 6. Акимочкина Т.И. Перспективы изучения морфологии спермиев рыб с целью оценки их качественного состояния после хранения в условиях сверхнизкой температуры. / Т.И. Акимочкина // Ветеринарная патология. - 2007. - № 4. - С. 230-231.
 7. Акимочкина Т.И. Поиск оптимальных концентраций криопротекторных веществ при замораживании семенной жидкости рыб/ Т.И. Акимочкина // Биоресурсы, биотехнологии, экологически безопасное развитие регионов Юга России: материалы Международной конференции, 3-5 октября 2007 г. / сост.: М.А. Егоров. - Астрахань: Издательский дом «Астраханский университет», 2007. - С. 112-115.
 8. Акимочкина Т.И. Предварительные данные по изучению способов качественной оценки спермиев быка после хранения семенной жидкости при сверхнизкой температуре. / Г.В. Земков, М.А. Егоров, Г.Ф. Журавлева, Т.И. Акимочкина // Биоресурсы, биотехнологии, экологически безопасное развитие регионов Юга России: материалы Международной конференции, 3-5 октября 2007 г. / сост.: М.А. Егоров. - Астрахань: Издательский дом «Астраханский университет», 2007. - С. 105-108.
 9. Акимочкина Т.И. Определение сравнительной криоустойчивости спермиев в зависимости от видовой принадлежности рыб. / Т.И. Акимочкина, О.П. Попов, Г.В. Земков // Актуальные проблемы биологии воспроизводства животных // Материалы международной научно-практической конференции. - Дубровицы: ВНИИЖ, 2007. - С. 127-128.
 10. Акимочкина Т.И. Исследование генетического материала криохранилища, цитоморфологический анализ образцов из криоколлекции, содержащейся более полугода. / М.А. Егоров, В.И.

- Ершова, Г.В. Земков, Т.И. Акимочкина // СПб.: ВНТИЦ, 2007. - 16 с. - № ГР 01200609511. - Инв. № 022007 04565.
11. Акимочкина Т.И. Исследование генетического материала сельскохозяйственных животных для нужд криохранилища. / М.А. Егоров, В.И. Ершова, Г.В. Земков, Т.И. Акимочкина // СПб.: ВНТИЦ, 2007. - 17 с. - № ГР 01200609511. - Инв. № 022007 04567.
12. Акимочкина Т.И. Исследование криопротекторных свойств различных химических соединений, используемых для замораживания и хранения клеток биообъектов. / М.А. Егоров, В.И. Ершова, Г.В. Земков, Т.И. Акимочкина // СПб.: ВНТИЦ, 2007. - 70 с. - № ГР 01200609511. - Инв. № 022007 04162.
13. Акимочкина Т.И. Морфологический анализ генетического материала. Эксперименты по дефростации и отработки режимов заморозки половых клеток осетровых рыб. / М.А. Егоров, В.И. Ершова, Г.В. Земков, Т.И. Акимочкина // СПб.: ВНТИЦ, 2007. - 20 с. - № ГР 01200609511. - Инв. № 022007 04563.
14. Акимочкина Т.И. Проведение биотехнологических исследований, сбор качественного генетического материала. Контроль развития рыболовной продукции (эмбрионов, личинок, молоди) на каждом из технологических этапов. / М.А. Егоров, В.И. Ершова, Г.В. Земков, Т.И. Акимочкина // СПб.: ВНТИЦ, 2007. - 18 с. - № ГР 01200609511. - Инв. № 022007 04564.
15. Акимочкина Т.И. Проведение экспериментов по корректировке оптимальных значений компонентов – составных частей криопротекторов. / М.А. Егоров, В.И. Ершова, Г.В. Земков, Т.И. Акимочкина // СПб.: ВНТИЦ, 2007. - 15 с. - № ГР 01200609511. - Инв. № 022007 04566.
16. Акимочкина Т.И. Цитологический анализ генетического материала осетровых видов рыб. Характеристика выживаемости полученного потомства. / М.А. Егоров, В.И. Ершова, Г.В. Земков, Т.И. Акимочкина // СПб.: ВНТИЦ, 2007. - 20 с. - № ГР 01200609511. - Инв. № 022007 04562.
17. Акимочкина Т.И. Экспериментальный подбор криопротекторов. Пополнение криохранилища генетическим материалом от качественных производителей белорыбицы. / М.А. Егоров, В.И. Ершова, Г.В. Земков, Т.И. Акимочкина // СПб.: ВНТИЦ, 2007. - 16 с. - № ГР 01200609511. - Инв. № 022007 04561.
18. Акимочкина Т.И. Цитоморфологические изменения спермиев после хранения их при низкой температуре. / Т.И. Акимочкина // Международная конференция "Генетика, селекция, гибридизация, племенное дело и воспроизводство рыб". - СПб. - 2008. - С. 30.
19. Akimochkina T.I. The Cryoconservation Features of the Target Fish Species' Generative Cells. / T.I. Akimochkina // Biotechnology: State of

- the Art and Prospects for Development. - N.Y.: Nova Science Publishers, 2008. - pp. 1-4.
- 20.Акимочкина Т.И. Криоконсервация эксплантов гонад рыб и их последующее культивирование как один из способов сохранения генофонда. / Т.И. Акимочкина, Д.А. Шигаев // Пятый Московский международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 16-20 марта 2009 г.). - М.: ЗАО «Экспо-биохим-технологии», РХТУ им. Д.И. Менделеева, 2009. - С. 193-194.
- 21.Акимочкина Т.И. Сравнительные данные количественного содержания углеводов в природных водах дельты реки Волги и семенной жидкости русского осетра. / Г.В. Земков, Т.И. Акимочкина, О.Н. Рылина // Экология биосистем: проблемы изучения, индикации и прогнозирования: материалы II Международной научно-практической конференции (г. Астрахань, 25-30 августа 2009 г.) / сост.: В.Н. Пилипенко, С.Р. Кособокова. – Астрахань: Издательский дом «Астраханский университет», 2009. – С. 146-148.
- 22.Акимочкина Т.И. Цитоморфологические и функциональные изменения спермиев русского осетра (ACIPENSER GULDENSHTADTI B.) после криоконсервации. / Г.В. Земков, Т.И. Акимочкина // Цитология. - 2009. - Т. 51. - № 11. - С. 945-952.

Подписано к печати ...05.2010
Заказ № 2177. Тираж 100 экз.
Уч.-изд. л. 1,4. Усл. печ. л. 1,3

Оттиражировано в Издательском доме «Астраханский университет»
414056, г. Астрахань, ул. Татищева, 20
Тел. (8512) 48-53-47 (отдел маркетинга), 48-53-45 (магазин);
тел. 48-53-44, тел./факс (8512) 48-53-46
E-mail: asupress@yandex.ru