

А. К. Карамулдаева, А. М. Тихомиров

ПРИМЕНЕНИЕ ГЛИЦЕРИНА ДЛЯ КРИОКОНСЕРВАЦИИ СПЕРМЫ БЕЛОРЫБИЦЫ

Исследовалась возможность использования глицерина в качестве криопротектора вместо диметилсульфоксида (ДМСО) для криоконсервации спермы белорыбицы (*Stenodus leucichthys* Gueldenstaedtii, 1772). Исследования проводились в 2015–2016 гг. в лаборатории Южного научного центра РАН на базе Астраханского государственного технического университета. Материал для исследования собирали на Александровском осетровом рыбозаводе (Астраханская область) в период нерестовой кампании. В качестве контроля использовали нативную сперму белорыбицы от 6 самцов. Качество спермы определяли по двигательной активности (времени жизни) спермиев после активации спермы водой. В качестве криопротектора использовали следующие составы: базовый раствор – 80 %, сахароза – 1,71 г/л, маннит – 0,98 г/л, яичный желток – 10 %, ДМСО – 10 % и базовый раствор – 87 %, сахароза – 1,71 г/л, маннит – 0,98 г/л, яичный желток – 10 %, глицерин – 3 варианта: 3; 5 и 10 %. Для обеспечения наиболее полного проникновения криопротекторов внутрь клеток применяли электростимуляцию их мембран. Время эквипирации – 5 и 15 минут. Размораживание спермы проводили на водяной бане при температуре 38–40 °С. Для выведения протекторов из клеток в качестве изотонического раствора был выбран физиологический раствор (0,7 %-ный NaCl). В опытах с ДМСО жизнестойкость половых клеток в среднем была почти в 2 раза меньше, чем в опытах с глицерином: 78 и 186,2 с по окончании эквипирации и 52,3 и 128,9 с после оттаивания. Наибольшую активность спермиев проявили при концентрации глицерина 5 %, время эквипирации – 15 мин. Концентрация глицерина 3 % недостаточна, концентрация 10 % избыточна, т. к. подавляет активность спермиев. Яичный желток, который в сочетании с глицерином коагулирует, создавая сложности при просмотре, из состава криопротектора целесообразно исключить.

Ключевые слова: криоконсервация, глицерин, криопротектор, сперма, белорыбица, замораживание, оттаивание.

Введение

В настоящее время гидрологические условия, а также нарастающее антропогенное воздействие на водные экосистемы не только оказывают влияние на физиологическое состояние гидробионтов, но и приводят к снижению численности видов. Белорыбицу, например, в Волго-Каспийском бассейне уже можно отнести к исчезающим видам, т. к. сохранение и увеличение ее запасов возможно только при обязательном развитии заводского разведения. Однако эффективность пополнения популяций за счет искусственного воспроизводства снижается из-за резкого уменьшения количества производителей.

Использование приемов и методов криобиологии для сохранения жизни на Земле является одним из наиболее перспективных направлений деятельности человека. В основе генотипического принципа лежит фундаментальное научное положение о том, что наследственная информация о главных свойствах и признаках вида хранится в генах, совокупность которых представляет собой генотипы отдельных организмов. Сохранение наследственной информации является еще одной стратегией охраны видов.

Генотипический принцип в качестве самостоятельного способа предполагает обеспечение длительного хранения генотипов – создание генетических банков редких и исчезающих видов. Это особенно необходимо там, где исчерпаны все резервы сохранения естественных популяций вида, а также там, где неконтролируемая интродукция и гибридизация ведут к утрате чистых природных популяций, к утрате генофонда.

Глубокая заморозка спермиев белорыбицы имеет свои особенности, поэтому корректировка отдельных ее операций является необходимой для внедрения технологии в производственные условия.

Криоконсервация остается одним из наиболее привлекательных и быстроразвивающихся направлений сохранения редких исчезающих видов. Наличие в криобанке генетически репрезентативных коллекций геномов рыб и маточных стад на рыбозаводах позволит с максимальным эффектом сохранить генетическое разнообразие ценных промысловых объектов.

К настоящему времени разработаны методики криоконсервации половых продуктов рыб, в частности осетровых. Однако результаты, полученные с применением этих методик, не всегда можно воспроизвести, и, кроме того, они не всегда обеспечивают высокую выживаемость дефростированных сперматозоидов. Это связано с тем, что на процесс криоконсервации оказывает влияние большое количество факторов: физиологическое состояние производителей, качество половых продуктов, индивидуальные особенности рыб разных популяций, физические факторы и т. д.

Криопротекторы являются основным фактором, защищающим клетки от разрушений при низких значениях температурах. Одним из таких традиционных криопротекторов является диметилсульфоксид (ДМСО), успешно используемый при криоконсервации проходных видов рыб (осетровые, сиговые). Однако это вещество довольно токсично и не позволяет получать устойчиво высокие результаты при криоконсервации сперматозоидов белорыбицы. Более приемлемым по своим химическим свойствам является глицерин, использование которого при замораживании спермы белорыбицы нам кажется более перспективным.

Целью исследования являлось изучение возможности использования в качестве криопротектора глицерина вместо ДМСО для криоконсервации спермы белорыбицы.

Материал и методы исследований

Исследования проводились в 2015–2016 гг. в лаборатории Южного научного центра РАН на базе Астраханского государственного технического университета. Материал для работы (сперму белорыбицы) получали на Александровском осетровом рыбноводном заводе Севкаспрыбвода (Астраханская обл.) в период нерестовой кампании.

При оценке качества спермы учитывали ее консистенцию и цвет. Качество спермы, пригодной для криоконсервации, определяли по времени жизни спермиев после ее активации. На предметное стекло наносили каплю спермы, затем разбавляли ее водой в соотношении 1:200, тем самым активируя сперматозоиды. Двигательную активность спермиев (время жизни) регистрировали на мониторе персонального компьютера с использованием видеоприставки под микроскопом при увеличении от 180 до 400 раз. В качестве криопротектора использовались следующие составы:

– базовый раствор – 80 %, сахара – 1,71 г/л, маннит – 0,98 г/л, яичный желток – 10 %, ДМСО – 10 %;

– базовый раствор – 87 %, сахара – 1,71 г/л, маннит – 0,98 г/л, яичный желток – 10 %, глицерин – 3 варианта: 3; 5 и 10 %.

Время эквilibрации 5 и 15 минут.

После эквilibрации проверяли степень проникновения криопротектора внутрь клеток путем определения времени их жизни. Пробы спермы замораживали в ампулах Эппендорфа, емкостью 1,5–2 мл при скорости 1 200 об./мин. Образцы хранили в сосудах Дьюара. Размораживание материала осуществляли на водяной бане при температуре 38–40 °С. Для выведения протекторов из клеток в качестве изотонического раствора был выбран физиологический раствор (0,7 %-ный NaCl).

Результаты опытов обрабатывали статистически. Различия между действием факторов устанавливали с использованием *t*-критерия Стьюдента.

Результаты исследований и их обсуждение

За период исследований было проведено 162 опыта.

В качестве контроля использовали нативную сперму белорыбицы от 6 самцов. Первые серии опытов со спермиями белорыбицы, время эквilibрации в которых составило 5 минут, как с глицерином, так и с ДМСО в качестве протектора для замораживания спермы данного вида рыб после оттаивания, показали отрицательный результат. Поскольку причиной этого является недостаточное время эквilibрации, было решено увеличить время эквilibрации до 15 минут.

Результаты исследования приведены в таблице.

После эквilibрации с ДМСО наибольшее время жизни спермиев в среднем составило 78 с; после эквilibрации с глицерином – 186 с при концентрации глицерина 5 %. Таким образом, установлены достоверные различия между действием ДМСО и глицерина после проникновения их в клетки (*t*-критерий – 25).

Результаты криоконсервации спермы белорыбицы

♂№	Контроль, с	После эквilibрации				После оттаивания			
		ДМСО	Глицерин, %			ДМСО	Глицерин, %		
			3	5	10		3	5	10
4	87	97	46	88	100	62,54	66,56	–	111,92
	62	75	49	172	68	80,42	–	–	96,91
	57	76	63	95	178	56,63	63,51	–	58,88
5	68	49	85	132	74	36,100	83,51	158,174	64,82
	119	55	60	289	52	40,40	80,73	211,158	52,62
	68	61	69	199	64	53,37	60,127	151,132	50,42
6	75	80	114	104	116	61,56	61,70	98,128	80,60
	69	90	79	352	54	29,37	56,67	84,94	55,52
	110	119	165	244	88	46,50	69,65	78,81	90,59
<i>N</i>	9	9	9	9	9	18	18	12	18
Σ	715	702	730	1 675	794	942	1 104	1 547	1 284
Среднее	79,4 ± 1,56	78 ± 1,55	81,2 ± 2,12	186,2 ± 3,21	88,3 ± 2,11	52,3 ± 0,99	61,3 ± 1,03	128,9 ± 1,89	71,3 ± 1,06

По средним значениям действия глицерина и ДМСО построены графики времени жизни спермиев по окончании эквilibрации (рис. 1) и после оттаивания (рис. 2).

На рис. 1 видно, что разные составы протекторов действуют на сперматозоиды по-разному – ДМСО подавляет их активность (время жизни с ДМСО 78 с, в контроле – 79,4 с). Наибольшую активность спермии проявили при действии глицерина в концентрации 5 %. Очевидно, что концентрация глицерина 3 % в составе криопротектора недостаточна, а концентрация 10 % избыточна, т. к. подавляет активность спермиев.

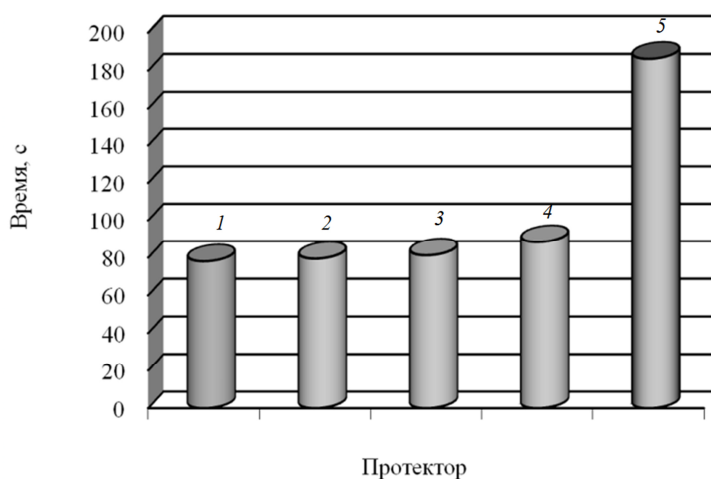


Рис. 1. Время активности сперматозоидов после эквilibрации: 1 – ДМСО; 2 – контроль; 3 – глицерин, 3 %; 4 – глицерин, 10 %; 5 – глицерин, 5 %

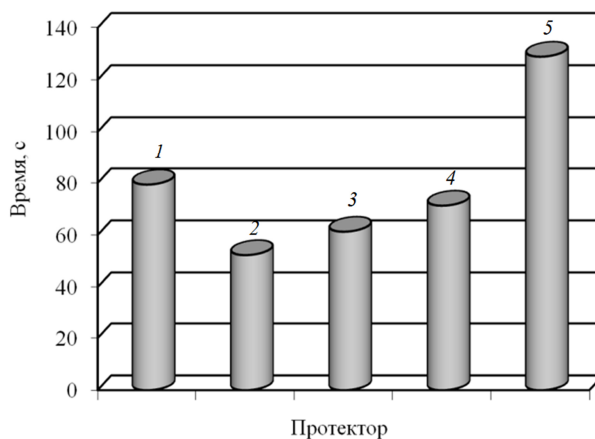


Рис. 2. Время активности сперматозоидов после оттаивания: 1 – контроль; 2 – ДМСО 3 – глицерин, 3 %; 4 – глицерин, 10 %; 5 – глицерин, 5 %

Согласно рис. 2, после оттаивания наибольшее время жизни сперматозоидов было достигнуто при концентрации глицерина 5 %, т. е. концентрация глицерина 5 % является оптимальной.

В опытах с ДМСО жизнестойкость половых клеток была почти в 2 раза меньше, чем в опытах с глицерином (52,3 и 128,9 с), т. е. ДМСО оказывает на сперму белорыбицы токсическое воздействие. Различия при действии ДМСО и глицерина после оттаивания достоверны (*t*-критерий – 21).

В процессе исследования выяснилось, что яичный желток в сочетании с глицерином в составе криопротектора коагулирует и тем самым создает сложности при просмотре. Полагаем, что его целесообразно исключить из состава протектора. Действие яичного желтка можно компенсировать, увеличив концентрацию маннита и сахарозы.

Заключение

По результатам исследования можно сделать следующие выводы.

1. Глицерин хорошо связывается с водой, благодаря чему имеет большое преимущество перед другими веществами. Глицерин отлично проникает внутрь мембраны клеток и повышает жизнестойкость спермиев белорыбицы по сравнению с диметилсульфоксидом почти в 2 раза.

2. Наибольшее время жизни спермиев белорыбицы установлено при использовании в составе криопротектора глицерина в концентрации 5 %.

3. Состав протектора для использования в целях криоконсервации спермы белорыбицы, использование которого дало наилучший результат: базовый раствор – 87 %, сахароза – 1,71 г/л, маннит – 0,98 г/л, яичный желток – 10 %, глицерин – 5 %.

4. Яичный желток из состава криопротектора необходимо исключить в связи с тем, что в сочетании с глицерином он коагулирует. Действие яичного желтка можно компенсировать, увеличив концентрацию маннита и сахарозы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Карнаухов В. Н. Проблемы и перспективы создания генетических криобанков для целей сохранения биоразнообразия // Биофизика живой клетки. 1994. Т. 6: Криоконсервация генетических ресурсов в проблеме сохранения биоразнообразия. С. 1–7.
2. Павлов Д. С. Подходы к охране редких и исчезающих рыб. Пушино: ПНЦ РАН, 1993. 24 с.
3. Докина О. Б., Цветкова Л. И., Пронина Н. Д., Миленко В. А. Исследование криоконсервации спермы как метода сохранения и восстановления генофонда рыб // Проблемы естественного и искусственного воспроизводства рыб в морских и пресноводных водоемах. Ростов н/Д: ООО «ЦВВР». 175 с. URL: <http://www.ssc-ras.ru/ru/page802.html>.
4. Цветкова Л. И., Савушкина С. И. Методическое пособие по криоконсервации спермы карпа, лососевых и осетровых видов рыб. Методическое пособие. М.: ВНИИПРХ, 1997. 11 с.
5. Цветкова Л. И., Каранова М. В. Криопротективный эффект низкомолекулярных и высокомолекулярных антифризных гликопротеинов из крови трески *Gadus morhua* // Биофизика живой клетки. 1994. Т. 6: Криоконсервация генетических ресурсов в проблеме сохранения биоразнообразия. С. 77–80.

Статья поступила в редакцию 12.01.2017

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Карамулдаева Амина Кумаровна – Россия, 414056, Астрахань; Астраханский государственный технический университет; магистрант кафедры рыбоводства и рыболовства; kerm-02@inbox.ru.

Тихомиров Андрей Михайлович – Россия, 414056, Астрахань; Астраханский государственный технический университет; канд. биол. наук; ведущий научный сотрудник; tikhomirov41@mail.ru.



A. K. Karamuldaeva, A. M. Tikhomirov

THE USE OF GLYCEROL FOR THE CRYOPRESERVATION OF INCONNU'S SPERM

Abstract. The article studies the possibility to use glycerol as cryoprotectant, instead of dimethylsulfoxide for cryopreservation of sperm of inconnu (*Stenodus leucichthys* Gueldenstaedtii, 1772). Investigations were carried out from 2015 to 2016 in the laboratory of the Southern Scientific Center, Russian Academy of Sciences, on the basis of the Astrakhan State Technical University. The material collected on the Alexander sturgeon hatcheries (the Astrakhan region) in the spawning period. Native sperm of 6 male inconnu species was used as a control means. The semen quality was determined in terms of moving activity (life time) of sperm after its activation by water. As the cryoprotectant there were used: base solution - 80%, sucrose - 1.71 g/l, mannite - 0.98 g/l, yolk - 10%, dimethylsulfoxide - 10% and base solution - 87%, sucrose - 1.71% g/l, mannite - 0.98 g/l, yolk - 10%, glycerol - 3 variants: 3; 5 and 10%. In order to provide the most complete penetration of cryoprotectants into the cells there were used electrostimulation of cell membranes. Equilibration time was 5 and 15 minutes. Thawing semen was performed in a water bath at a temperature of 38-40°C. For removing protectors from cells there was chosen a saline solution (0.7% NaCl) as isotonic solution. In tests using dimethylsulfoxide life activity of sex cells was 2 times lower than in tests with glycerol: 78 and 186.2 s at the end of equilibration and 52.3 and 128.9 s after thawing. Sperm showed maximum activity under 5% glycerol concentration during equilibration - 15 min. Concentration of 3% was insufficient, concentration of 10% was excessive, as it suppressed activity of sperm. Egg yolk which coagulated together with glycerol, making difficulty for observing, had to be excluded from the composition of cryoprotectant.

Key words: cryopreservation, glycerol cryoprotectant, sperm, inconnu, freezing, thawing.

REFERENCES

1. Karnaukhov V. N. Problemy i perspektivy sozdaniia geneticheskikh kriobankov dlia tselei sokhraneniia bioraznoobraziia [Problems and perspectives of creating genetic cryobanks for preserving biodiversity]. *Biofizika zhivoi kletki*, 1994, vol. 6: *Kriokonservatsiia geneticheskikh resursov v probleme sokhraneniia bioraznoobraziia*. P. 1-7.
2. Pavlov D. S. *Podkhody k okhrane redkikh i ischezaiushchikh ryb* [Approaches to the protection of rare and endangered fish species]. Puschino, PNTs RAN, 1993. 24 p.
3. Dokina O. B., Tsvetkova L. I., Pronina N. D., Milenko V. A. Issledovanie kriokonservatsii spermy kak metoda sokhraneniia i vosstanovleniia genofonda ryb [The research of sperm cryopreservation as a method of saving and reproduction of fish genetic fund]. *Problemy estestvennogo i iskusstvennogo vosproizvodstva ryb v morskikh i presnovodnykh vodoemakh*. Rostov-on-Don, OOO «TsVVR». 175 p. Available at: <http://www.ssc-ras.ru/ru/page802.html>.
4. Tsvetkova L. I., Savushkina S. I. *Metodicheskoe posobie po kriokonservatsii spermy karpa, lososevykh i osetrovnykh vidov ryb* [The manual on cryopreservation of sperm of carp, salmon and sturgeon species]. Metodicheskoe posobie. Moscow, VNIIPRKh, 1997. 11 p.
5. Tsvetkova L. I., Karanova M. V. Krioprotektivnyi effekt nizkomolekuliarnykh i vysokomolekuliarnykh antifriznykh glikoproteinov iz krovi treski *Gadus morhua* [Cryoprotective effect of low molecular and high molecular antifreeze glycoproteins from cod blood *Gadus morhua*]. *Biofizika zhivoi kletki*, 1994, vol. 6: *Kriokonservatsiia geneticheskikh resursov v probleme sokhraneniia bioraznoobraziia*. P. 77-80.

The article submitted to the editors 12.01.2017

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Karamuldaeva Amina Kumarovna – Russia, 414056, Astrakhan; Astrakhan State Technical University; Master's Course Student of the Department of Fish Farming and Fishery; kerm-02@inbox.ru.

Tikhomirov Andrei Mikhailovich – Russia, 414014, Astrakhan; Astrakhan State Technical University; Candidate of Biology; Leading Researcher; tikhomirov41@mail.ru.

