

# ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ ГИДРОБИОНТОВ

УДК 639.3.034.2

Д. А. Исаев, Е. И. Шишанова, Д. А. Кавтаров, А. П. Глебов

## ПОДВИЖНОСТЬ, СОХРАННОСТЬ МЕМБРАН И ФРАГМЕНТАЦИЯ ДНК В СПЕРМЕ СТЕРЛЯДИ ПРИ ГИПОТЕРМИЧЕСКОМ ХРАНЕНИИ В БЕЗЭЛЕКТРОЛИТНОМ РАСТВОРЕ ГЛЮКОЗЫ И ТРЕГАЛОЗЫ

Непродолжительное гипотермическое хранение спермы в жидком состоянии без замораживания является альтернативой криоконсервации в тех случаях, когда жидкий азот недоступен или его использование нежелательно, например при авиационной транспортировке. Сперма стерляди (*Acipenser ruthenus*) имеет крайне низкую осмоляльность семенной плазмы, не более 80 мосмоль/кг, что затрудняет разработку консервирующих растворов для гипотермического хранения. Исследования по гипотермическому хранению спермы стерляди в безэлектrolитном растворе глюкозы, трегалозы и альбумина, изотоничном семенной плазме, показали, что способность сперматозоидов к активации значительно снижалась в процессе хранения и почти полностью утрачивалась на 24 сутки. К этому времени количество сперматозоидов с повреждёнными мембранами составляло  $44,9 \pm 5,3$  %, а фрагментация ДНК –  $34,5 \pm 4,9$  %, что очевидно делает сперму непригодной для оплодотворения. Несмотря на это, около 50 % сперматозоидов становились подвижными в результате активации по меньшей мере после 6 суток хранения. Таким образом, результаты исследования впервые демонстрируют возможность эффективного гипотермического хранения спермы стерляди в простых безэлектrolитных растворах сахаров и альбумина.

**Ключевые слова:** осетровые рыбы, стерлядь, гипотермия, хранение спермы без замораживания.

### Введение

Гипотермическое хранение спермы рыб (при пониженной температуре, но без замораживания) значительно уступает по длительности криоконсервации, но вместе с тем обладает важным преимуществом – не требует специального криогенного оборудования и материалов (жидкий азот, сухой лёд). Это даёт возможность применять гипотермическое хранение в полевых условиях, упрощает и делает безопасной транспортировку, в том числе авиационную, позволяет решать задачи синхронизации созревания половых продуктов при проведении нерестовых кампаний. Для гипотермического хранения спермы осетровых рыб наиболее обычным способом является помещение ёмкостей с неразбавленной спермой на холод – на ледяную баню или в холодильный шкаф (+2...+12 °С). Применяют также хранение по методу DiLauro et al. в пластиковых пакетах или контейнерах, заполненных кислородом или воздухом [1]. F. Conte et al. предлагают хранить сперму при температуре +4 °С в пластиковых шприцах ёмкостью 10–60 мл, частично заполненных чистым кислородом, который следует заменять каждые 12 часов [2].

В то же время использование изотонических сред на основе сахаридов с пониженным содержанием катионов – так называемых безэлектrolитных сред – оказалось наиболее эффективным для гипотермического хранения спермы человека и лабораторной мыши [3, 4], что позволило с успехом применить данный подход в репродуктивной медицине [5, 6]. Результаты применения безэлектrolитных сред на основе сахаров для хранения спермы осетровых рыб [7–9] дают основание предполагать универсальность подобного подхода и говорить о возможности в перспективе использовать его при исследованиях других видов рыб.

Важнейшими прямыми показателями эффективности хранения спермы являются ее оплодотворяющая способность и генетическая безопасность метода, т. е. нормальная выживаемость

и отсутствие генетических дефектов у потомства. Ряд косвенных показателей, таких как восстановление подвижности после хранения, содержание АТФ, свободнорадикальное окисление, целостность мембран и фрагментация ДНК, позволяют оценить эффективность метода без оплодотворения и получения потомства. Это особенно важно в рыбоводстве, т. к. дает возможность проводить экспериментальные работы не только во время нерестовых кампаний. Одним из наиболее значимых косвенных показателей эффективности хранения спермы является фрагментация ДНК. Так, исследователи Университета Южной Богемии (Чехия), изучая фрагментацию ДНК при гипотермическом хранении спермы русского и сибирского осетров, выявили зависимость между общими физиологическими показателями спермы и разрушением генетического аппарата [10].

Особенностью стерляди (*Acipenser ruthenus*) является чрезвычайно низкая даже для осетровых рыб осмоляльность семенной плазмы, которая, по данным разных авторов, составляет ~50–70 мосмоль/кг [11, 12]. При такой низкой осмоляльности сперматозоиды стерляди пребывают в неактивном состоянии, при этом в условиях фактической гипотонии поддержание их жизнеспособности требует активной осморегуляции, механизмы которой в настоящее время не изучены. При гипотермическом хранении, на фоне общего снижения уровня метаболизма, осморегуляция также может быть нарушена, что приведёт к гибели сперматозоидов.

В этом исследовании мы предприняли попытку гипотермического хранения спермы стерляди в безэлектролитном растворе глюкозы, трегалозы и альбумина, изотоничном семенной плазме, с целью изучения фрагментации ДНК, сохранности мембран и способности спермы к активации как наиболее значимых косвенных показателей фертильности спермы.

#### Материалы и методы исследований

Образцы спермы стерляди от 6 самцов-производителей были получены в рыбоводных целях во время проведения нерестовой кампании на Можайском производственно-экспериментальном рыбоводном заводе (МПЭРЗ) в сентябре 2015 г. Непосредственно после получения для всех образцов была проведена оценка качества спермы по пятибалльной шкале Персова. Концентрацию сперматозоидов определяли в камере Горяева. Для оценки подвижности сперму активировали, разбавляя водой в 50 раз; в течение первых 10–15 секунд оценивали относительное количество подвижных сперматозоидов, затем отмечали время, в течение которого половина подвижных сперматозоидов переходит от поступательных движений к колебательным, и время полной потери подвижности. Спермакрит определяли центрифугированием образцов в стеклянных гематокритных капиллярах емкостью 75 мм в течение 10 минут при 1000 g. Водородный показатель семенной плазмы определяли при помощи портативного рН-метра «Piccolo» («Hanna Instruments», Германия), осмоляльность – на осмометре-криоскопе «ОСКР-1» («КИВИ осмометрия», Россия).

Для гипотермического хранения спермы нами был разработан и использован экспериментальный бессолевой консервант ISGT-80, представляющий собой водный раствор 0,05 М глюкозы, 0,03 М трегалозы и 1 % бычьего сывороточного альбумина (БСА). Нативную сперму разводили консервантом в 4 раза и хранили в криовиалах объемом 2 мл при температуре +4 °С в течение 24 суток.

Оценку подвижности спермы проводили каждые 6 суток для всех образцов в течение всего срока гипотермического хранения. Сохранность мембран сперматозоидов оценивали при помощи суправитального теста с эозином по окончании хранения. Фрагментацию ДНК определяли методом SCD-test [13] в свежих образцах и по окончании хранения, сперматозоиды с фрагментированной ДНК определяли по отсутствию окрашенного гало.

Данные представлены как  $M \pm SE$ , где  $M$  – среднее,  $SE$  – стандартная ошибка среднего. Для выявления связи между показателями применяли непараметрический корреляционный анализ Спирмена. Расчеты и подготовку иллюстративного материала выполняли с использованием пакета программ Statistica 5.0 (StatSoft, Inc.).

#### Результаты исследований и их обсуждение

*Характеристика образцов.* Образцы спермы, которые использовались в ходе исследования, были оценены от 2 до 4 баллов по шкале Персова. Дополнительные характеристики образцов приведены в таблице.

## Характеристики образцов спермы стерляди

| № образца    | Концентрация, млн/мл | Сперматокрит, % | pH        | Осмоляльность, мосмоль/кг | Подвижность, % |
|--------------|----------------------|-----------------|-----------|---------------------------|----------------|
| 1            | 330                  | 2,5             | 7,5       | 64                        | 85             |
| 2            | 1 050                | 3,6             | 6,8       | 70                        | 98             |
| 3            | 580                  | 0,8             | 7,0       | 53                        | 96             |
| 4            | 505                  | 2,9             | 7,2       | 54                        | 100            |
| 5            | 300                  | 1,9             | 7,2       | 58                        | 86             |
| 6            | 395                  | 1,2             | 7,4       | 56                        | 92             |
| <i>n</i> = 6 | 527 ± 113            | 2,2 ± 0,4       | 7,2 ± 0,1 | 59,2 ± 2,7                | 92,8 ± 2,6     |

Корреляций между указанными характеристиками спермы не выявлено. Высокая фертильность спермы (не ниже 75 %) подтверждена в ходе ее использования в производстве.

Данные по осмоляльности семенной плазмы, полученные в этом исследовании, сходны с данными, полученными ранее нами ( $51,3 \pm 5,8$  мосмоль/кг ( $n = 7$ ; 2013 г., МПЭРЗ)) [9], а также другими авторами [11, 12].

*Подвижность спермы.* Зрелые сперматозоиды рыб в семенной плазме пребывают в неподвижном состоянии. После контакта с водой происходит их активация, и сперматозоиды обретают подвижность на короткое время, необходимое для оплодотворения. Относительное количество подвижных сперматозоидов и время сохранения подвижности являются, таким образом, важнейшими характеристиками и необходимыми условиями фертильности спермы.

В ходе гипотермического хранения способность спермы осетровых рыб к активации быстро и необратимо снижается, что обусловлено рядом причин: распадом (в том числе, возможно, катаболическим) макроэргических соединений, повреждениями мембран в результате слёживания или осмотических перепадов, преждевременной активацией и пр.

В нашем исследовании способность спермы к активации почти полностью утрачивалась во всех образцах на 24 сутки хранения (рис. 1).

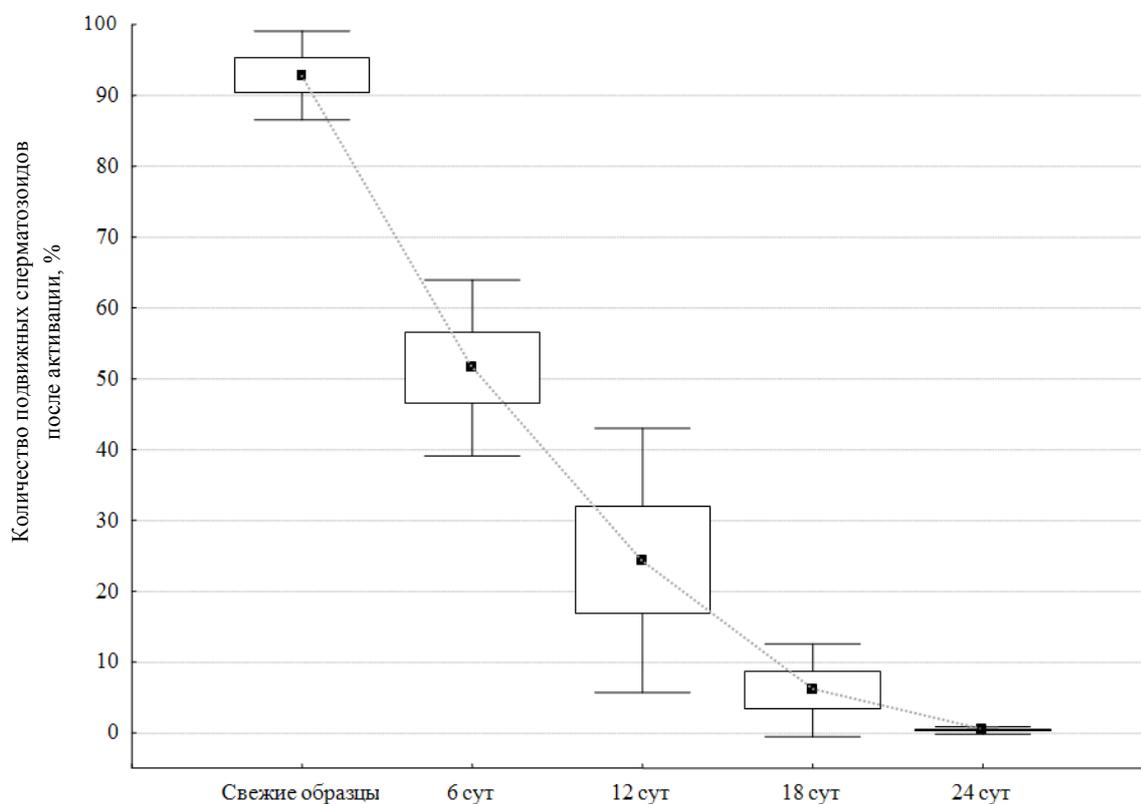


Рис. 1. Снижение способности спермы стерляди к активации при гипотермическом хранении в течение 24 суток в растворе ISGT-80:  
 ■ ± среднее; □ ± стандартная ошибка среднего; ⊥ ± стандартное отклонение

Корреляции между большинством исходных характеристик спермы (табл.) и способностью к активации в ходе хранения не выявлено. Примечательно, что обнаружена сильная отрицательная корреляция между концентрацией спермы и способностью к активации после 18 суток хранения (Спирмена  $R = -0,9, p = 0,01$ ).

В свежих образцах сперматозоиды сохраняли подвижность после активации в течение  $285 \pm 63$  секунды, время перехода половины сперматозоидов к колебательным движениям –  $71 \pm 14$  секунд. Спустя 6 суток гипотермического хранения время сохранения подвижности увеличилось, а затем уменьшалось по мере увеличения длительности хранения (рис. 2).

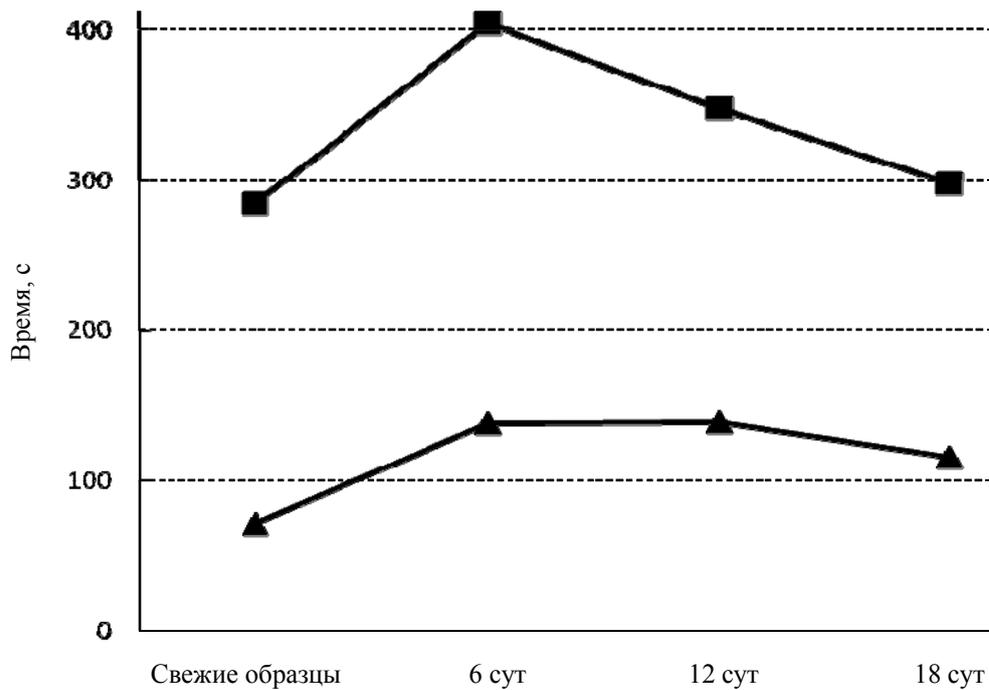


Рис. 2. Время сохранения сперматозоидами подвижности после активации в зависимости от длительности гипотермического хранения:  
 ▲ – время, в течение которого более половины сперматозоидов переходит от поступательного движения к колебательному; ■ – время полного прекращения подвижности

Одной из возможных причин увеличения времени сохранения подвижности в результате гипотермического хранения может быть катаболизм глюкозы, составляющей основу консерванта. Другой возможной причиной может быть преимущественная гибель в ходе хранения сперматозоидов с низким внутриклеточным содержанием макроэргов.

По недавним данным М. S. Agamli et al. (2015), изучавших гипотермическое хранение неразбавленной спермы стерляди в «классических» аэробных условиях, спустя 3 суток активировалось 30–40 % сперматозоидов, а через 6 суток хранения подвижных сперматозоидов не наблюдалось [14]. В нашем консерванте ISGT-80 в анаэробных условиях гипотермического хранения через 6 суток активировалось  $51,5 \pm 5,1$  % сперматозоидов (min 36 %, max 72 %;  $n = 6$ ), а в отдельных образцах незначительная подвижность сохранялась даже спустя 24 суток хранения. Таким образом, несмотря на значительное и быстрое снижение способности к активации в ходе хранения, эти данные указывают на преимущество нашего подхода по сравнению с традиционным методом.

**Фрагментация ДНК.** Повреждения генетического аппарата сперматозоидов снижают фертильность спермы и приводят к нарушениям нормального развития. В процессе гипотермического хранения разрывы ДНК могут возникать в результате оксидативного стресса.

Определение фрагментации ДНК мы проводили по методу Fernandez et al. [13], называемому SCD-test (от англ. *sperm chromatin dispersion*) и основанному на том, что сперматозоиды с неповреждённым хроматином на препарате образуют окрашенное гало, в то время как сперматозоиды с повреждениями ДНК имеют чёткие контуры головки (рис. 3).

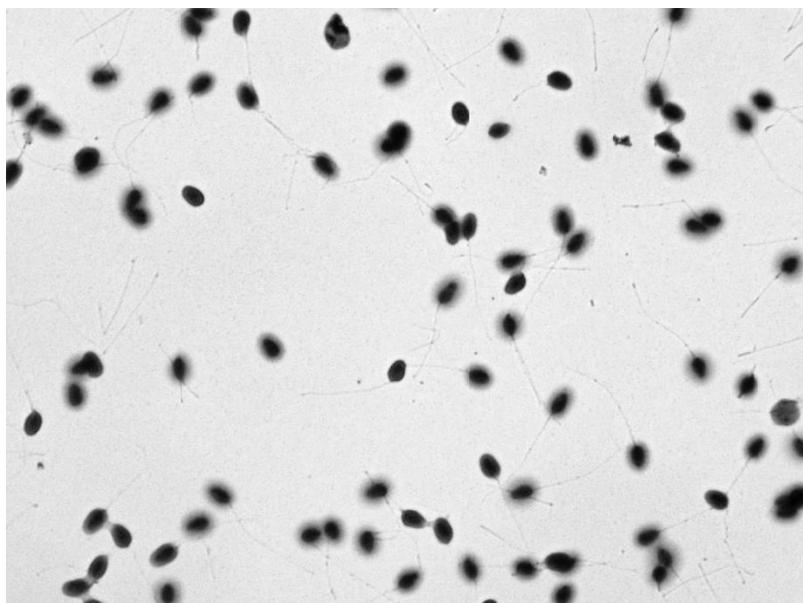


Рис. 3. Дисперсия хроматина в сперматозоидах стерляди после 24 суток гипотермического хранения. Окраска по Романовскому – Гимзе, объектив 40X

Доля сперматозоидов с повреждениями ДНК, определённая нами в свежих образцах, составила  $3,6 \pm 0,5$  %. Это соответствует данным других авторов, которые использовали более чувствительный (по сравнению с SCD-test) метод – COMET: 1–2 % [15–18] или  $4,08 \pm 2,27$  % [19]. После 24 суток гипотермического хранения доля сперматозоидов с повреждениями ДНК составила  $34,5 \pm 4,9$  %, что сопоставимо с литературными данными по фрагментации ДНК в сперме стерляди в результате криоконсервации [19].

**Микробная контаминация.** Образцы спермы были получены и заготовлены в нестерильных условиях, хотя и с применением асептических средств. Несмотря на отсутствие антибиотиков в консерванте ISGT-80, ни в одном из образцов не было отмечено бактериального роста в течение по крайней мере 18 суток гипотермического хранения при температуре  $+4$  °С, что наблюдалось нами ранее для консервантов на основе трегалозы [8, 9]. После 24 суток хранения в образцах обнаруживалось незначительное присутствие подвижных микробных форм.

**Сохранность мембран.** Сохранение целостности мембран является необходимым условием поддержания жизнеспособности спермы при хранении и, соответственно, ее фертильности. Известное свойство трегалозы поддерживать сохранность мембран сперматозоидов позвоночных при криоконсервации было подтверждено и успешно использовано нами при гипотермическом хранении эпидидимальных сперматозоидов мыши [20].

Суправитальный тест с эозином показал, что после 24 суток хранения доля сперматозоидов с поврежденными мембранами составила  $44,9 \pm 5,3$  % (min 27,8 %, max 64,5 %,  $n = 6$ ), что является довольно высоким показателем. Не выявлено корреляции между повреждением мембран и другими характеристиками спермы, в том числе фрагментацией ДНК и способностью к активации.

В нашем предварительном исследовании с использованием консервирующих растворов на основе трегалозы, спустя 15 суток гипотермического хранения спермы стерляди в растворе IST-80 (0,08 М трегалозы, 1 % БСА, осмоляльность 80 мосмоль/кг), доля сперматозоидов с поврежденными мембранами составляла всего 2–8 %; подвижность при этом была низкой – только в одном из трёх образцов достигала 16 %. Повышение осмоляльности раствора до 100 мосмоль/кг (раствор IST-100) значительно ухудшало сохранность мембран – доля спермато-

зоидов с повреждёнными мембранами составляла 17–54 %, а подвижность утрачивалась полностью [9]. Эти данные, в совокупности с данными настоящей работы, указывают на то, что изотоничность консерванта в семенной плазме способствует лучшей сохранности мембран, однако трегалоза сама по себе не обеспечивает сохранения способности к активации.

Полагая, что при гипотермическом хранении спермы осетровых рыб тоничность консервирующего раствора имеет решающее значение [8, 9], и основываясь на предшествующем опыте, мы в данном исследовании использовали консервант ISGT-80, в составе которого трегалоза присутствовала лишь в качестве «осмотического буфера», в то время как основная тоничность обеспечивалась за счёт глюкозы. Возможно, повышение содержания в консерванте трегалозы за счёт снижения глюкозы позволит достичь компромисса между сохранением целостности мембран и способности к активации.

### Заключение

Использование в качестве консерванта для гипотермического хранения спермы осетровых рыб бессолевых (безэлектролитных) растворов сахаров с добавлением альбумина в настоящее время является наиболее эффективным и перспективным подходом. Тем не менее разработка составов подобных растворов требует обязательного учёта видовых особенностей рыб. Одной из наиболее важных видоспецифичных характеристик спермы осетровых рыб является осмоляльность семенной плазмы, которая для многих видов значительно ниже осмоляльности плазмы крови. Наше исследование показало, что сперма стерляди, имеющая наиболее низкую осмоляльность, может сохраняться в безэлектролитном растворе, изотоничном семенной плазме, по меньшей мере в течение 6 суток, оставаясь потенциально фертильной почти на 50 % и сохраняя способность к активации в течение 24 суток хранения.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. DiLauro M. N., Krise W. F., Hendrix M. A., Baker S. E. Short-term cold storage of Atlantic sturgeon sperm // *Progr. Fish-Cult.* 1994. Vol. 56. P. 143–144.
2. Conte F., Doroshov S., Lutes P. Hatchery manual for the white sturgeon, *Acipenser transmontanus*, with application to other North American Acipenseridae. Coop. Extension, Div. Agric. Nat. Resources, Univ. California, Davis, 1988. Publication #3322. 104 p.
3. Riel J. M., Yamauchi Y., Huang T. T. F., Grove J., Ward M. A. Short-term storage of human spermatozoa in electrolyte-free medium without freezing maintains sperm chromatin integrity better than cryopreservation // *Biol. Reprod.* 2011. Vol. 85. P. 536–547.
4. Saito K., Kinoshita Y., Kanno H., Iwasaki A., Hosaka M. A new method of the electrolyte-free long-term preservation of human sperm at 4 °C // *Fertil. Steril.* 1996. Vol. 65. P. 1210–1213.
5. Исаев Д. А., Заева В. В., Бакурадзе Р. В., Кривохарченко И. С., Залетов С. Ю. Хранение спермы человека в течение 2 недель без замораживания // *Проблемы репродукции.* 2009. № 5. С. 33–35.
6. Исаев Д. А., Захарова Е. Е., Капралова И. В., Кривохарченко И. С., Картавенко Т. В., Михайловская Г. В., Жарская О. О., Залетова В. В. Краткосрочное хранение спермы без замораживания в программах ЭКО/ИКСИ // *Проблемы репродукции.* 2015. № 4. С. 65–70.
7. Исаев Д. А., Мартынова М. Ю. Краткосрочное хранение спермы стерляди в анаэробных условиях // *Состояние и перспективы развития пресноводной аквакультуры. Междунар. науч.-практ. конф. (Москва, 5–6 февраля 2013 г.): материалы докл. М.: Изд-во РГАУ–МСХА им. К. А. Тимирязева, 2013. С. 189–195.*
8. Исаев Д. А., Мартынова М. Ю., Шишанова Е. И., Бубунец Э. В., Стародворская И. В. Гипотермическое хранение спермы осетровых рыб в изотонических растворах // *Рыбоводство и рыбное хозяйство.* 2013. № 10. С. 41–49.
9. Исаев Д. А. Гипотермическое хранение спермы стерляди в консервантах на основе трегалозы: предварительное исследование // *Перспективы и проблемы развития аквакультуры в составе АПК. Всероссий. науч.-практ. конф. (Москва, ВВЦ, 4–6 февраля 2014 г.): материалы докл. М.: Перо, 2014. С. 131–137.*
10. Shaliutina A., Hulak M., Gazo I., Linhartova P., Linhart O. Effect of short-term storage on quality parameters, DNA integrity, and oxidative stress in Russian (*Acipenser gueldenstaedtii*) and Siberian (*Acipenser baerii*) sturgeon sperm // *Anim. Reprod. Sci.* 2013. Vol. 139. P. 127–135.
11. Piros B., Glogowski J., Kolman R., Rzemieniecki A., Domagala J., Horvath A., Urbanyi B., Ciereszko A. Biochemical characterization of Siberian sturgeon *Acipenser baeri* and sterlet *Acipenser ruthenus* milt plasma and spermatozoa // *Fish Physiol. and Biochem.* 2002. Vol. 26. P. 289–295.
12. Psenicka M., Alavi S. M. H., Rodina M., Cosson J., Nebesarova J., Gela D., Linhart O. A comparative study on biological aspect of sperm in sterlet and Siberian sturgeon // *Cybiuim.* 2008. Vol. 32, suppl. P. 179–180.

13. Fernandez J. L., Muriel L., Rivero M. T., Goyanes V., Vazquez R., Alvarez J. G. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation // J. Androl. 2003. Vol. 24. P. 59–66.
14. Aramli M. S., Azarin H., Farsi P. Motility parameters, adenosine triphosphate content and oxidative stress indices of sterlet, *Acipenser ruthenus* sperm after 6 days of storage // Aquaculture Research. 2015. July. P. 1–6.
15. Gazo I., Linhartova P., Shaliutina A., Hulak M. Influence of environmentally relevant concentrations of vinclozolin on sperm quality, DNA integrity, and antioxidant responses in sterlet *Acipenser ruthenus* spermatozoa // Chem. Biol. Interact. 2013. Vol. 203. P. 377–385.
16. Hulak M., Gazo I., Shaliutina A., Linhartova P. In vitro effects of bisphenol A on the quality parameters, oxidative stress, DNA integrity and adenosine triphosphate content in sterlet (*Acipenser ruthenus*) spermatozoa // Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicol. Pharmacol. 2013. Vol. 158. P. 64–71.
17. Linhartova P., Gazo I., Shaliutina A., Hulak M. The in vitro effect of duroquinone on functional competence, genomic integrity, and oxidative stress indices of sterlet (*Acipenser ruthenus*) spermatozoa // Toxicol. in Vitro. 2013. Vol. 27. P. 1612–1619.
18. Linhartova P., Gazo I., Shaliutina-Kolesova A., Hulak M., Kaspar V. Effects of tetrabrombisphenol A on DNA integrity, oxidative stress, and sterlet (*Acipenser ruthenus*) spermatozoa quality variables // Environ Toxicol. 2015. Vol. 30. P. 735–745.
19. Shaliutina-Kolesova A., Cosson J., Lebeda I., Gazo I., Shaliutina O., Dzyuba B., Linhart O. The influence of cryoprotectants on sturgeon (*Acipenser ruthenus*) sperm quality, DNA integrity, antioxidant responses, and resistance to oxidative stress // Anim. Reprod. Sci. 2015. Vol. 159. P. 66–76.
20. Исаев Д. А., Мартынова М. Ю., Володяев И. В., Ревакин А. О. Влияние трегалозы на сохранность мембран, подвижность и фрагментацию хроматина эпидидимальных сперматозоидов мышей при гипотермическом хранении в безэлектrolитных средах // Биомедицина. 2015. № 4. С. 69–76.

Статья поступила в редакцию 30.04.2016

#### ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

**Исаев Дмитрий Александрович** – Россия, 142460, поселок им. Воровского, Ногинский район, Московская область; Всероссийский научно-исследовательский институт ирригационного рыбководства; канд. биол. наук; ведущий научный сотрудник; isaev@hotmail.ru.

**Шишанова Елена Ивановна** – Россия, 142460, поселок им. Воровского, Ногинский район, Московская область; Всероссийский научно-исследовательский институт ирригационного рыбководства; канд. биол. наук; зам. директора по научной работе; lena-vniir@mail.ru.

**Кавтаров Джавад Адухович** – Россия, 143222, Горетово, Можайский район, Московская область; Можайский производственно-экспериментальный рыбководный завод; директор; mperz@mail.ru.

**Глебов Александр Павлович** – Россия, 143222, Горетово, Можайский район, Московская область; Можайский производственно-экспериментальный рыбководный завод; главный рыбковод; glebov74@rambler.ru.



D. A. Isaev, E. I. Shishanova, D. A. Kavtarov, A. P. Glebov

#### MOTILITY, MEMBRANE INTEGRITY AND DNA FRAGMENTATION IN STERLET SPERM DURING HYPOTHERMIC STORAGE IN ELECTROLYTE-FREE SOLUTION OF GLUCOSE AND TREHALOSE

**Abstract.** Hypothermic short-term storage of sperm in liquid state without freezing is an alternative to cryopreservation in those cases, when liquid nitrogen is not available or its use is undesirable, e. g. in air transportation. The sterlet (*Acipenser ruthenus*) sperm has a very low osmolality of semen plasma, no more than 80 mOsm/kg, that is an obstacle in the development of preserva-

tives for hypothermic storage. The experimental data on hypothermic storage of sterlet sperm in electrolyte-free solution of glucose, trehalose and albumin, isotonic to semen plasma showed that the ability of spermatozoa to motility activation decreased dramatically and was almost completely lost to the 24th day of storage. By this time, the amount of sperm with damaged membranes was  $44.9 \pm 5.3$  % and DNA fragmentation was  $34.5 \pm 4.9$  %, which obviously made the sperm infertile. Despite these, about 50 % of spermatozoa became motile, when activated for at least after 6 days of storage. Thus, the results of the study first demonstrate the possibility of effective hypothermic storage of sterlet sperm in the simple electrolyte-free solutions composed of sugars and albumin.

**Key words:** sturgeon fish, sterlet, hypothermia, sperm storage without freezing.

#### REFERENCES

1. DiLauro M. N., Krise W. F., Hendrix M. A., Baker S. E. Short-term cold storage of Atlantic sturgeon sperm. *Progr. Fish-Cult.*, 1994, vol. 56, pp. 143–144.
2. Conte F., Doroshov S., Lutes P. *Hatchery manual for the white sturgeon, Acipenser transmontanus, with application to other North American Acipenseridae*. Coop. Extension, Div. Agric. Nat. Resources, Univ. California, Davis, 1988. Publication #3322. 104 p.
3. Riel J. M., Yamauchi Y., Huang T. T. F., Grove J., Ward M. A. Short-term storage of human spermatozoa in electrolyte-free medium without freezing maintains sperm chromatin integrity better than cryopreservation. *Biol. Reprod.*, 2011, vol. 85, pp. 536–547.
4. Saito K., Kinoshita Y., Kanno H., Iwasaki A., Hosaka M. A new method of the electrolyte-free long-term preservation of human sperm at 4 °C. *Fertil. Steril.*, 1996, vol. 65, pp. 1210–1213.
5. Isaev D. A., Zaeva V. V., Bakuradze R. V., Krivokharchenko I. S., Zaletov S. Iu. Khranenie spermy che-loveka v techenie 2 nedel' bez zamorazhivaniia [Fortnight storage of human sperm without freezing]. *Problemy reproduksii*, 2009, no. 5, pp. 33–35.
6. Isaev D. A., Zakharova E. E., Kapralova I. V., Krivokharchenko I. S., Kartavenko T. V., Mikhailovskaia G. V., Zharskaia O. O., Zaletova V. V. Kratkosrochnoe khranenie spermy bez zamorazhivaniia v programmakh EKO/IKSI [Short-term liquid sperm storage in IVF/ICSI cycles]. *Problemy reproduksii*, 2015, no. 4, pp. 65–70.
7. Isaev D. A., Martynova M. Iu. Kratkosrochnoe khranenie spermy sterliadi v anaerobnykh usloviakh [Short-term sterlet sperm storage in anaerobic conditions]. *Sostoianie i perspektivy razvitiia presnovodnoi akvakul'tury. Mezhdunarodnaia nauchno-prakticheskaia konferentsiia (Moskva, 5–6 fevralia 2013 g.). Materialy dok-ladov*. Moscow, Izd-vo RGAU–MSKhA im. K. A. Timiriazeva, 2013. P. 189–195.
8. Isaev D. A., Martynova M. Iu., Shishanova E. I., Bubunets E. V., Starodvorskaia I. V. Gipotermicheskoe khranenie spermy osetrovnykh ryb v izotonicheskikh rastvorakh [Hypothermic storage of sturgeon fish milt in isotonic extenders]. *Rybovodstvo i rybnoe khoziaistvo*, 2013, no. 10, pp. 41–49.
9. Isaev D. A. Gipotermicheskoe khranenie spermy sterliadi v konservantakh na osnove tregalozy: predvaritel'noe issledovanie [Hypothermic storage of sterlet sperm in preservatives based on trehalose: preliminary study]. *Perspektivy i problemy razvitiia akvakul'tury v sostave APK. Vserossiiskaia nauchno-prakticheskaia kon-ferentsiia (Moskva, VVTs, 4–6 fevralia 2014 g.). Materialy dokladov*. Moscow, Pero Publ., 2014. P. 131–137.
10. Shaliutina A., Hulak M., Gazo I., Linhartova P., Linhart O. Effect of short-term storage on quality pa-rameters, DNA integrity, and oxidative stress in Russian (*Acipenser gueldenstaedtii*) and Siberian (*Acipenser baerii*) sturgeon sperm. *Anim. Reprod. Sci.*, 2013, vol. 139, pp. 127–135.
11. Piros B., Glogowski J., Kolman R., Rzemieniecki A., Domagala J., Horvath A., Urbanyi B., Ciereszko A. Biochemical characterization of Siberian sturgeon *Acipenser baeri* and sterlet *Acipenser ruthenus* milt plasma and spermatozoa. *Fish Physiol. and Biochem.*, 2002, vol. 26, pp. 289–295.
12. Psenicka M., Alavi S. M. H., Rodina M., Cosson J., Nebesarova J., Gela D., Linhart O. A comparative study on biological aspect of sperm in sterlet and Siberian sturgeon. *Cybium.*, 2008, vol. 32, suppl., pp. 179–180.
13. Fernandez J. L., Muriel L., Rivero M. T., Goyanes V., Vazquez R., Alvarez J. G. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J. Androl.*, 2003, vol. 24, pp. 59–66.
14. Aramli M. S., Azarin H., Farsi P. Motility parameters, adenosine triphosphate content and oxidative stress indices of sterlet, *Acipenser ruthenus* sperm after 6 days of storage. *Aquaculture Research*, 2015, July, pp. 1–6.
15. Gazo I., Linhartova P., Shaliutina A., Hulak M. Influence of environmentally relevant concentrations of vinclozolin on sperm quality, DNA integrity, and antioxidant responses in sterlet *Acipenser ruthenus* spermatozoa. *Chem. Biol. Interact.*, 2013, vol. 203, pp. 377–385.
16. Hulak M., Gazo I., Shaliutina A., Linhartova P. In vitro effects of bisphenol A on the quality parameters, oxidative stress, DNA integrity and adenosine triphosphate content in sterlet (*Acipenser ruthenus*) spermatozoa. *Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicol. Pharmacol.*, 2013, vol. 158, pp. 64–71.
17. Linhartova P., Gazo I., Shaliutina A., Hulak M. The in vitro effect of duroquinone on functional compe-tence, genomic integrity, and oxidative stress indices of sterlet (*Acipenser ruthenus*) spermatozoa. *Toxicol in Vi-tro*, 2013, vol. 27, pp. 1612–1619.

18. Linhartova P., Gazo I., Shaliutina-Kolesova A., Hulak M., Kaspar V. Effects of tetrabrombisphenol A on DNA integrity, oxidative stress, and sterlet (*Acipenser ruthenus*) spermatozoa quality variables. *Environ Toxicol.*, 2015, vol. 30, pp. 735–745.

19. Shaliutina-Kolesova A., Cosson J., Lebeda I., Gazo I., Shaliutina O., Dzyuba B., Linhart O. The influence of cryoprotectants on sturgeon (*Acipenser ruthenus*) sperm quality, DNA integrity, antioxidant responses, and resistance to oxidative stress. *Anim. Reprod. Sci.*, 2015, vol. 159, pp. 66–76.

20. Isaev D. A., Martynova M. Iu., Volodiaev I. V., Reviakin A. O. Vliianie tregalozy na sokhrannost' membran, podvizhnost' i fragmentatsiiu khromatina epididimal'nykh spermatozoidov myshei pri gipotermicheskom khranении v bezelektrolitnykh sredakh [Influence of trehalose on membrane integrity, motility and chromatin fragmentation of murine epididymal spermatozoa during hypothermic storage in electrolyte-free media]. *Biomedicine*, 2015, no. 4, pp. 69–76.

The article submitted to the editors 30.04.2016

### INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

**Isaev Dmitriy Aleksandrovich** – Russia, 142460, Village named after Vorovskiy, Noginsk region, Moscow region; All-Russian Scientific Research Institute of Irrigation Fish Breeding; Candidate of Biology; Leading Researcher; isaev@hotmail.ru.

**Shishanova Elena Ivanovna** – Russia, 142460, Village named after Vorovskiy, Noginsk region, Moscow region; All-Russian Scientific Research Institute of Irrigation Fish Breeding; Candidate of Biology; Deputy Director for Scientific Work; lena-vniir@mail.ru.

**Kavtarov Djavad Adukhovich** – Russia, 143222, Goretovo, Mozhaisk region, Moscow region; Mozhaisk Industrial-Experimental Fish-farming Plant; Director; mperz@mail.ru.

**Glebov Alexander Pavlovich** – Russia, 143222, Goretovo, Mozhaisk region, Moscow region; Mozhaisk Industrial-Experimental Fish-farming Plant; Chief Pisciculturist; glebov74@rambler.ru.

