

ЦИТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ СПЕРМИЕВ РУССКОГО ОСЕТРА *ACIPENSER GULDENSHTADTI* ПОСЛЕ КРИОКОНСЕРВАЦИИ

© Г. В. Земков, Т. И. Акимочкина¹

Кафедра биотехнологии и биоэкологии Астраханского государственного университета;

¹ электронный адрес: akimochkinatania@mail.ru

На примере семенной жидкости русского осетра *Acipenser guldenshtadti* (Brandt) показано, что разработанный нами криопротектор, в состав которого входят диметилсульфоксид и глицерин с добавкой гепарина, не вызывает существенных морфологических нарушений спермиев после хранения семенной жидкости при низкой и сверхнизкой температурах. При этом спермии теряют способность поступательного движения, но сохраняют колебательное движение, что является преимуществом перед стандартным криопротектором Штайна. Нами показано, что сахароза и маннит в составе стандартного криопротектора после размораживания семенной жидкости вызывают существенные морфологические нарушения спермиев с полной потерей двигательной активности. Модифицированный нами состав криопротектора не влияет на морфофункциональное состояние спермиев после хранения семенной жидкости при низкой и сверхнизкой температурах.

Ключевые слова: криоконсервация, криоустойчивость, дефростация, спермии, криопротекторы, русский осетр *Acipenser guldenshtadti*, цитоморфологический анализ.

По мере расширения техногенной среды многие виды биообъектов природного комплекса уже исчезли, другие находятся на грани исчезновения. В связи с этим сохранение генофонда ценных видов животных и растений в последние 30—40 лет становится все более актуальной проблемой, решение которой традиционно воплощается в создании заповедных зон национальных парков и заказников. Однако такой подход в настоящее время имеет ограничения из-за трудностей выделения больших по площади территорий. В настоящее время в России и за рубежом все шире проводятся исследования по разработке биотехники криоконсервации в жидком азоте семенной жидкости диких и сельскохозяйственных животных, что позволяет хранить ее в течение длительного времени (Вепринцев, Ротт, 1984).

В последнее время опубликованы результаты замораживания биоматериала при низкой температуре (до –80 °С) в последовательном режиме криоконсервации (Ивченко и др., 2004), что имеет большое значение для районов, где существуют трудности доставки жидкого азота. Как известно, при замораживании клетки разрушаются кристаллами льда (Лозина-Лозинский, 1972), поэтому исследования в основном направлены на разработку искусственных сред, в состав которых входили бы вещества, обладающие высокими криопротекторными свойствами. Идея криоконсервации репродуктивных клеток была осуществлена на примере самцов млекопитающих животных и приобрела прикладное значение в 1950-е годы (Смирнов, 1951). Наибольший успех был получен при криоконсервации семенной жидкости сельскохозяйственных животных (Luyet, Geheño, 1940; Mazur, 1963,

1966; Luyet, 1966; Pushkar et al., 1976; Желтобрюх и др., 1977; Платов, Волков, 1978; Курбатов и др., 1988). В настоящее время эти разработки широко используются в практике животноводства (Айбазов, 2004).

Со временем все острее возникала проблема охраны исчезающих диких животных, в том числе ценных видов рыб, например осетровых Каспия. С 1990 по 1994 г. численность осетра сократилась более чем в 2.1 раза, севрюги — в 2.2, белуги — в 1.7 раза (Власенко, 1995). Исследования, прямо связанные с криоконсервацией семенной жидкости рыб, наиболее широко стали развиваться в последние 20 лет. В настоящее время существует обширная научная информация по криоконсервации семенной жидкости осетровых, лососевых и карповых видов рыб (Пушкарь и др., 1976, 1979а, 1979б; Копейка, Новиков, 1983; Андреев, 1996; Цветкова, Савушкина, 1997; Ананьев и др., 1998а, 1998б; Бех, 2004).

Основным показателем оплодотворяющей способности спермиев до сих пор остается подвижность спермиев после активации их водой, что обычно применяется в рыбоводной практике. Однако имеются данные, свидетельствующие о сохранении оплодотворяющей способности спермиев после размораживания, утративших подвижность и с различными морфологическими нарушениями (Максудов и др., 1988). В ряде опубликованных работ представлены данные о высокой оплодотворяющей способности размороженной семенной жидкости рыб: например, для спермиев русского осетра она составила 54 %, при этом количество подвижных спермиев составило в среднем 56.70 ± 5.12 % (Пронина, 2004). К сожалению, состав криопротектора, время и характер подвижности спермиев,

время и способы оплодотворения автор не указывает. Наряду с положительным опытом, есть данные о низкой оплодотворяющей способности спермиев выюна (Зинченко и др., 2004), севрюги и белорыбицы (Земков и др., 2005).

Основными компонентами известных по составу криопротекторов являются диметилсульфоксид (ДМСО), глицерин, желток свежих куриных яиц, глицин, растворы макро- и микроэлементов, буферные растворы и многие другие вещества. Варьирование состава криопротекторов стали проводить на основе среды Штайна (Ананьев и др., 1998а, 1998б), а в настоящее время есть сведения о новых веществах, обладающих протекторными свойствами (Цветкова, Савушкина, 1997; Мирзоян и др., 2004; Цветкова и др., 2004).

На современном этапе поиск оптимальных условий биотехники криоконсервации спермиев рыб по существу сводится к разработке состава криопротекторов (Ананьев, 1997; Вепринцев, Пилиев, 2002), и в меньшей степени обращается внимание на изучение механизмов подвижности спермиев. Замораживание семенной жидкости следует рассматривать как температурный шок для клетки, поэтому важно в процессе криоконсервации провести наблюдения за морфологическим состоянием спермиев с целью выявления цитоструктурных нарушений, особенно в зависимости от состава криопротекторной среды. По нашему мнению, с исследованиями в этом направлении открывается возможность более целенаправленного подбора состава криопротекторных смесей и разрешается ряд вопросов, связанных с регенерацией неподвижных спермиев.

Целью проведенных нами экспериментов было выявление морфологических нарушений спермиев русского осетра в сопоставлении с их подвижностью после хранения семенной жидкости при сверхнизкой и низкой температурах, при изменении состава криопротекторов.

Материал и методика

Семенную жидкость от репродуктивных самцов русского осетра *Acipenser guldenshtadti* (Brandt) яровой расы собирали на рыбодоводных предприятиях Астраханской обл. методом сцеживания после гипофизарных инъекций. Всего было взято 15 проб от 15 самцов, в каждой пробе по 3—5 мл семенной жидкости. В наших собственных исследованиях, проведенных с 2004 по 2008 г., мы применяли стандартный криопротектор для различных видов рыб, состав которого апробирован на семенной жидкости белуги и севрюги (Ананьев и др., 1998а). В состав данного криопротектора входили минеральные соли (6.5 г NaCl, 0.25 г KCl, 0.3 г CaCl₂ и 2 г NaHCO₃) и вещества, обладающие протекторными свойствами (сахароза, маннит общей навеской 2 г, желток и ДМСО по 10 %). Полученные нами предварительные данные показали, что в среде стандартного криопротектора до и после замораживания семенной жидкости спермии теряют подвижность, а сами клетки имеют различные по степени морфологические нарушения. В связи с этим мы сравнивали эффективность стандартного криопротектора: в одном случае оставляли его состав без изменений, а в другом — исключали сахарозу и маннит, обладающие высокой осмолярностью. Все образцы семенной жидкости параллельно замораживали с добавкой разработанной нами протекторной смеси, в состав которой входили глицерин, ДМСО и гепарин. Тем самым исключалось внесение дополнительного количества воды, используемой в

Состав криопротекторных смесей

Вариант	Состав криопротектора	Литературный источник
1	Стандартный раствор	Ананьев и др., 1998а
2	Стандартный раствор без маннита	Наша модификация
3	Стандартный раствор без сахарозы	» »
4	Стандартный раствор без маннита и сахарозы	» »
5	Глицерин 0.05 мл, ДМСО 0.05 мл, гепарин 0.04 мл	Новый состав, разработанный нами

качестве растворителя при составлении стандартного криопротектора.

Для определения оптимальной концентрации каждое вещество брали в следующих объемах: 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 0.4 и 0.8 мл; затем приливали к 0.5 мл семенной жидкости, перемешивали и определяли подвижность спермиев после активации их речной водой, отмечая максимальную концентрацию вещества, при которой время подвижности и число подвижных клеток не отличались от таковых в нативной семенной жидкости без добавок указанных веществ (контроль). Для глицерина и ДМСО оптимальные концентрации были равными и составили 0.05, а для гепарина — 0.04 мл. Таким образом определяли оптимальный объем каждого вещества, затем их смешивали и полученную смесь в количестве 0.3 мл приливали к 0.5 мл свежей семенной жидкости и вновь определяли подвижность спермиев. Всего было испытано 5 вариантов состава криопротекторов (см. таблицу).

Перед замораживанием образцы семенной жидкости помещали в холодильник при 8 °С на 30 мин и затем замораживали двумя способами: ступенчатым в пробирках Эпендорфа и сверхбыстрым в гранулах (Ананьев и др., 1998а). Для замораживания в гранулах в жидкий азот помещали фторопластовую пластинку (планшет) с ячейками объемом 0.05 мл, которые заполняли смесью семенной жидкости и криопротектора соответствующего состава. Гранулы от каждого самца собирали в отдельный контейнер, погружая его в сосуд Дьюара с жидким азотом для хранения. При ступенчатом замораживании семенную жидкость с криопротектором по 0.5 мл смешивали в пробирках Эпендорфа, которые затем плавно погружали в жидкий азот. На первой ступени замораживание до –30 °С проводили в течение 5 мин, а на второй ступени до –80 °С в течение 20 мин, после чего контейнер с пробами погружали прямо в жидкий азот.

Использовали два режима хранения семенной жидкости русского осетра: –196 °С в условиях жидкого азота и –22 °С в морозильной камере. Качество нативной и дефростированной спермы определяли по подвижности спермиев и их морфологической целостности. Подвижность спермиев активировали речной водой, фиксируя время начала и остановки поступательного и колебательного движений клеток. Подвижность измеряли по 5-балльной шкале (Персов, 1941), по которой 5 баллов — максимальная, а 1 балл — нулевая подвижность. Долю подвижных клеток выражали в процентах. За 100 % принимали число спермиев при отсутствии неподвижных клеток, долю которых также выражали в процентах, считая от их общего числа в поле зрения микроскопа.

Для морфологической оценки спермиев приготавливали мазки семенной жидкости по методике, используе-

мой для крови рыб (Иванова, 1982), окраску мазков проводили гематоксилином с эозином. Далее морфологические особенности спермиев выявляли путем сравнения клеток до и после замораживания семенной жидкости. Изображения с микроскопа (МИКМЕД 5) переносили на компьютер с помощью видеоокуляра НВ-35 с последующей распечаткой.

Результаты

Все пробы нативной семенной жидкости до замораживания содержали спермии с хорошо выраженными и характерными морфологическими признаками. Головная часть имела обычную форму (продолговатую с расширением у основания), характерную для спермиев осетра (Гинзбург, Детлаф, 1975), хвостовая часть вытянута, отчетливо выражена (рис. 1).

На фоне нормального строения подвижность спермиев отвечала всем рыбоводным требованиям. У всех особей в образцах семенной жидкости время поступательного движения спермиев в среднем составляло 3,8 мин, а доля подвижных клеток — 100 %, считая от общего их количества в поле зрения микроскопа, что соответствует 5 баллам.

После хранения замороженной семенной жидкости в жидком азоте обнаружено широкое варьирование степени нарушений структурной организации спермиев русского осетра в зависимости от состава криопротекторов. После замораживания семенной жидкости в жидком азоте при добавлении криопротектора 1 в одних случаях спермии были расположены хаотично, приобретали округлую форму, хвостовая часть просматривалась с трудом (рис. 2, а). В других случаях наблюдали набухание, гипопигментацию, значительное увеличение размеров головной части спермиев, имеющей округлую форму, с явными признаками деструкции; хвостовая часть просматривалась с трудом (рис. 2, б). Различную степень повреждения головной части клеток в аналогичных условиях замораживания и дефростации мы расцениваем как результат индивидуальной криоустойчивости спермиев.

Использование криопротектора 3 с добавлением маннита без сахарозы приводило к сморщиванию спермиев и уменьшению их размеров (рис. 3, а), а внесение вместо маннита сахарозы (криопротектор 2) вызывало шизоци-

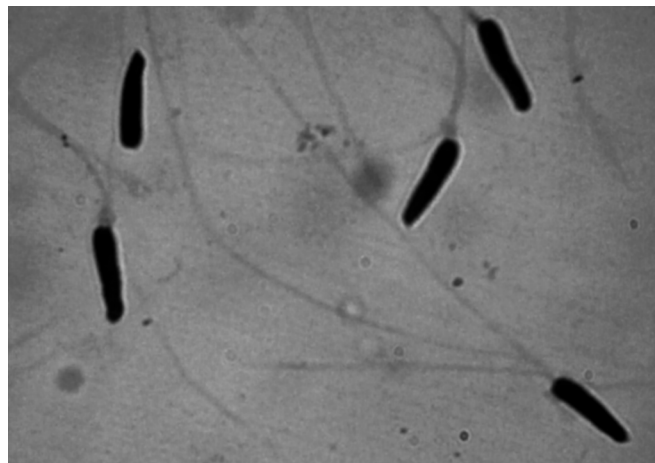


Рис. 1. Мазок нативной семенной жидкости русского осетра до замораживания (контроль).

Головная часть правильной формы, длина хвостовой части пропорциональна головной, без признаков фрагментации и искривления. Об. 100×.

тоз; хвостовая часть просматривалась более четко с добавкой сахарозы, чем с добавкой маннита (рис. 3, б).

При использовании криопротектора 4 без внесения сахарозы и маннита в некоторых случаях и на отдельных участках мазка наблюдалось слипание спермиев (агрегация), но головная часть сохраняла обычную форму. Хвостовая часть клеток хорошо просматривалась (рис. 4); следовательно, применение данного криопротектора предпочтительнее без добавок маннита и сахарозы.

При добавлении в семенную жидкость модифицированного нами криопротектора 5 почти во всех случаях хвостовая часть спермиев после дефростации едва просматривалась, а головная часть выявлялась четко, оставаясь неповрежденной, сохраняя обычную форму (рис. 5, а). Это очень близко к морфологии спермиев в контроле до замораживания нативной семенной жидкости. В единичных случаях при использовании этого же криопротектора наблюдали набухание головки спермиев, отдельные клетки с явными признаками деструкции (рис. 5, б), что также указывало на индивидуальную криоустойчивость клеток у подопытных рыб.

Для сохранения спермиев от разрушений большое значение имеет скорость замораживания. Нами установ-

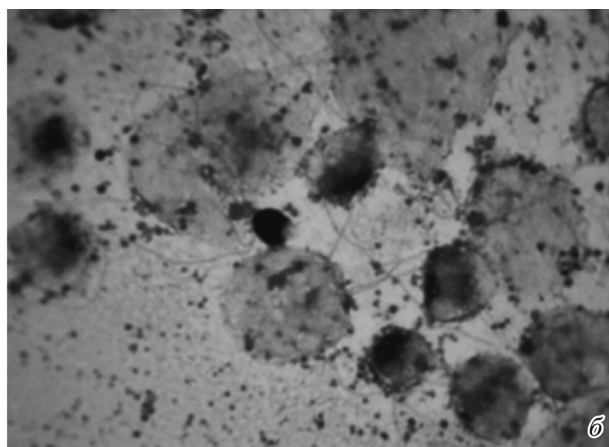
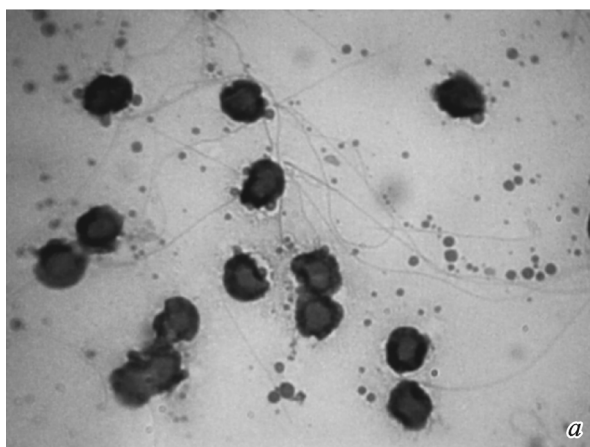


Рис. 2. Мазок дефростированной семенной жидкости русского осетра с добавлением криопротектора 1.

а — изменение формы головной части; б — набухание клеток, гипопигментация. Об. 100×.

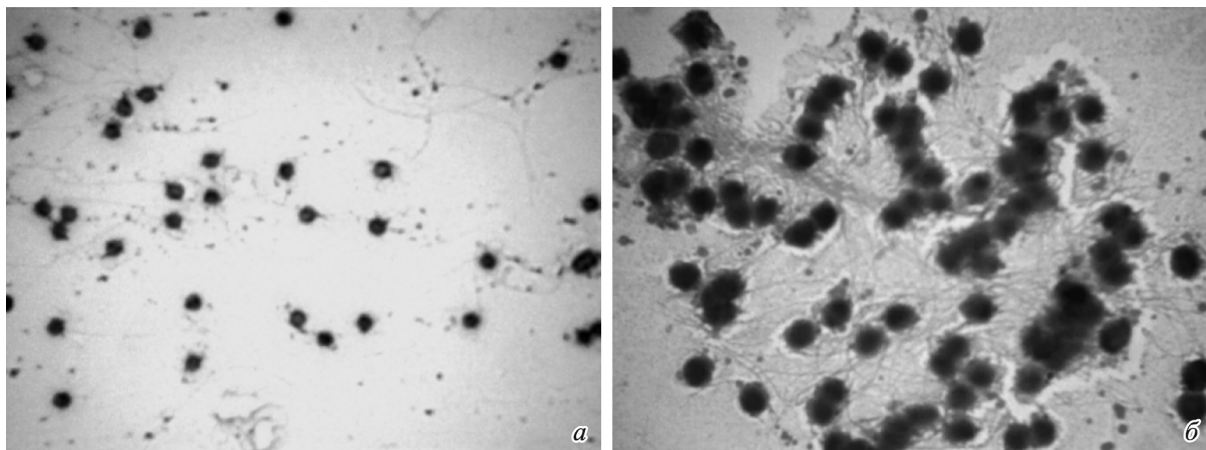


Рис. 3. Дефростированная семенная жидкость русского осетра с добавлением криопротектора 3 (а) и криопротектора 2 (б). Об. 100х.

лено, что при ступенчатом замораживании в пробирках Эпендорфа с криопротектором 5 наряду с незначительными изменениями наблюдали пикнотичную и округлую по форме головную часть спермиев, а жгутик с признаками деструкции просматривался с трудом (рис. 6, а). После хранения семенной жидкости в виде гранул головная часть спермиев в целом имела продолговатую форму, но отмечены ее небольшое набухание и искривление (рис. 6, б). Результаты наших исследований показали, что при хранении семенной жидкости при различной температуре (-196 и -22 °C) в криопротекторе 5 морфологических нарушений спермиев не наблюдалось (рис. 7).

На фоне всех описанных выше морфологических нарушений спермиев после дефростации семенной жидкости в криопротекторах различного состава важно отметить существенные изменения времени подвижности спермиев. При использовании разработанного нами протектора 5 лишь в отдельных случаях сохранялось поступательное движение, при этом доля подвижных клеток в среднем составляла 30 % в поле зрения микроскопа. Индивидуальное время колебательного движения составляло 1—2 мин и наблюдалось почти во всех случаях.

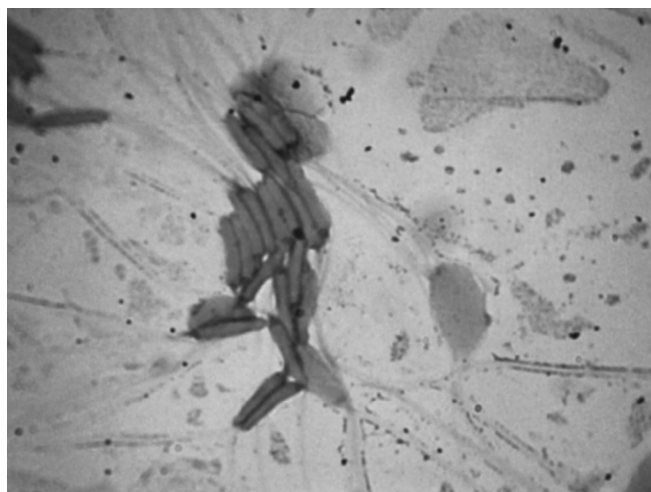


Рис. 4. Мазок дефростированной семенной жидкости русского осетра, замороженной с криопротектором 4 без внесения сахаров. Агрегация спермиев. Об. 100х.

Обсуждение

Данные проведенных нами экспериментальных исследований убедительно свидетельствуют о зависимости морфофункциональной организации спермиев от состава криопротекторов, предназначенных для защиты клеток от разрушения при замораживании семенной жидкости. Безусловно, причиной заметного снижения подвижности спермиев после замораживания семенной жидкости могут быть нарушения на субклеточном и молекулярном уровнях, о чем в доступной нам литературе сведений нет. Несмотря на это, цитоморфологический анализ спермиев в определенной мере служит объективным тестом на этапе разработки оптимальной по составу криопротекторной смеси. В наших исследованиях также доказано, что высокомолекулярные вещества и водные растворы криокомпонентов существенно снижают морфофункциональное качество спермиев после хранения семенной жидкости при низкой температуре. Криосмесь, аналогичную нашему криопротектору (но без гепарина), применяли для замораживания эмбрионов, личинок и молоди гребневика *Beroe ovata* (Дудкин и др., 2004), что позволило получить положительный эффект антифризного действия разработанного авторами состава протекторной смеси; это в принципе согласуется с нашими экспериментальными данными. Особое внимание обращает на себя факт сохранения частичной подвижности спермиев по сравнению со стандартным криопротектором.

Исключение сахарозы и маннита из состава стандартного криопротектора, как показали результаты проведенных нами исследований, снижает степень морфологических нарушений спермиев, но их подвижность заметно ниже, чем после содержания в криопротекторе нашей модификации. Видимо, в перспективе следует изучить и другие модификации состава стандартного криопротектора, что всегда лимитируется получением семенной жидкости осетра в необходимом для исследовательских целей объеме. Например, в поисковых исследованиях для криоконсервации спермы веслоноса было испытано 50 разнообразных модификаций состава криопротектора (Цветкова и др., 1997, 2004).

Многие специалисты в своих исследованиях используют разнообразные по своей природе криопротекторные вещества, что, с нашей точки зрения, является следствием применения непроизводительного метода проб и ошибок

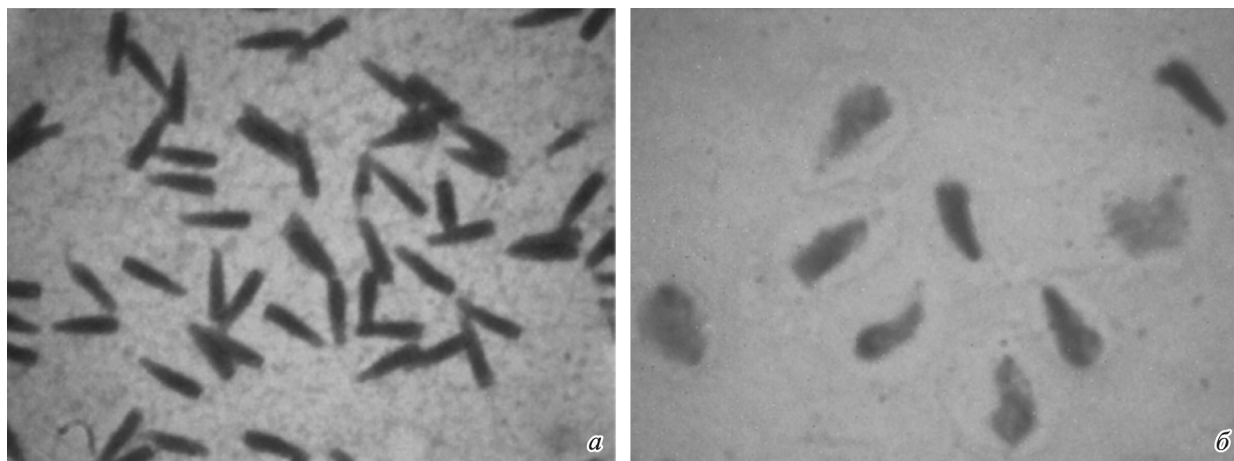


Рис. 5. Дефростированная семенная жидкость русского осетра при добавлении криопротектора 5.
а — сохранилась форма спермиев; *б* — набухание и деформация головной части, гипопигментация. Об. 100×.

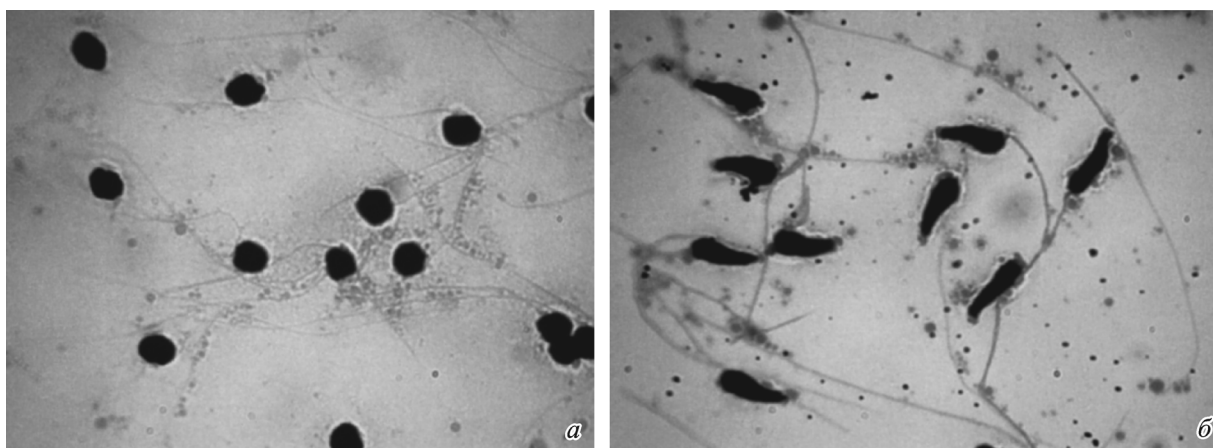


Рис. 6. Семенная жидкость русского осетра при добавлении криопротектора 5, замороженная в жидком азоте ступенчатым способом в пробирках Эпандорфа (*а*) и сверхбыстрым способом в гранулах (*б*).
 Об. 100×.

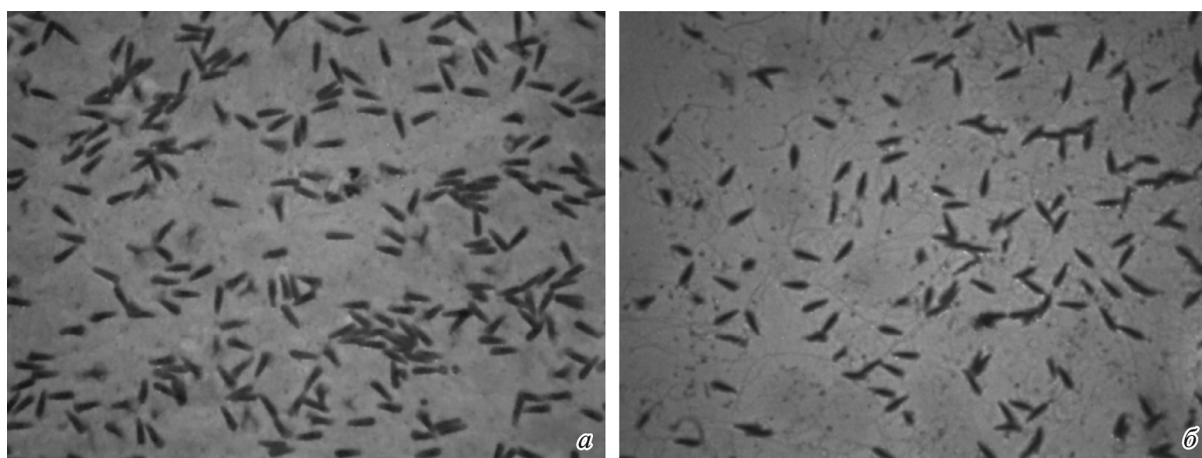


Рис. 7. Дефростированная семенная жидкость русского осетра, замороженная в криопротекторе 5 при различной температуре.
а — при сверхнизкой температуре -195°C ; *б* — при низкой температуре -22°C . Об. 40×.

из-за отсутствия знаний реальных структурных нарушений на клеточном и субклеточном уровнях и механизма метаболических реакций. В современной научной литературе имеются данные о высоких результатах оплодотворения икры дефростированной семенной жидкостью различных видов рыб (Цветкова, Савушкина, 1997; Пронина, 2004; Цветкова и др., 2004; Пономарева и др., 2007).

Имеются также данные об усилении протективного действия при добавлении минеральных солей, токоферола, ДМСО и других веществ. Эти добавки позволили получить высокую долю оплодотворения икры русского осетра (62.4—78.0 %), что отличалось на 5—7 % от количества оплодотворенной икры нативной семенной жидкостью (контроль) у того же вида (Цветкова, Савушкина, 1997; Цветкова и др., 2004). В той же работе приводятся сведения по сибирскому осетру, выклев предличинок которого составил 95.5 % от общего числа заложенной на инкубацию икры и оплодотворенной дефростированной семенной жидкостью. Аналогичные сведения приводят и другие авторы (Пронина, 2004). К сожалению, авторы этих работ не указывают количественного состава используемых ими криопротекторов.

Неполнота сведений по биотехнике криоконсервации, оплодотворения икры рыб и количественного состава криопротекторов в упомянутых выше работах не позволяет, к сожалению, сопоставить наши данные с материалами авторов этих публикаций. Особенно это касается морфологического анализа спермиев и характера их подвижности после криоконсервации семенной жидкости. Поэтому данные различных авторов и наши в определенной степени противоречивы (Земков и др., 2005), прежде всего из-за отсутствия унифицированных методов исследований. В этой связи необходимо отметить также известное в рыбоводной практике варьирование качества репродуктивной икры рыб, что прямо может сказываться на эффективности тестирования дефростированных спермиев по оплодотворяемости.

Известно, что одной из причин мужского бесплодия является утрата подвижности спермиев. 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, и обеспечивают ундуляцию жгутика (Гинзбург, Детлаф, 1975). 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, обладающему АТФазной активностью (Крепс, 1979). Имеются данные, свидетельствующие об открытии белка динеина, который, как предполагают авторы, обеспечивает ундуляцию хвостовой части спермиев мыши (Vorobjev et al., 2001; McGrath et al., 2003). Высокую подвижность спермиев при низкой оплодотворяемости наблюдали и на сельскохозяйственных животных (Айбазов и др., 2004). Из этого следует, что доля оплодотворения икры рыб семенной жидкостью после ее хранения при низкой и сверхнизкой температурах не может быть окончательным и единственным критерием оплодотворяющей способности спермиев, так как качество икры также имеет индивидуальные колебания, что часто наблюдается в рыбоводной практике.

В настоящее время имеются данные о возможности восстановления подвижности спермиев после дефростации семенной жидкости рыб после добавления растворов

различных веществ, например карбоната натрия (Цветкова и др., 2004). В последующих исследованиях данные цитоморфологического анализа спермиев совместно с изучением эффективности индукторов их подвижности позволят ближе подойти к пониманию механизма криоповреждений и их обратимости.

Как уже отмечено выше, большое значение имели бы исследования криоустойчивости клеток на молекулярном уровне. Известны результаты изучения ренатурации белков в водных растворах после их замораживания при низкой температуре путем большого разбавления водой (Кяйвяряйнен, 1980). Обратимую денатурацию некоторых ферментов наблюдали после воздействия на белок повышенной и низкой температур (Кретович, 1986). С позиций современных знаний, именно диффузия внутримолекулярной воды обеспечивает сворачивание белковой молекулы при переходе из нативного в расплавленное состояние и обратно (Варфоломеев, 2005).

Таким образом, восстановление подвижности спермиев после хранения их при низкой и сверхнизкой температурах является одним из направлений исследований в области криобиологии. Важным биотестом качества спермиев в разработке биотехники криоконсервации семенной жидкости животных, как показали наши исследования, является проведение цитоморфологического анализа состояния клеток. Результаты исследований также показали приемлемость замораживания семенной жидкости при низкой температуре. В этой связи современная морозильная техника позволяет в заданном режиме осуществлять замораживание с автоматическим регулированием скорости криоконсервации биоматериала, в том числе половых клеток (Ивченко и др., 2004). Можно утверждать, что снижение объема воды в качестве разбавителя и высокоосмотических веществ в криосмесь существенно повышает ее криопротекторные свойства. Наконец, важное значение имеют данные настоящей работы по замораживанию семенной жидкости в виде гранул. Этот способ мы апробировали при непосредственной помощи научного сотрудника Института биофизики клетки РАН А. А. Андреева, которому приносим благодарность.

Работа выполнена при финансовой поддержке Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере и средств Астраханского государственного университета.

Список литературы

- Айбазов В. М., Трубникова П. В. 2004. Замораживание и использование спермы баранов-производителей (рекомендации). Ставрополь. 23 с.
- Ананьев В. И. 1997. Концепция сохранения и устойчивого использования биоразнообразия с применением методов криоконсервации геномов гидробионтов. Рыб. хоз-во. Сер. Аквакультура. 1 : 1—36.
- Ананьев В. И., Андреев А. А., Голованова Т. С., Петропавлов Н. Н., Цветкова Л. И. 1998а. Опыт криоконсервации спермы белорыбицы и белуги. Рыб. хоз-во. Сер. Аквакультура. 1 : 25—32.
- Ананьев В. И., Цветкова Л. И., Манохина М. С., Рыжков Л. П., Докина С. Б. 1998б. Проблема сохранения геномов лососевых и осетровых рыб. В кн.: Аналитическая информация. «Аквакультура». Вып. 1. М.: ЭКИНАС. 2—24.
- Андреев А. А. 1996. Криоконсервация спермы белорыбицы и белуги: Матер. рабоч. совещ. «Криоконсервация генетических ресурсов». Пущино. 96—98.

- Бех В. В. 2004. Крיוконсервация спермы карпов украинских пород: Матер. Междунар. конф. «Сохранение генетических ресурсов». Цитология. 46 (9): 769.
- Варфоломеев С. Д. 2005. Химическая энзимология. М.: Академия. 480 с.
- Вепринцев Б. Н., Пилюев С. А. 2002. Сохранить генофонд рыб и водных беспозвоночных. В кн.: Избранные труды ВНИИПРХ. М. 1 : 366—369.
- Вепринцев Б. Н., Ротт Н. Н. 1984. Консервация генетических ресурсов. Проблема сохранения генофонда. Пушино. 48 с.
- Власенко А. Д. 1995. Состояние рыбных запасов Волго-Каспийского бассейна. Тез. докл. Междунар. конф. Астрахань: 157—158.
- Гинзбург А. С., Детлаф Т. А. 1975. Осетр *Acipenser gulden-shtadi*. В кн.: Объекты биологии развития. М.: Наука. 217—260.
- Дудкин С. И., Корниенко Г. Г., Колесникова Л. В., Цема Н. И. 2004. Крיוконсервация яиц и ранних онтогенетических стадий гребневика *Beroe ovata*: Матер. Междунар. конф. «Сохранение генетических ресурсов». Цитология. 46 (9) : 788—789.
- Желтобрюх Н. А., Ивахненко В. К., Тутова Л. А. 1977. Средства для замораживания спермы. № заявки: 2551114/30-15. Регистрационный номер: 677750.
- Земков Г. В., Тихомиров А. М., Акимочкина Т. И. 2005. Оплодотворяемость икры белорыбицы после крיוконсервации репродуктивных клеток в условиях сверхнизкой температуры. В кн.: Эколого-биологические проблемы бассейна Каспийского моря. Астрахань. Изд. дом «Астраханский университет». 88—89.
- Зинченко А. В., Зинченко В. Д., Копейка Е. Ф., Онищенко Е. В. 2004. О возможных факторах повреждения биологических объектов и их ДНК при крיוконсервации: Матер. Междунар. конф. «Сохранение генетических ресурсов». Цитология. 46 (9) : 796.
- Иванова Н. Т. 1982. Атлас клеток крови рыб (сравнительная морфология и классификация форменных элементов крови рыб). М.: Легкая и пищевая пром-сть. 184 с.
- Ивченко Н. Ф., Ивченко С. Н., Мельник А. В. 2004. Персональные крיוгенные банки: Матер. Междунар. конф. «Сохранение генетических ресурсов». Цитология. 46 (9) : 797.
- Копейка Е. Ф., Новиков А. Н. 1983. Крיוконсервирование спермы рыб. В кн.: Крיוконсервирование клеточных суспензий. Киев: Наук. думка. 204—215.
- Крепс Е. М. 1979. О путях развития эволюционной биохимии. В кн.: Руководство по физиологии. Эволюционная физиология. Л.: Наука. 1 : 394—426.
- Кретович В. Л. 1986. Введение в энзимологию. М.: Наука. 330 с.
- Курбатов А. Д., Платов Е. М., Корбан Н. В. 1988. Крיוконсервация спермы сельскохозяйственных животных. Л.: Агропромиздат. 255 с.
- Кйивярйнен А. И. 1980. Динамическое поведение белков в водной среде и их функции. Л.: Наука. 270 с.
- Лозина-Лозинский Л. К. 1972. Очерки по кривофизиологии. Л.: Наука. 288 с.
- Максудов Г. Ю., Артюшкова В. А., Трошко Е. В. 1988. Оценка качества семени животных. Пушино. 42 с.
- Мирзоян А. В., Небесихина Н. А., Войнова Н. В., Чистяков В. А. 2004. Аскорбиновая кислота и лизин подавляют гено-токсический эффект глубокой заморозки спермы русского осетра: Матер. Междунар. конф. «Сохранение генетических ресурсов». Цитология. 46 (9) : 821—822.
- Персов Г. М. 1941. Учет осетроводных работ в связи с применением гипофизарных инъекций. В кн.: Метод гипофизарных инъекций и его роль в воспроизводстве рыбных запасов. Л.: Изд-во ЛГУ. 42—50.
- Платов Е. М., Волков А. С. 1978. Временные рекомендации по глубокому замораживанию и использованию спермы баранов-производителей. М. 28 с.
- Пономарева Е. Н., Тихомиров А. М., Богатырева М. М., Болонина Н. В. 2007. Результаты оплодотворения икры русского осетра и севрюги дефростированной спермой. В кн.: Актуальные проблемы биологии воспроизводства животных. Дубровицы: ВНИИЖ. 478—480.
- Пронина Н. Д. 2004. Оценка качества крיוконсервированной спермы рыб: Матер. Междунар. конф. «Сохранение генетических ресурсов». Цитология. 46 (9) : 843—844.
- Пушкар Н. С., Белоус А. М., Копейка Е. Ф., Новиков А. Н., Олейник С. Т., Чаплай Е. В., Ишков Г. С. 1979а. Способ консервирования спермы рыб. Регистрационный номер: 818578.
- Пушкар Н. С., Белоус А. М., Новиков А. Н., Копейка Е. Ф., Олейник С. Т. 1979б. Способ консервирования спермы рыб. Регистрационный номер: 786947.
- Пушкар Н. С., Иткин Ю. А., Копейка Е. Ф., Гордиенко Е. А., Бронштейн В. Л., Глушко Т. А. 1976. Способ крיוконсервирования спермы рыб. Регистрационный номер: 591164.
- Смирнов И. В. 1951. Сохранение семени сельскохозяйственных животных при температурах -78 и -183 °C. Социалистическое животноводство. 1 : 94—95.
- Цветкова Л. И., Докина О. Б., Пронина Н. Д., Миленко В. А., Тансыкбаев А. Н. 2004. Крיוконсервация спермы осетровых рыб — объектов аквакультуры. В кн.: Аквакультура осетровых рыб: достижения и перспективы развития. Астрахань. 213—214.
- Цветкова Л. И., Савушкина С. И. 1997. Методическое пособие по крיוконсервации спермы карпа, лососевых и осетровых видов рыб. М.: ВНИИПРХ. 11 с.
- Luyet B. J. 1966. On the possible biological significance of some physical changes encountered in the cooling and the rewarming of aqueous-solutions. In: Cellular injury and resistance in freezing organisms. Japan. 2 : 1—20.
- Luyet B. J., Geheio P. M. 1940. Life and death of low temperatures. *Biodynamica*. 341.
- Mazur P. 1963. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and likelihood of intracellular water. *J. Gen. Physiol.* 47 : 347—369.
- Mazur P. 1966. Theoretical and experimental effects of cooling and warming velocity in the survival of frozen and thawed cells. *Cryobiology*. 2 : 181—192.
- McGrath J., Somlo S., Makova S., Tian X., Brueckner M. 2003. Two populations of node monocilia initiate left-right asymmetry in the mouse. *Cell*. 114 : 61—73.
- Pushkar N. S., Itkin Yu. A., Bronstein V. L. 1976. On the problem of dehydration and intracellular crystallization during freezing of cell suspension. *Cell*. 13 : 147—152.
- Vorobjev I., Malikov V., Rodionov V. 2001. Self-organization of a radial microtubule array by dynein-dependent nucleation of microtubules. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 98 : 10 160—10 165.

CYTOLOGICAL, MORPHOLOGICAL AND FUNCTIONAL CHANGES
OF RUSSIAN STURGEONS'S SPERM CELLS AFTER CRYOPRESERVATIONG. V. Zemkov, T. I. Akimochkina¹

Department of Biotechnologies and Bioecology of Astrakhan State University, Astrakhan;

¹ mail: akimochkinatanja@mail.ru

The article presents some experimental results concerning the problem of genetic conservation of valuable and endangered animal species. Biotechnical development of the cryopreservation of spermatoc cells for the purpose of their extended storage at low and ultra low temperatures is a priority line of the investigations in the topical area and implies creation of animal genomes cryobanks. It is known that water crystals of plasma and the cell itself often cause the spermatholysis in the course of freezing. That is why the search for the substances with cryoprotective properties continues up to the present moment. In this study, we investigated cryoprotective properties of glycerin, dimethyl sulfoxide and heparin in different proportions using spermatoc fluid of sturgeon *Acipenser guldenshtadti* (Brandt). These results obtained were compared with the cryoprotectors of well-known composition. In addition, freezing and storage of the spermatoc fluid were executed in two variations: at low and ultralow temperatures. Cold tolerance of the sperm cells was estimated by the sperm mobility and by light microscopy morphological analysis of the cells. It was shown to be linked to the composition of cryoprotectors. The heaviest violations were observed under addition of osmotic active substances, some inorganic compounds among them. Principle of our modification is based on that we used fluid substances: glycerin, dimethyl sulfoxide, heparin eliminating water as a solvent. The results obtained showed that our modified cryoprotectors and the standard cryoprotectors had equal efficiency. The article also presents the data on the spermatoc fluid freezing at low temperature. They are important in case of modern freezing systems.

Key words: cryopreservation, cold tolerance, defrostation, sperm, cryoprotectors, *Acipenser guldenshtadti* (Brandt), cytomorphological analyse.
