

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. (ISSN: 2074-5990. РИНЦ).

Isaev DA, Martynova MYu, Shishanova EI, Bubunets EV, Starodvorskaya IV. Hypothermic storage of sturgeon fish milt in isotonic extenders. Rybovodstvo i Rybnoe Hozyajstvo (Russian Journal of Fish Culture and Farming). 2013 Oct; 10:41-9. (Article in Russian).

УДК 639.3.034.2

ГИПОТЕРМИЧЕСКОЕ ХРАНЕНИЕ СПЕРМЫ ОСЕТРОВЫХ РЫБ В ИЗОТОНИЧЕСКИХ РАСТВОРАХ

Исаев Д.А.^{1*}, Мартынова М.Ю.¹, Шишанова Е.И., Бубунец Э.В.², Стародворская И.В.³

¹ ГНУ Всероссийский НИИ ирригационного рыбоводства РАСХН

² ФГБУ «Центральное управление по рыбохозяйственной экспертизе и нормативам по сохранению, воспроизводству водных биологических ресурсов и акклиматизации»

³ ООО «СМП «Энергетик-Э»

*Аннотация. В статье приведены экспериментальные данные о гипотермическом хранении спермы русского осетра *Acipenser gueldenstaedtii*, сибирского осетра *Acipenser baeri* и белуги *Huso huso* в трех различных изотонических консервантах. Продемонстрирована возможность сохранения без замораживания спермы осетровых рыб в анаэробных условиях более трех недель.*

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

HYPOTHERMIC STORAGE OF STURGEON FISH MILT IN ISOTONIC EXTENDERS

Isaev D.A., Martynova M.Yu., Shishanova E.I., Bubunets E.V., Starodvorskaya I.V.

*Abstract. This work presents experimental data on liquid milt storage in three different isotonic extenders for Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*), Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*) and beluga (*Huso huso*). The possibility to store sturgeon fish sperm under anaerobic conditions for more than three weeks was demonstrated.*

Key words: sturgeon fish, hypothermia, liquid sperm storage.

* isaev@hotmail.ru

Хранение спермы рыб без глубокого замораживания в жидком азоте является привлекательным подходом для решения таких задач как синхронизация созревания половых продуктов при проведении нерестовых кампаний и безопасная транспортировка спермы, в т. ч. авиационная. Проблема изменения качества спермы производителей в течение репродуктивного сезона [17] может быть преодолена также путем краткосрочного гипотермического хранения. Независимость от источника жидкого азота и криогенного оборудования позволяет применять этот подход как в рыбоводных хозяйствах, так и в полевых условиях.

Наиболее известным и практически применяемым способом гипотермического хранения спермы рыб является хранение на льду в емкостях, заполненных атмосферным воздухом или чистым кислородом [2, 5, 10, 13, 14]. Для хранения обычно используются пластиковые пакеты [10]. Одним из существенных недостатков этого подхода, является формирование конденсированной воды на стенках пакета, которая, соприкасаясь со спермой, формирует очаги преждевременной активации и последующей гибели. Кроме того, пакеты, заполненные газом, а также тара для них, заполненная льдом или хладагентом, занимают достаточно большой объем, что может затруднять транспортировку. Более компактный и технически удобный способ хранения спермы в одноразовых пластиковых шприцах большого объема [13] осложняется необходимостью регулярной замены кислорода и зависит от его источника.

Кислород считается одним из критических факторов при гипотермическом хранении спермы рыб [10]. Хранение в атмосфере чистого кислорода с регулярной его заменой способствует сохранению жизнеспособности спермы и продлению сроков ее хранения [10, 11, 13, 14]. Напротив, некоторые исследователи не обнаружили значительных различий между использованием чистого кислорода и атмосферного воздуха [9]. В отсутствие кислородсодержащей фазы происходит существенное снижение уровня АТФ уже в первые часы гипотермического хранения [8]. Хотя содержание АТФ положительно коррелировало со способностью к оплодотворению, содержание кислорода в газовой фазе при хранении не влияло на жизнеспособность спермы. Линхарт и соавт. считают, что недостаток субстратов для спермы, как и кислород, могут быть искусственно восполнены в условиях *in vitro* [22]. Возможно, для многих рыб диапазоны температур гипотермического хранения не обеспечивают необходимого снижения уровня катаболизма, поэтому для поддержания жизнеспособности спермы необходимо присутствие метаболических субстратов и кислорода. Таким образом, использование кислорода противоречит основной идее гипотермического хранения – поддержанию метаболически неактивного состояния.

Тем не менее, есть немало примеров гипотермического хранения спермы рыб в анаэробных условиях [18]. В работе Батчера, которая, по-видимому, является одной из первых научных публикацией о гипотермическом хранении спермы рыб, сперма ручьевой форели *Salmo fario* хранилась в течение 5 дней под парафиновым маслом [12]. Штосс считает, что для некоторых видов рыб анаэробное хранение может быть предпочтительным [27]. По мнению Ковальски и соавт., кислород не является необходимым для успешного хранения спермы карпа в течение, по меньшей мере, 9 суток [20]. Можно допустить, что поддержание метаболически неактивного, близкого к анабиотическому состояния при гипотермии может быть достигнуто сочетанием условий. Сперма рыб неактивна в гонадах и семенной плазме, поэтому одним из путей поддержания неактивного состояния спермы является имитация физико-химических свойств семенной плазмы, главным образом, катионного состава, рН и осмоляльности [23].

Исходя из вышеизложенного, а также опираясь на данные собственных исследований по гипотермическому хранению спермы стерляди [3], мы изучали возможность гипотермического хранения спермы трех видов осетровых рыб в анаэробных условиях в трех различных консервантах-разбавителях, препятствующих активации.

Материалы и методы

Образцы спермы 5 производителей русского осетра *Acipenser gueldenstaedtii*, 4 производителей сибирского осетра *Acipenser baeri* и 2 производителей белуги *Huso huso* получены во время проведения весенней нерестовой кампании в апреле 2013 года в рыбноводном хозяйстве Электрогорской ГРЭС, Московская область. Все производители выращены в искусственных условиях, возраст 10-15 лет. Гормональная стимуляция сперматогенеза проведена, как описано ранее [1].

Непосредственно после получения была проведена микроскопическая оценка концентрации и подвижности сперматозоидов. Для оценки концентрации сперматозоидов в разбавленных в 200 раз образцах использованы счетные камеры Нейбауэра. Для определения подвижности сперму активировали разведением в 50 раз водой, охлажденной до +9...+12 °С [7]. Непосредственно после активации оценивали относительное количество прогрессивно-подвижных сперматозоидов и продолжали наблюдение, отмечая время, в течение которого половина активированных сперматозоидов переходила от поступательного движения к колебательному, а также время полной потери подвижности.

Спермакрит определяли путем центрифугирования в 75 мм стеклянных капиллярах в течение 10 мин при 1000 G. рН семенной плазмы определяли при помощи портативного рН-метра «Piccolo» («Hanna Instruments»). Осмоляльность определяли на осмометре-криоскопе «ОСКР-1» («КИВИ-осмометрия»).

Образцы спермы от каждого из производителей были разделены на 3 пробы для хранения в трех различных консервирующих растворах: разбавителе Пака – Чапмена [23]; 0.1 М растворе глюкозы с добавлением 1 % бычьего сывороточного альбумина (БСА) (далее – EFM-100); 0.1 М растворе трегалозы с добавлением 1 % БСА (далее – IST-100). Осмоляльность всех трех растворов была одинаковой и составляла 105 ± 5 мосмоль/кг. Пробы нативной спермы разбавляли в 3 раза консервирующими растворами, в соответствии с методом [15, 23] для разбавителя Пака – Чапмена. Пробы были разбавлены консервантами непосредственно в пластиковых стерильных пробирках объемом 2 мл, так, чтобы остаточный объем воздуха был минимальным, плотно закрыты (завинчены) крышками и помещены в термос на ледяную баню. После доставки в лабораторию все пробы были помещены в холодильник с температурой, контролируемой в пределах +2...+4 °С.

Периодическое изъятие проб проводили в асептических условиях на холоде. Жизнеспособность оценивали по подвижности после активации. Для оценки целостности клеточных мембран проводили суправитальный тест с эозином: 10 мкл 1 % раствора эозина в фосфатно-солевом буфере Дульбекко смешивали с равным объемом пробы на предметном стекле, накрывали покровным стеклом и под микроскопом подсчитывали относительное количество окрашенных эозином клеток, считая таковые погибшими.

Результаты и обсуждение

Характеристики спермы производителей представлены в табл. 1. Для русского осетра микроскопическая оценка подвижности спермы не была выполнена непосредственно после получения. Тем не менее, последующая оценка подвижности в образцах нативной спермы, хранившихся на льду в течение 3 сут, а также в пробах, хранившихся в консервантах, позволяет утверждать, что исходное качество спермы производителей не ниже 4 баллов по шкале Персова (не менее 80 % подвижных) [6], кроме самца № 3, для которого подвижность спермы была не более 30 %.

Осмоляльность семенной плазмы русского осетра (144.4 ± 13.5 мосмоль/кг) выше таковой сибирского осетра (102.3 ± 1.9 мосмоль/кг) и белуги (100.5 ± 4.5 мосмоль/кг); различия значимы по *U*-критерию Манна – Уитни, $p \leq 0.05$. Сперматокрит у белуги несколько ниже, чем у русского осетра. Для прочих характеристик спермы, включая сперматокрит, pH, концентрацию и подвижность, межвидовые различия не значимы, либо не выявляются по *U*-критерию Манна – Уитни из-за малых выборок.

За исключением образцов с наиболее низкими характеристиками, вся сперма была использована в рыбоводных целях, частота оплодотворения при этом была не ниже 75 %, что соответствует рыбоводным нормативам.

Исходя из анализа состава семенной плазмы, в 2005 г. Пак и Чапмен предложили и успешно применили разбавитель-консервант на основе фосфатно-карбонатного буфера с $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ и 0.05 М сахарозы для гипотермического хранения спермы двух представителей осетровых – подвида атлантического осетра *Acipenser oxyrinchus desotoi* и тупорылого осетра *A. brevirostrum* [23]. Сперматозоиды этих видов сохраняли подвижность после 21-28 сут хранения, а фертильность, как минимум, в течение 18 сут. Аналогичные результаты были получены Дорси и соавт. при хранении в разбавителе Пака – Чапмена спермы дикого атлантического осетра *Acipenser oxyrinchus* [15]. В течение 21 сут хранения сперма сохраняла хорошую фертильность и подвижность до 47 %.

Динамика снижения способности к активации в результате хранения в растворах EFM-100 и IST-100 приведена на рис. 1. Несмотря на результаты исследований других авторов [15, 23], в нашей работе сохранность спермы всех трех видов осетровых в растворе Пака – Чапмена была наиболее низкой и не превышала 7-10 сут для отдельных образцов, что может быть следствием хранения в анаэробных условиях. Большинство сперматозоидов утрачивали жгутик; целостность мембран также была нарушена, о чем свидетельствует окрашивание эозином (рис. 2).

Таблица 1.

Характеристики спермы производителей трех видов осетровых рыб рыбоводного хозяйства Электрогорской ГРЭС

Самец №	Концентрация, млн/мл	рН	Сперматокрит, %	Осмоляльность, мосмоль/кг	Активация		
					%*	τ_{50} , мин	τ , мин
<i>Русский осетр Acipenser gueldenstaedtii</i>							
1	950	7.4	11	122	н/о	–	–
2	2000	8.5	12	148	н/о	–	–
3	1855	7.5	10	168	н/о	–	–
4	1206	7.6	13	133	н/о	–	–
5	655	8.2	13	151	н/о	–	–
<i>Сибирский осетр Acipenser baeri</i>							
1	2550	7.0	12	106	86	1	11
2	569	7.3	2	100	79	2.5	7
3	3675	7.8	18	102	76	3	14
4	600	7.6	2	101	96	2.5	12
<i>Белуга Huso huso</i>							
1	921	8.2	6	96	83	1.5	7
4	889	7.5	3	105	88	2	9

Примечания.

* % прогрессивно-подвижных сперматозоидов через 10-15 сек после активации;

τ_{50} – время, в течение которого более половины подвижных сперматозоидов переходят к колебательным движениям;

τ – время, в течение которого происходит полная потеря подвижности;

н/о – не определяли.

Бессолевым раствором глюкозы с добавлением БСА для гипотермического хранения спермы человека был предложен в конце 90-х г. г. XX в. учеными университета Йокогамы [19, 26]. Этим консервантом полностью заменяют семенную плазму, полагая, что присутствие электролитов снижает жизнеспособность спермы при хранении. Такой подход оказался наиболее результативным, по крайней мере, для человека и мыши, позволяя сохранять фертильность спермы в течение 2-4 недель, а в некоторых случаях и дольше [4, 24, 25].

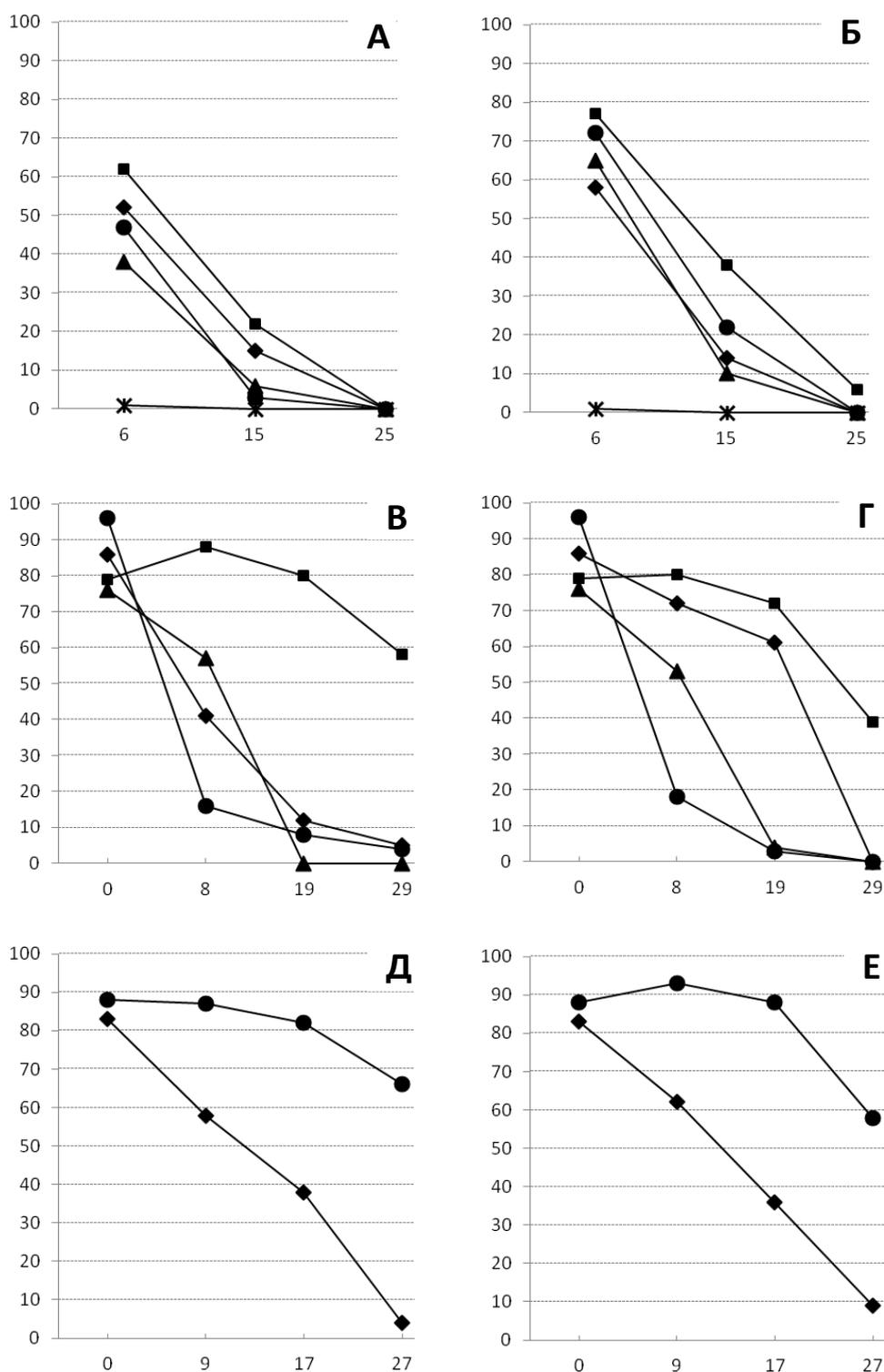


Рис. 1. Изменение подвижности спермы осетровых рыб в результате гипотермического хранения. А, Б – русский осетр *A. gueldenstaedtii*; В, Г – сибирский осетр *A. baeri*; Д, Е – белуга *Huso huso*. А, В, Д – хранение спермы в растворе EFM-100; Б, Г, Е – хранение спермы в растворе IST-100. По вертикальной оси – % прогрессивно-подвижных сперматозоидов после активации, по горизонтальной – время хранения в сутках. Маркеры линий на графиках соответствуют номерам производителей: ◆ – № 1; ■ – № 2; ▲ – № 3; ● – № 4; ✱ – № 5.

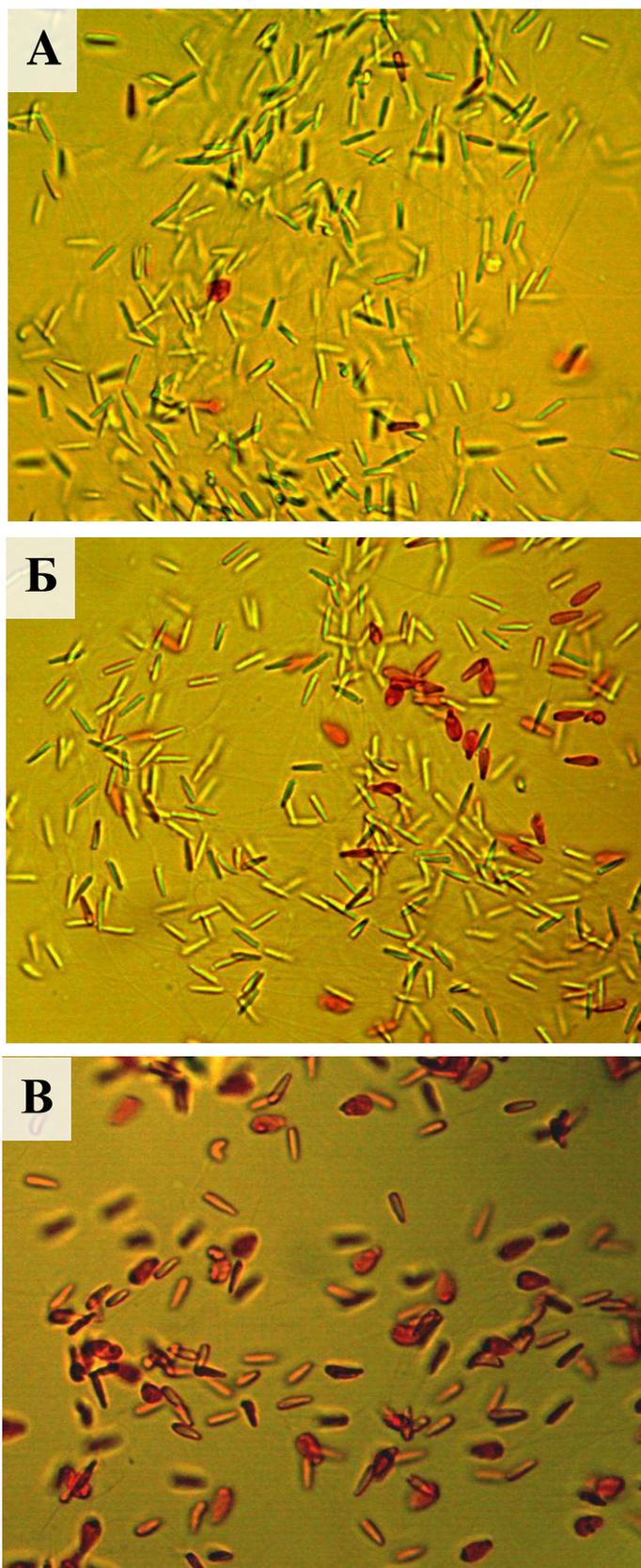


Рис. 2. Суправитальный тест с эозином для спермы русского осетра, хранившейся 15 суток в трех различных консервантах. А – EFM-100; Б – IST-100; В – разбавитель Пака – Чапмена.

В наших предварительных исследованиях использование бессолевого раствора Саито – Канно [19, 26] с полной или частичной заменой семенной плазмы не дало удовлетворительных результатов для спермы стерляди [3] и белуги (данные не опубликованы). Причиной снижения жизнеспособности в этих случаях могла быть высокая осмоляльность консерванта Саито – Канно (320 мосмоль/кг), приводящая к необратимой деактивации и гибели сперматозоидов. Осмоляльность семенной плазмы осетровых значительно ниже по сравнению с костистыми рыбами и для некоторых видов не превышает 100 мосмоль/кг [16; 21], что согласуется с нашими данными (табл. 1). Исходя из этого, мы использовали бессолевые растворы сахаридов со сниженной до 100 мосмоль/кг осмоляльностью. Трегалоза в составе одного из растворов, как и сахараза в растворе Пака – Чапмена была выбрана в качестве метаболически неактивного осмогенного неэлектролита.

Несмотря на использование в нашей работе бессолевых растворов сахаридов, такую консервацию нельзя считать «безэлектролитной», поскольку семенная плазма не была отделена, но лишь разбавлена в 3 раза. Таким образом, как и в солевом растворе Пака – Чапмена, поддержание спермы в неактивном состоянии обеспечивалось в основном за счет тоничности консерванта в сочетании с пониженной температурой. Тем не менее, низкая сохранность спермы в растворе Пака – Чапмена могла быть обусловлена присутствием электролитов, и не исключено, что полное отделение семенной плазмы могло бы способствовать лучшей сохранности спермы осетровых рыб в изотонических безэлектролитных растворах.

Примечательно, что наилучшая сохранность наблюдалась для спермы белуги и сибирского осетра, осмоляльность семенной плазмы которых (табл. 1) была ближе к осмоляльности консервантов. В то же время, для семенной плазмы русского осетра консерванты гипотоничны, что, возможно, явилось причиной более низкой сохранности спермы.

Таким образом, мы продемонстрировали возможность гипотермического хранения спермы осетровых рыб в анаэробных условиях в изотонических растворах. Решающими факторами, обеспечивающими сохранность спермы, являлись осмоляльность и пониженное содержание электролитических ионов. Полученные нами данные позволяют полагать, что, несмотря на универсальность подхода, разработка консервантов для гипотермического хранения спермы осетровых рыб должна учитывать видовые особенности их репродуктивной физиологии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бубунец Э.В., Лабенец А.В. Применение градуальных инъекций сурфагона в нетрадиционные сроки при воспроизводстве осетровых. *Аграрная наука* 2012; 2:26-28.
2. Детлаф Т.А., Гинзбург А.С., Шмальгаузен О. Развитие осетровых рыб. М.: Наука, 1981. 224 с.
3. Исаев Д.А., Мартынова М.Ю. Краткосрочное хранение спермы стерляди в анаэробных условиях. Состояние и перспективы развития пресноводной аквакультуры (2013, Москва, ВВЦ). Международная научно-практическая конференция, 5-6 февраля 2013 г.: доклады / ГНУ ВНИИР Россельхозакадемии. М.: Изд-во РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева, 2013; С. 189-195.
4. Исаев Д.А., Заева В.В., Бакурадзе Р.В. и др. Хранение спермы человека в течение 2 недель без замораживания. *Проблемы репродукции* 2009; 5:33-35.

5. Мязина Е.И., Насонова А.И. Осетрята из пробирки // Рыбное хозяйство 2005; 6:72.
6. Персов Г.М. Дозирование спермиев как способ управления оплодотворением яйцеклеток осетровых. Докл АН СССР 1953; 90:1183-1185.
7. Чипинов В.Г., Джаригазов Е.С., Болонина Н.В. Оценка качества спермы осетровых рыб различными методами и опыт ее низкотемпературной консервации. Вестник Астраханского государственного технического университета. Серия: Рыбное хозяйство 2010; 1:140-143.
8. Bencic D.C., Krisfalusi M., Cloud J.G., Ingermann R.L. ATP levels of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) sperm following in vitro exposure to various oxygen tensions. Fish Physiology and Biochemistry 1999; 20:389-397.
9. Bencic D.C., Krisfalusi M., Cloud J.G., Ingermann R.L. Short-term storage of salmonid sperm in air versus oxygen. North American Journal of Aquaculture 2000; 62:19-25.
10. Billard R. Short-term preservation of sperm under oxygen atmosphere in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Aquaculture 1981; 23:287-293.
11. Büyükhatoğlu S., Holtz W. Preservation of trout sperm in liquid or frozen state. Aquaculture 1978; 14:49-56.
12. Butcher A.D. Preliminary observation on the storage of the milt of trout. Australia J Sci 1944; 7:23-25.
13. Conte F., Doroshov S., Lutes P. Hatchery Manual for the White Sturgeon, *Acipenser transmontanus*, with Application to other North American Acipenseridae. Publication #3322. 1988; Coop. Extension, Div. Agric. Nat. Resources, Univ. California, Davis. 104 p.
14. DiLauro M.N., Krise W.F., Hendrix M.A., Baker S.E. Short term cold storage of Atlantic sturgeon sperm. Progr Fish-Cult 1994; 56:143-144.
15. Dorsey K.M., Guthrie H.D., Welch G.R. et al. Quality assessment of wild Atlantic sturgeon (*Acipenser oxyrinchus oxyrinchus*) semen under conditions of short-term storage. North American Journal of Aquaculture 2011; 73:418-425.
16. Hadi Alavi S.M., Cosson J., Karami M. et al. Chemical composition and osmolality of seminal fluid of *Acipenser persicus*; their physiological relationship with sperm motility. Aquaculture Research 2004; 35:1238-1243.
17. Hajirezaee S., Amiri B.M., Mirvaghefi A. Fish milt quality and major factors influencing the milt quality parameters: A review. African Journal of Biotechnology 2010; 9:9148-9154.
18. Jenkins J.A., Tiersch T.R. A preliminary bacteriological study of refrigerated channel catfish sperm. J World Aquac Soc 1997; 28:282-288.
19. Kanno H., Saito K., Ogawa T. et al. Viability and function of human sperm in electrolyte-free cold preservation. Fertil Steril 1998; 69:127-131.
20. Kowalski R.K., Cejko B.I., Sarosiek B. et al. Effect of oxygen atmosphere and antioxidants on the common carp (*Cyprinus carpio* L.) milt short term storage. Abstracts for 3rd International Workshop on the Biology of Fish Gametes, Budapest 2011; 47-48.
21. Li P., Rodina M., Hulak M. et al. Physico-biochemical parameters and protein profiles of sperm from beluga *Huso huso*. Journal of Applied Ichthyology 2010; 26:753-755.
22. Linhart O., Rodina M., Gela D. et al. Improvement of common carp artificial reproduction using enzyme for elimination of egg stickiness. Aquatic Living Resources 2003; 16:450-456.
23. Park C., Chapman F.A. An extender solution for the short-term storage of sturgeon semen. North American Journal of Aquaculture 2005; 67:52-57.

24. Riel J.M., Huang T.T., Ward M.A. Freezing-free preservation of human spermatozoa - a pilot study. *Arch Androl* 2007; 53:275-284.
25. Riel J.M., Yamauchi Y., Huang T.T. et al. Short-term storage of human spermatozoa in electrolyte-free medium without freezing maintains sperm chromatin integrity better than cryopreservation. *Biol Reprod* 2011; 85:536-547.
26. Saito K., Kinoshita Y., Kanno H. et al. A New method of the electrolyte-free long-term preservation of human sperm at 4 °C. *Fertil Steril* 1996; 65:1210-1213.
27. Stoss J. Fish gamete preservation and spermatozoan physiology. In: *Fish Physiology*. Academic Press, London, 1983; IX:305-340.