

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
И ПРОДОВОЛЬСТВИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

ГЛАВНОЕ УПРАВЛЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ, НАУКИ И КАДРОВ

Учреждение образования
«БЕЛОРУССКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ АКАДЕМИЯ»

Н. В. Барулин, К. Л. Шумский

**РЕГУЛИРОВАНИЕ КАЧЕСТВА
СПЕРМОПРОДУКЦИИ ОСЕТРОВЫХ
РЫБ В ТЕХНОЛОГИИ
ВОСПРОИЗВОДСТВА ОБЪЕКТОВ
АКВАКУЛЬТУРЫ**

Монография

Горки
БГСХА
2019

УДК 639.3

Барулин, Н. В. Регулирование качества спермопродукции осетровых рыб в технологии воспроизводства объектов аквакультуры / Н. В. Барулин, К. Л. Шумский. – Горки : БГСХА, 2019. – 175 с. : ил. – ISBN 978-985-467-942-6.

В монографии изложены научно-методологические подходы к регулированию качества спермопродукции осетровых рыб в технологии воспроизводства объектов аквакультуры.

Издание предназначено для специалистов в области ихтиологии и аквакультуры, аспирантов, магистрантов, студентов вузов, слушателей института повышения квалификации и переподготовки кадров.

Табл. 12. Ил. 60. Библиогр.: 280 назв.

Печатается по решению Научно-технического совета
УО «Белорусская государственная сельскохозяйственная академия».
Протокол № 2 от 01.02.2019 г.

Рецензенты:

доктор сельскохозяйственных наук, профессор И. С. Серяков;
доктор сельскохозяйственных наук, профессор Е. В. Таразевич

ISBN 978-985-467-942-6

© Барулин Н. В., Шумский К. Л., 2019

© УО «Белорусская государственная
сельскохозяйственная академия», 2019

ВВЕДЕНИЕ

Государственной программой развития аграрного бизнеса на 2016–2020 годы предусмотрено значительно увеличение объемов выращивания товарной рыбы, в том числе и за счет увеличения доли ценных видов рыб. Осетровые (*Chondrostei*, *Acipenseriformes*) населяют реки, устья и внутренние моря северного полушария. Однако почти все 27 видов осетров подвергаются опасности, и их естественная численность уменьшается из-за истощения рыбных запасов, включая изменения миграции и воспроизводства.

Критическое снижение численности осетровых рыб в естественных условиях приобрело общемировую проблему. Одним из способов решения этой проблемы является аквакультура – выращивание рыб и других гидробионтов в контролируемых человеком условиях, в том числе в рыбоводных индустриальных комплексах. Однако выращивание осетровых рыб в условиях аквакультуры сталкивается с трудностями искусственного воспроизводства практически на каждом этапе технологического процесса – от формирования маточного стада до получения жизнестойкой молоди. Кроме того, в настоящее время

но, что у большинства видов рыб сперматозоиды в семенной жидкости находятся в неподвижном состоянии, а активация сперматозоидов происходит после попадания в водную среду.

Оценка подвижности сперматозоидов получила широкое распространение в технологии искусственного воспроизводства, поскольку такой метод позволяет установить качество получаемых половых продуктов, выявить аномалии и предотвратить неэффективность оплодотворения. Современные методы компьютерной диагностики качества спермы позволяют проводить точные исследования на высоком методическом уровне.

В технологии искусственного воспроизводства осетровых рыб важным моментом является период хранения спермы, поскольку этого требуют различные технологические ситуации (задержка созревания самок, необходимость транспортировки и др.). Известным способом хранения спермы является ее криоконсервация. Однако криоконсервация может значительно снизить качество сперматозоидов. По этой причине перспективной является разработка методов увеличения периода краткосрочного хранения спермы осетровых рыб.

Краткосрочное хранение спермы включает в себя разбавление собранной спермы либо в соответствующей семенной жидкости, либо в специальных разбавителях (растворах, предназначенных для поддержания спермы в состоянии покоя) в сочетании с хранением спермы при пониженных температурах (2–4° С) на протяжении от нескольких дней до нескольких недель. Этот метод представляет собой важный инструмент для рыбоводческих хозяйств, например, в тех случаях, когда самцы из маточного стада реагируют на гормональную стимуляцию быстрее, чем самки. Использование разбавителя обеспечивает концентрацию ионов и осмотическое давление на изотоническом уровне, близком к уровню семенной плазмы, что предотвращает активацию сперматозоидов, защищает сперму от осмотического повреждения и загрязнений, таких как моча и поддерживает источник АТФ, необходимый для биения жгутиков, а также оплодотворяющей способности спермы. При низких температурах сперматозоиды имеют низкий метаболизм и могут сохраняться в течение нескольких дней в соответствующих разбавителях спермы. Тем не менее длительные условия хранения в холодном месте могут значительно повлиять на качество спермы, поскольку анаэробные условия и связанные с ними мощные микробные загрязнения могут снизить подвижность и жизнеспособность сперматозоидов. Чтобы решить эту проблему, рекомендуется добавлять различные вещества, такие как антибиотики, консерванты, антиоксиданты в разбавитель.

Сперматозоиды являются популярным биологическим объектом для оценки влияния факторов физической и химической природы на качество мужских половых продуктов, в том числе и рыб.

1. БИОЛОГИЯ СПЕРМЫ ОСЕТРОВЫХ РЫБ И ОЦЕНКА ЕЕ КАЧЕСТВА

1.1. Морфология сперматозоида

На данный момент хорошо изучена и описана структура и морфология сперматозоидов таких осетровых, как русский осетр [10, 197], севрюга [11], белый осетр [86], атлантический осетр [118], тупорылый осетр [119], озерный осетр [120], белый лопатонос [121], веслонос [279], сибирский осетр [198], китайский осетр [263], стерлядь [137] и персидский осетр [196].

Все эти исследования показывают, что сперматозоиды осетровых представляют собой примитивную «аквасперму» с акросомой. У сперматозоида выделяют головку, среднюю часть и жгутик с микротрубочной структурой «9 + 2».

1.1.1. Головка сперматозоида

Головка сперматозоида удлинённая у всех видов осетровых и содержит ядро, состоящее из электронно-плотного гомогенного хроматина, окруженного ядерной мембраной. Акросома и ее субакросомные области расположены на кончике головки. Неизвестно, почему сперматозоиды осетровых имеют акросому, в то время как яйцеклетки осетровых обладают несколькими микропиле [10, 180, 113, 215]. Акросома может играть физиологическую роль в проникновении спермы в яйцеклетку и активации ее при оплодотворении [215]. Размер акросомы различается среди видов осетровых и может быть связан с размером микропиле [112, 113]. Данные из литературы показывают увеличение количества и диаметра микропиле при увеличении длины и ширины акросомы. Размеры акросомы сходны у белого лопатоноса, севрюги, сибирского осетра, атлантического осетра и персидского осетра. Самый маленький и самый большой размер акросомы был обнаружен у китайского осетра и белого осетра соответственно. Акросомный пузырек, ограниченный акросомной мембраной, расположен в самой внешней части. Субакросомная область расположена между ядром и акросомным пузырьком. В переднем конце акросомы наблюдается зернистый материал, где актиновая нить акросомы тянется из его центра. В поперечных микрофотографиях участка головки сперматозоида наблюдаются 2–4 (обычно 3) внутриядерных канала (ENC –

endonuclear canals), которые пересекают ядро от акросомного конца до базальной области ядерной ямки. У всех видов осетровых акросома заканчивается несколькими заднелатеральными выступами (PLPs – posterolateral projections). У персидского осетра [196], стерляди [199, 137] и сибирского осетра [198] наблюдаются от 9 до 10 PLPs, а белый лопатонос, севрюга и русский осетр имеют 8 и 13 PLPs [117, 121, 197]. Размер PLPs также варьируется среди видов осетровых. Средняя длина PLPs составляет 324 нм у озерного осетра, 233 нм у атлантического осетра, 246 нм у тупорылого осетра, 760 нм у белого лопатоноса, 600 нм у сибирского осетра, 550 нм у стерляди и 650 нм у русского осетра [118, 119, 120, 121, 198, 199, 137, 197]. Согласно DiLauro [120], более длинная PLPs может быть эволюционной адаптацией, которая обеспечивает более надежную прикрепляемость к икринке в быстротекущей воде во время нереста и оплодотворения. По данным Psenicka [215] некоторое расширение PLPs может возникать после акросомной реакции при проникновении сперматозоида в яйцеклетку. На заднем конце ядра имплантационная ямка соединяет осевую часть ядра с центриолями, расположенными в области средней части [198].

1.1.2. Средняя часть сперматозоида

В сперматозоидах всех осетровых цилиндрическая средняя часть пронизана цитоплазматическим каналом, образованным инвагинацией плазматической мембраны. От 3 до 6 митохондрий сообщается у нескольких видов осетровых, которые обеспечивают АТФ, необходимый для биения жгутика [201]. Количество митохондрий может различаться среди видов, однако трудно точно определить их количество или измерить их площадь из-за внешних изменений в результате сегментации во время подготовки образцов. Атлантический осетр, белый лопатонос и сибирский осетр имеют самую короткую среднюю часть; в то время как она длиннее у севрюги и озерного осетра. Комплекс центриолей (проксимальная и дистальная центриоли) состоит из 9 периферических триплетов микротрубочек в форме цилиндра. Овальная проксимальная центриоль расположена сзади имплантационной ямки и связана с имплантационной ямкой структурой, напоминающей волокнистое тело, тогда как дистальная центриоль находится вблизи начала жгутика и функционирует как базальное тело жгутика. У некоторых видов, таких как сибирский осетр [198], овальные вакуоли или липидные капли наблюдаются в середине. Аксонома расположена сразу позади дистальной центриоли.

1.1.3. Жгутик сперматозоида

Подвижность сперматозоидов генерируется жгутиком, который состоит из аксономы, окруженной плазматической мембраной. Аксонома, высокоорганизованная структура на основе микротрубочек, сохраняющаяся в процессе эволюции, представляет типичную эукариотическую аксономальную организацию с одной центральной парой одиночных микротрубочек и девятью периферическими дублетами микротрубочек. Известно, что средний диаметр одной микротрубочки составляет 21,4 нм. Была измерена средняя ширина периферической пары и центрального дублета, которая составила соответственно 35,5 и 53,0 нм [198, 199]. Длина жгутика отличается среди осетровых рыб. Самый короткий жгутик наблюдается у китайского осетра, а у сперматозоида персидского осетра – самый длинный. Существует боковая структура из пары складок (плавников, ребер) вдоль жгутика [198, 199, 137, 196, 197]. Аналогичная структура была обнаружена и у костистых рыб, таких как щука [129] и атлантический белокорый палтус [233]. Наблюдаемые складки обычно плоские, без вращения и расположены параллельно плоскости двух центральных микротрубочек, аналогично палтусу [162]. Напротив, у щуки один боковой плавник [129], и у атлантического палтуса [233] не наблюдалось плоского бокового плавника. У осетра наблюдаемая структура складки начинается в 0,5–1 мкм от середины и заканчивается в 4–6 мкм от кончика жгутика [198, 199, 196, 197]. Возможная роль плавника может заключаться в усилении силы биения жгутика [199, 196, 197] или для увеличения поверхности плазматической мембраны, которая имеет большое значение для водообменной (осмотической) регуляции при активации сперматозоидов [162]. Скорость сперматозоидов у видов с ребристой структурой значительно выше, чем у видов, не имеющих структуры складки, у таких как карповые [129, 233].

1.2. Подвижность и энергетика сперматозоидов

1.2.1. Общая характеристика подвижности и активности сперматозоидов

Сперматозоиды осетровых, как и костистых рыб, являются неподвижными в семенной плазме или семенных канальцах [229, 56]. Как и у *Salmonidae* [64, 192], K^+ является основным ингибирующим фактором, препятствующим активации сперматозоидов в семенной плазме [229, 209].

Как и у пресноводных рыб, активация сперматозоидов у осетровых происходит после попадания в пресноводную среду или после снижения внеклеточного K^+ (K_e^+) [179, 56, 233, 223]. Начиная с момента начала подвижности сперматозоидов волны распространяются по всей длине жгутика. Позже в фазе подвижности волны ограничены областью, ближайшей к головке, до тех пор пока совсем не затухнут как и в дистальной части в конце периода подвижности сперматозоида [56, 222]. Во время поступательного движения сперматозоида иногда наблюдается вращение всей клетки. После активации сперматозоидов подвижность и скорость сперматозоидов, частота биения жгутиков и параметры жгутиковой волны (длина волны и амплитуда) уменьшаются, а число волн, а также кривизна возрастают [179, 128, 124, 203, 201, 63, 56, 237, 222, 223, 199]. Снижение подвижности и скорости сперматозоидов связано с истощением внутриклеточных АТФ-источников, необходимых для аксонемального биения [201, 95]. Незначительные отклонения в параметрах жгутиковой волны могут быть адресованы молекулярным функциям высокоорганизованной структуры аксономы на основе микротрубочек, но информации об этом очень мало. В литературе наблюдается высокая изменчивость данных о продолжительности подвижности и скорости сперматозоидов у разных видов осетровых. Продолжительность подвижности сперматозоидов после активации в пресной воде была зарегистрирована у белуги 5–13 мин или 13 мин [10, 59], 2–6 мин у веслоноса [189, 179, 56]; 5–30 мин у озёрного осетра [157, 271]; >5 мин у персидского осетра [84, 237, 136]; 4–5 мин у стерляди [245]; 5 мин у тупорылого осетра [56, 271] и 4–60 мин у севрюги [136; 10]. Физиологическая причина(ы) разбежки в продолжительности моторики сперматозоидов среди видов осетровых неизвестна. Cosson [95] предполагал наличие взаимосвязи между исходным содержанием АТФ (аденозинтрифосфат) и продолжительностью подвижности сперматозоидов. Тем не менее межвидовые от-

личия в активности динеина АТФазы, необходимого для аксонемного биения, можно рассматривать с упором на АТФ-содержание (активность) динеина АТФазы. Кроме того, достоверно известно, что продолжительность подвижности сперматозоидов осмотически зависима и может быть продлена после активации спермы в среде, содержащей ионы (такие как Ca^{2+}) [179, 56]. Скорость движения сперматозоидов также сильно различается среди видов осетровых. Этот параметр сильно зависит от морфологии сперматозоидов, в частности, от размера головки и жгутика, исходного содержания АТФ и параметров жгутиковой волны, таких как частота биений и амплитуда волны [222, 129]. Как правило, процент подвижных сперматозоидов не рассматривается как показатель различия между видами, поскольку есть возможность полной активации подвижности зрелых сперматозоидов. Этот механизм является гормонозависимым и регулируется по оси гипоталамус – гипофиз – гонада, что приводит к увеличению внутриклеточного рН и цАМФ (циклический аденозинмонофосфат) в сперматозоидах [257].

Механизмы, регулирующие начало активации сперматозоидов у осетровых, до сих пор не ясны. Ниже приводятся факторы, в том числе рН, температура, ионное содержание и осмоляльность [162, 261, 54, 53, 190], позволяющие предположить возможный схематический механизм активации сперматозоидов у осетра.

1.2.2. Влияние рН на продолжительность подвижности сперматозоидов

Согласно литературным данным рН активирующей среды является одним из основных факторов, влияющих на подвижность и скорость сперматозоидов рыб [244, 54], которые впоследствии влияют на способность сперматозоидов к оплодотворению [71, 124]. У осетровых рН 8,0–9,0 является оптимальным для подвижности сперматозоидов [229, 96, 80, 84, 237]. Первоначальная подвижность сперматозоидов снижается при рН 6,0, но не наблюдается различий между рН 7,0 и 9,0 [96, 84, 237]. Значительный эффект щелочного рН наблюдается при подвижности сперматозоидов, когда их оценивают в более поздний период фазы моторики. Например, подвижность сперматозоидов, оцененная через 1 мин после активации, показала наибольшее значение (>90 %) после активации при рН 8,0, тогда как она была менее 10 % при рН 6,0 и около 50–65 % при рН 7,0 и 9,0. Существует предположение, что ионы H^+ влияют на процесс активации в сочетании с K^+ , ин-

гибирующим эффект. Например, более высокая начальная подвижность сперматозоидов (>90 %) наблюдалась после активации в активирующей среде, содержащей 1 мМ KCl или KCOOH при pH 6,0–8,0, в то время как активация сперматозоидов полностью подавлялась при pH 9,0 в присутствии аналогичной концентрации K^+ [96]. У белого осетра сперма, предварительно инкубированная при pH 8,2 или выше, показала высокую подвижность после переноса в воду в качестве среды для плавания, но подвижность уменьшалась или предотвращалась, когда сперма была предварительно инкубирована при pH 7,5 или ниже. Эти результаты показывают, что высокая чувствительность подвижности сперматозоидов к pH может быть связана с низкой буферной способностью семенной плазмы. Кроме того, Ingermann с соавторами [80] отметили, что низкая буферная способность семенной плазмы позволяет эпителиальным клеткам репродуктивных путей активно контролировать подвижность сперматозоидов путем регулирования pH спермы с помощью бикарбонатной секреции. Информация о внутриклеточном pH у осетровых до или после активации отсутствует. Показано, что у некоторых видов пресноводных и морских костистых рыб уровень внутриклеточного pH сперматозоида возрастает сразу после активации [73, 248, 213, 141]. Такие наблюдения явно указывают на физиологическую роль pH в иницировании и поддержании активации сперматозоидов.

1.2.3. Влияние K^+ на продолжительность подвижности сперматозоидов

Сперматозоиды осетровых в присутствии ионов K^+ находятся в состоянии покоя [229, 128, 209, 84, 237, 223]. Уменьшение или удаление ионов K^+ из активирующей среды при соответствующей осмоляльности приводит к активации сперматозоидов [223]. Эффективные ингибирующие концентрации K^+ отличаются среди видов осетровых. Минимальная концентрация ионов K^+ ингибирует активацию сперматозоидов при 1 мМ у озерного осетра [209], 0,5 мМ у веслоноса [128], 0,4 мМ у белого лопатоноса [271], 0,75 мМ у тупорылого осетра [271], 1,2 мМ у обыкновенного лопатоноса [271], 2 мМ у персидского осетра [84, 237] и 0,35 мМ у стерляди [223]. Наблюдаемые различия в ингибирующих концентрациях K^+ могут быть связаны с содержанием K^+ и концентрациями катионов (Ca^{2+} и Na^+) в семенной плазме. Концентрация K^+ в семенной плазме колеблется от 1,1 до 1,3 мМ у стерляди и веслоноса [199, 161], 5,8–7,0 у озерного осетра [209] и 5,8–7,5 у пер-

сидского осетра [52, 51], которые представляют собой значения, превышающие ингибирующие концентрации. Кроме того, количество катионов, таких как Ca^{2+} и Na^{+} (антагонисты для ингибирующего действия K^{+}) выше в семенной плазме озерного осетра и персидского осетра по сравнению с семенной плазмой стерляди и веслоноса [52, 54, 53]. Эти данные свидетельствуют о том, что необходимо снижение концентрации K^{+} в активирующем растворе, препятствующего активации спермы, когда другие катионы (Ca^{2+} и Na^{+}) находятся в семенной плазме в более низкой концентрации.

Как отмечалось, у костистых рыб [60, 98, 65] ионы, такие как Na^{+} и Ca^{2+} противодействуют ингибирующему действию K^{+} . У лососевых Ca^{2+} в концентрациях 10, 1 и 0,001 мМ предотвращает ингибирующее действие K^{+} в концентрациях 40, 20 и 2 мМ соответственно [98]. У веслоноса соотношение $\text{Ca}^{2+}:\text{K}^{+}$ составляет 0,25 к 0,5–1, вызывая активацию сперматозоидов 20 и 100 % соответственно [128]. Меньшая концентрация Ca^{2+} требуется для противодействия ингибирующему эффекту K^{+} в сперме стерляди, и в этом случае отношение $\text{Ca}^{2+}:\text{K}^{+}$, равное 0,25, может полностью нейтрализовать ингибирующий эффект K^{+} [223]. Физиологический механизм антагонистического действия K^{+} и Ca^{2+} неизвестен.

Дальнейшие исследования с использованием интактной (не тронутой) или с удаленными мембранами и реактивированной спермы приведут к лучшему занижению оттока K^{+} и притоку Ca^{2+} , регулирующего сигнализацию спермы к активации. Недавно Alavi и др. [223] наблюдали уменьшение скорости сперматозоидов за счет увеличения концентрации K^{+} в активирующей среде ($>0,15$ мМ). Это говорит о том, что высокий уровень K^{+} (ниже ингибирующей концентрации) в сочетании с гипоосмоляльностью приводит к модуляции в скольжении микротрубочек, возможно, связанной с внутриклеточным pH. Linhart с соавторами [128] наблюдали ингибирование аксонемального биения сперматозоидов осетровых с удаленной мембраной при концентрации K^{+} в реактивирующей среде 5–15 мМ, что представляет собой значительно более высокую концентрацию K^{+} , чем пороговое значение, позволяющее интактным сперматозоидам быть подвижными (0,5 мМ). Это наблюдение, по-видимому, контрастирует с наблюдениями о сперматозоидах с удаленной мембраной лососевых [98], карпа [97] или морского ежа [145], в которых раствор реактивации может содержать значительно более высокие значения концентрации K^{+} . Эти наблюдения показывают, что мишень K^{+} в осетровой сперме может быть расположена в аксонеме.

1.2.4. Влияние Ca^{2+} на продолжительность подвижности сперматозоидов

Когда активация спермы осетровых происходит в среде активации, содержащей ионы Ca^{2+} , наблюдается более длительный период подвижности и более высокая скорость сперматозоидов [222, 223]. Однако роль ионов Ca^{2+} в инициировании активации спермы осетровых не совсем ясна. У большинства пресноводных костистых рыб внеклеточный Ca^{2+} (Ca_e^{2+}) выполняет важные физиологические функции при активации сперматозоидов [261, 190]. Несколько исследований показали, что хелатор ионов Ca^{2+} (этиленгликольтетрауксусная кислота, EGTA) и блокаторы кальциевых каналов (например, верапамил и нифедипин) могут частично или полностью предотвращать активацию сперматозоидов у некоторых видов [74, 188, 194]. Для большинства пресноводных или морских костистых рыб необходим гипо- или гиперосмотический сигнал для Ca^{2+} -зависимой и не зависящей от цАМФ активации спермы. Среди пресноводных костистых рыб сперма лососевых проявляет различные реакции на Ca^{2+} . В этой группе уменьшение K_e^+ запускает каскад сигнализации сперматозоидов, который вызывает активацию сперматозоидов посредством Ca^{2+} - и цАМФ-зависимых этапов сигнализации [166, 194]. В отличие от костистых рыб, подвижность сперматозоидов у осетров не полностью подавляется после активации в EGTA или нифедипине, блокаторах кальциевых каналов [223, 123]. Но результаты показали снижение скорости сперматозоидов после активации в EGTA или нифедипине [223]. Кроме того, активация сперматозоидов осетровых значительно снижается в присутствии $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{ClN}_2\text{O}_2\text{S}$, являющегося ингибитором Ca^{2+} /кальмодулина, активирующего фосфодиэстеразу [223]. Эти наблюдения свидетельствуют о сходстве спермы осетровых рыб с пресноводными или морскими костистыми рыбами, в которых гипоосмоляльность является первым сигналом для инициирования активации сперматозоидов, опосредованной Ca^{2+} -зависимой сигнализацией [184, 246, 190]. Предварительные наблюдения также свидетельствуют о том, что цАМФ-зависимый каскад участвует в передаче сигналов спермы осетровых, поскольку было показано, что цАМФ был необходим для реактивации аксонемального биения в сперматозоидах веслоноса с удаленной мембраной [128].

Ca^{2+} не только важен для каскада сигнализации спермы, но также играет роль в модуляции аксонемальных биений [160]. Подобно большинству костистых рыб [184, 246], сперматозоиды осетровых прояв-

ляют симметричные формы волны после активации в активирующей среде, свободной от ионов Ca^{2+} (или с малым их содержанием) [222, 223]. Однако, когда сперма активируется в среде, содержащей концентрацию ионов Ca^{2+} выше 1 мМ при pH выше 9,5 или в присутствии $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{ClN}_2\text{O}_2\text{S}$, симметричные формы жгутиков становятся асимметричными. В этом случае диаметр траектории головки спермы также уменьшается [223]. В эукариотической жгутиковой структуре внешняя и внутренняя активность динеиновых ручек контролирует форму волны жгутика и скорость сперматозоидов соответственно [160, 45]. Поэтому наблюдаемые эффекты на аксонемальной форме волны и скорости сперматозоида указывают на то, что концентрация ионов Ca^{2+} действует как на внешнюю, так и на внутреннюю динеиновую руку. Дальнейшие исследования должны касаться измерений внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} , а также изучения особенностей выделения, локализации и характеристики кальций-связывающих белков, присутствующих в аксонемальной структуре [159, 160].

1.2.5. Влияние осмоляльности на продолжительность подвижности сперматозоидов

Сперма осетровых может быть активирована в гипо-, изо- или гиперосмотической активирующей среде, связанной с семенной жидкостью [179, 84, 237, 223, 123]. Эти наблюдения показывают, что механизм активации спермы у осетровых разнообразен. Почти все исследования по сперме осетровых показали, что предотвращение активации сперматозоидов в среде с осмоляльностью примерно в 2 раза больше, чем у семенной плазмы [179, 237, 223]. Поэтому осмоляльность семенной плазмы не рассматривается как биологический фактор для контроля активации сперматозоидов после выделения спермы из семенников в семенные каналы. Следует отметить, что осмоляльность семенной плазмы осетровых значительно ниже, чем у костистых рыб (менее 100 мОсмоль/кг против ≈ 300 мОсмоль/кг), вероятно, из-за различий в морфологии гонад [139, 232]. У осетровых гонады прикреплены к вентральной поверхности почек комплексом узких и длинных нефридиальных канальцев (mesogonadium – мезонефрический канал) [278]. Поэтому сперма смешивается с мочой, прежде чем она высвобождается из полового сосочка, что приводит к уменьшению осмоляльности семенной плазмы. Тем не менее моча не вызывает активацию спермы, вероятно, из-за концентрации в ней ионов K^+ [223]. Хотя

осмоляльность семенной плазмы не препятствует активации сперматозоидов, подвижность сперматозоидов изменяется с чередованием осмоляльности активирующей среды. Подвижность осетровой спермы активируется в растворах с осмоляльностью выше, чем у семенной плазмы. Исследования показали, что подвижность сперматозоидов проявляется в пределах осмоляльности (в мОсмоль/кг) от 0 до 100 у сибирского осетра [229], 0–120 у веслоноса и обыкновенного лопатоноса [179], 0–250 у озерного осетра, белого лопатоноса и тупорылого осетра [271], 0–180 у персидского осетра [237] и 0–175 у стерляди [223]. Оптимальная осмоляльность для активации сперматозоидов (высокая подвижность и скорость сперматозоидов и более длительная продолжительность) составляет от 30 до 70 мОсмоль/кг у большинства видов осетровых [229, 179, 209, 271, 237, 223].

При чрезвычайно низкой осмоляльности (сперматозоиды, активированные в дистиллированной воде) на жгутиках появляется пузырь(и), нерегулярная выпуклость в плазматической мембране сперматозоидов, что предотвращает правильное и полностью эффективное распространение волн [56, 128]. В более поздние периоды подвижности кончик жгутика закручивается в петлеобразную форму, сокращая ее длину и влияя на сперму. Такие повреждения, вероятно, являются основной причиной быстрого снижения подвижности и скорости сперматозоидов после активации сперматозоидов в условиях очень низкой осмоляльности [56], но, тем не менее, повреждения не полностью предотвращают подвижность и, кроме того, можно частично отменить это путем переноса таких сперматозоидов на менее радикальную осмоляльность и условия восстановления. Другая возможная причина – метаболизм и энергетический путь, который необходимо исследовать в дальнейших исследованиях; что означает сравнение содержания АТФ в клетках спермы после активации при различных осмоляльностях.

1.2.6. Модель для регулирования активации и подвижности сперматозоидов осетровых

Гипоосмотический сигнал или уменьшение ионов K_e^+ при соответствующей внешней осмоляльности запускает каскад сигнализации спермы, открывая калиевые каналы, которые вызывают отток K^+ [223]. Это, вероятно, приводит к быстрой гиперполяризации мембран, что, в свою очередь, стимулирует приток Ca^{2+} после деполяризации мембра-

ны. Увеличение Ca_i^{2+} через кальцевый канал индуцирует активацию сперматозоидов через фосфодиэстеразу, активированную комплексом Ca^{2+} /кальмодулин. Однако увеличение Ca_i^{2+} превращает симметричную прямоугольную форму волны в асимметричную. Увеличение силы ионов Ca_i^{2+} зависит от поступления из запасов Ca_e^{2+} , поскольку асимметричная картина биения не наблюдалась в присутствии EGTA или нифедипина.

1.3. Целостность мембраны сперматозоидов

На субклеточном уровне качество спермы можно оценить по целостности плазмиды мембраны сперматозоидов. Плазменная мембрана контролирует ионные и водные обмены между внутри- и внеклеточной средой, которые вызывают изгибы аксонемы механизмами, недавно рассмотренными Cosson с соавторами [184] и Inaba [160]. С практической точки зрения, целостность мембраны изучалась путем оценки дифференциальной проникающей способности красителей, таких как эозин/нигрозин или эозин, и простого наблюдения под микроскопом в случае млекопитающих [272] и рыб [48]. Совсем недавно качество спермы оценивали с помощью флуоресцентных маркеров ДНК, таких как Hoechst 33258, иодид пропидия (PI) или лучше, с использованием наборов, содержащих специфические маркеры (Sybr-14/PI), позволяющих одновременное наблюдение как живых, так и мертвых сперматозоидов. Процент жизнеспособности оценивали путем прямого подсчета или анализа изображений под микроскопом [125, 251], с помощью точной цитометрии [140, 134], а в последнее время с помощью автоматического счетчика (Nucleocounter SP-100, Chemometec, Дания), который регистрирует с помощью CCD камеры последовательные снимки сперматозоидов, подвергнутых PI, и обеспечивает точное определение жизнеспособности и концентрации сперматозоидов на основе анализа изображения около 1 500 сперматозоидов в течение 1 мин с отличной повторяемостью [208]. Этот счетчик портативен и очень удобен для полевых операций. Однако это слишком дорого для исследований только концентрации сперматозоидов. Система более эффективна, если использовать ее как для оценки концентрации, так и для оценки жизнеспособности сперматозоидов на основе проникновения флуоресцентного ДНК-маркера, и в будущем применять к оценке эффективности митохондрий через красители, такие как Rhodamine 123 [140] или JC1 (5,5', 6,6'-тетрахлор-1,1', 3,3'-тетраэтилбензимидазолилкарбоцианионид) [127].

Среди причин бесплодия основной является нанесение повреждений ДНК сперматозоидов, особенно в отношении условий криоконсервации. Авторы различных недавних обзоров в основном согласны с тем, что анализ ДНК с помощью щелочного одноцепочечного гелеэлектрофореза, известного как «Comet assay», является надежным, чувствительным и дешевым методом для обнаружения разрывов нитей ДНК. Для выявления пятен можно использовать различные маркеры ДНК, такие как DAPI [132] или бромид этидия [133]. Известно только об оценке вредного эффекта криоконсервации для спермы рыб. Этот метод также выявляет вариации процента поврежденных сперматозоидов в последовательных эякулятах одного и того же самца у форели и различия между самцами, у которых одновременно была получена сперма. Другие методы исследований целостности ДНК, такие как «TUNEL» и «SCSA» были рассмотрены [79], но до сих пор не были широко использованы в исследованиях спермы рыб. Причины возникновения значительного процента поврежденных сперматозоидов у контрольных мужских особей (от 10 до 38 % в зависимости от исследований и видов) и последствий для фертильности было бы целесообразно изучить.

Целостность мембран также может быть оценена косвенно микроскопическим наблюдением при большом увеличении морфологии сперматозоидов либо на сперме, диспергированной в неподвижной среде для предотвращения движения во время наблюдения, либо при использовании стробоскопического освещения для подвижной спермы. Такая динамическая морфометрия в сочетании с анализом изображений приносит ценную информацию о целостности связки голова-хвост или о наличии пузырьков вдоль жгутика или даже петли, появляющейся на кончике жгутиков [195], а позднее – о признаках того, что осмотическая травма была наложена на сперматозоиды.

1.4. Энергетическое содержание спермы рыб

Подвижность сперматозоидов поддерживается гидролизом АТФ, катализируемым АТФ-фосфогидролазой, который стимулирует скопление соседних дублетов микротрубочек в жгутике, что приводит к образованию жгутикового биения [147]. Впервые гидролиз у форели описали Christen с соавторами [87]. Гидролиз АТФ также регистрировался во время фазы движения у некоторых других видов рыб, таких

как карп (*Cyprinus carpio*), тюрбо (*Psetta maxima*), [219, 206], хрящевые (осетр) [201] и морской окунь [1].

Содержание АТФ спермы рыб оценивали с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (англ. HPLC, High performance liquid chromatography) [207] или билюминесценцией [219] и с помощью ядерного магнитного резонанса (англ. NMR, Nuclear magnetic resonance) [206]. Техника люминесценции, использующая в настоящее время микропланшетные люминометры, является простой и быстрой, поскольку ее можно обработать с помощью надежных коммерческих наборов для анализа, и результаты могут быть получены в течение 2–3 ч. Недавно этот метод использовался для изучения катаболизма внутриклеточного АТФ во время подвижности спермы евразийского окуня (*Perca fluviatilis*) и в гипоосмотических условиях [122]. Однако необходимо было бы определить и использовать общую стандартную единицу, чтобы облегчить сравнение результатов между различными исследованиями.

Преимущество оценки АТФ с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) заключается в совместной оценке содержимого АДФ (аденозиндифосфат) и АМФ (аденозинмонофосфат), которые определяют вместе заряд энергии аденилат или АЕС (Adenylate Energy Charge). АЕС соответствует соотношению богатых энергией нуклеотидов, разделенных адениловым пулом (сумма концентраций АТФ, АДФ и АМФ), и может рассматриваться как внутриклеточное содержание доступной энергии, выраженное в процентах согласно Atkinson [58]:
$$AEC = ((ATP + (ADP / 2) / (AMP + ADP + ATP)) \cdot 1 / 2 \cdot 100.$$
 При значениях АЕС от 95 % до 80 %, клетки представляют оптимальные условия с высоким уровнем доступной энергии. Когда значения АЕС находятся в диапазоне от 50 % до 70 %, это соответствует промежуточным условиям, функции клеток могут быть снижены, но уровень энергии еще может быть увеличен. Если АЕС меньше 50 %, клетка испытывает глубокие ограничивающие условия с очень низким уровнем доступной энергии.

Использование ³¹P-NMR (ядерный магнитный резонанс) позволяет оценивать энергетические соединения, отличные от соединений аденилового пула, которые участвуют в энергетике для подвижности. Такое соединение, как креатин-фосфат, добавленный к АДФ, используется в качестве источника энергии в форелевой мембране, лишенной сперматозоидов [258, 206].

Несмотря на это, как АТФ, так и АЕС влияют на качество спермы. Содержание АТФ в сперме дорада (*Sparus aurata*) значительно снизилось после криоконсервации [134]. Снижение также отмечалось для тюрбо, но оно, по-видимому, менее вредно, поскольку сперматозоиды этого вида способны синтезировать часть своей энергии во время движения сперматозоидов [109]. По сравнению со значениями, наблюдавшимися в начале периода нереста, более низкое содержание АТФ и более низкий АЕС были отмечены в сперме сибаса (*Dicentrarchus labrax*) в конце репродуктивного периода в результате явления старения спермы. Изучение спермы хека показало, что после 48 ч хранения при 4 °С средний уровень АЕС составлял 0,71 с большой индивидуальной изменчивостью АЕС и подвижностью [231].

Некоторые исключения описаны для уклеи семейства карповых (*Alburnus alburnus*), но нет информации о связи между АТФ и подвижностью сперматозоидов [204]. Однако, как правило, качество спермы и значения АТФ или АЕС сильно коррелированы, поэтому эти параметры, описывающие энергию, могут использоваться в качестве маркеров качества спермы.

1.5. Концентрация спермы

Следует отметить, что, хотя и плохо документированный, генетический отбор может изменить качество спермы и рождаемость и может стать актуальной проблемой. Zohar [280] установил, что выбор коммерческих пород лосося привел к сокращению в 20 раз объема сперматозоидов у самцов, и Agnès с соавторами [49] отметили уменьшение плодовитости при четвертом поколении одомашнивания у *Heterobranchus longifilis*. В последнее время кажется, что на лососевых рыбоводных заводах все больше используется GnRHa (гонадотропин – рилизинг – гормон), чтобы предотвратить снижение производства спермы в отдельных маточных стадах.

Концентрация сперматозоидов в сперме легко оценивается различными методами, такими как подсчет под микроскопом, спектрофотометрия, проточная цитометрия и определение значений сперматокрита [139]. Однако предлагаемые различные методы представляют некоторые неудобства. Подсчет (основной метод) позволяет оценить число сперматозоидов с приемлемой изменчивостью из-за ошибок разведения и подсчета, которая составляет до 6 % для 300 сперматозоидов на наблюдение, когда подсчет 1:500 разведенной спермы повторяется

3 раза [247]. Это самый дешевый способ оценки концентрации сперматозоидов, но основная проблема этого метода заключается в том, что он занимает много времени, и этот способ несовместим с дальнейшим использованием сперматозоидов, например, в кондиционировании для сохранения или разделения на аликвоты для множественного скрещивания в генетических исследованиях.

Требование быстрой оценки концентрации сперматозоидов может быть выполнено различными методами, такими как фотометрия, цитометрия, включая счетчик Коултера и центрифугирование.

Фотометрическая оценка была представлена для разных видов с использованием разных длин волн видимых огней, для которых кажущееся поглощение света в основном связано с мутностью среды [67, 247, 89]. Сканирование поглощения сперматозоидов спермы по световому спектру показало постоянное увеличение от 500 до 300 нм, тогда более сильное увеличение произошло с пиком при 260 нм, и, наконец, поглощение возрастало до максимума при 210 нм. Наилучшие корреляции между количеством сперматозоидов и оптическими плотностями спермы наблюдались на 260 нм [82]. С этого первого результата сперма различных видов была отсканирована и показала очень похожие спектры, а регрессии между оптической плотностью и концентрацией спермы были специфическими. С практической точки зрения, для рыбной спермы правильное разведение для анализа составляет от 1:250 до 1:500 (сперма:дистиллированная вода) у всех изученных видов рыб. Так как нуклеиновые кислоты поглощают излучение в основном при 260 нм, оптическая плотность спермы, наблюдаемая на этой длине волны, вероятно, показывает, главным образом, содержание ДНК в среде, почти исключительно происходящее из сперматозоидов. Различия в полях поглощения, наблюдаемые между видами, могут быть обусловлены специфическим геномным содержимым ДНК, которое адаптировано к различным видам.

Хотя спермакриот использовался для оценки концентрации спермы [139], этот метод нелегко применять к морской рыбе. Поскольку сперматозоиды эффективно не осаждаются даже при длительных центрифугированиях при высоких скоростях вращения, спермакриот остается очень высоким (от 80 до 100 %) или неустойчивым. Сперматозоиды и семенная жидкость могут иметь аналогичную плотность, предотвращающую отделение путем центрифугирования. Кроме того, центрифугирование, применяемое в отношении спермы для получения

электронной микроскопии, часто приводит к сильному повреждению морфологии сперматозоидов, следовательно, к изменению объема клеток и, следовательно, к соотношению между семенной жидкостью и объемом уплотненных клеток. Например, сперма тюрбо (*Psetta maxima*) должна быть центрифугирована со скоростью ниже 1 000 об/мин, чтобы избежать повреждения клеток.

Совсем недавно проточные цитометры или счетчики Коултера были использованы для точной оценки концентраций спермы в образцах молок, но эти типы устройств являются дорогостоящими и недоступными в лабораториях среднего размера. Их эксплуатационные расходы являются высокими и, следовательно, полезны только в крупных учреждениях, где ежедневно приходится обрабатывать много образцов разных типов частиц. Однако эти дорогостоящие методы могут обеспечивать дополнительные показания, такие как объем клеток (счетчик Коултера) или физиологическое состояние спермы (проточный цитометр, такой как Nucleocounter SP-100).

Наконец, недавние успехи в распознавании изображений цифровой камеры и наличие полного набора простых программных пакетов для анализа изображений позволяют быстро рассчитывать сперму, предоставляя возможности для компромиссов между эффективностью, временем и затратами. Например, при исследовании спермы тунца, аликвоты спермы при правильном разбавлении в дистиллированной воде оставляли на 5 мин на гемоцитометре, после чего их фотографировали после адекватной фокусировки микроскопа. Фотографии сразу же записывались на простом ноутбуке и анализировались с помощью бесплатного программного обеспечения ImageJ после бинаризации: количество подсчитанных сперматозоидов полностью коррелировалось с контрольным подсчетом, полученным двумя независимыми наблюдателями с использованием подсчета микроскопии [214].

В качестве вывода для этого параметра, концентрация сперматозоидов может быть точно и быстро оценена с помощью сложных и дорогостоящих инструментов, которые могут обеспечить другие характеристики сперматозоидов в отношении жизнеспособности, но новые дешевые приложения, такие как небольшие мобильные одиночные длины волн (даже УФ) или анализ изображения могут быть успешно использованы с приемлемой временной задержкой для дальнейшего использования спермы.

1.6. Подвижность сперматозоидов

1.6.1. Субъективная оценка подвижности сперматозоидов

Технологии оценки подвижности сперматозоидов регулярно и исчерпывающе рассматривались последние 5 лет [217, 184, 246, 79, 72]. Простое наблюдение спермы под микроскопом при 10–25-кратном увеличении с использованием предметного стекла с покровным стеклом или без него до сих пор широко использовалось для того, чтобы квалифицировать свойства сперматозоидов до их использования в испытаниях на оплодотворение. Этот тип наблюдения обеспечивает грубую оценку качества спермы по критерию подвижности, поскольку он позволяет оценивать классы только в процентах от подвижной спермы и продолжительности моторики, определяемой периодом времени, ведущим к прекращению любого прогрессивного движения.

Несмотря на то, что этот метод является неточным и субъективным, он выявил трудности объективного анализа подвижности сперматозоидов и позволил определить основы дальнейшего индивидуального анализа. Надежная оценка подвижности на самом деле требует двухэтапного разбавления с предварительным разбавлением в неактивирующей среде и высокой конечной степени разбавления ($>1:1000$) в активирующей среде, адаптированной как к конечной концентрации спермы, так и к эффективности подвижности в порядке, чтобы избежать гетерогенного запуска моторики [65]. Использование несоответствующих условий активации в прошлом могло привести к ошибочным данным. Однако, если этот тип оценки обеспечивает общие характеристики подвижности сперматозоидов рыб путем группового наблюдения, он не позволяет объективно количественно оценивать движения и препятствует установлению корреляций между подвижностью сперматозоидов и плодовитостью, а также корреляций между факторами, определяющими качество спермы и подвижность сперматозоидов.

1.6.2. Описание процесса подвижности сперматозоидов

Подвижность сперматозоидов рыб объективно описана различными способами в соответствии с целью исследований. Использование фазово-контрастной микроскопии или темнопольной микроскопии значительно улучшило возможность наблюдения как головы, так и

жгутика сперматозоидов. Применение различных типов высокоскоростной видеозаписи или применения стробоскопических источников света обеспечивало высококачественные статические изображения одного жгутика в разных последовательных положениях. Это также позволило описать частоту биения жгутика, форму, амплитуду и число жгутиковых волн, и их изменение и распространение, ответственное за продвижение сперматозоидов. Такие методы очень точно описывают инициирование и будущие изменения жгутиковых ударов. Показывают также, что волны начинаются на стыке между головкой и жгутиком и продвигаются к кончику жгутика. Снижение эффективности подвижности, наблюдаемое для рыбных сперматозоидов во время их периода моторики, в основном связано с затуханием к дистальной части жгутика, что, как оказалось, является общей характеристикой для изученных до сих пор видов рыб [184, 246, 95].

1.7. Количественная оценка подвижности сперматозоидов

Несмотря на то, что еще до недавнего времени оценка скорости осуществлялась визуально [143, 142], в нескольких работах за последнее десятилетие сообщалось об использовании различных систем компьютерного анализа спермы (CASA) для оценки подвижности сперматозоидов рыб. Программное обеспечение CASA объединяет последовательные положения головок движущихся сперматозоидов в последовательных кадрах видеозаписей для расчета траекторий и их характеристик. CASA описывает различные параметры плавания спермы, связанные со скоростью, например криволинейная скорость (Curvilinear Velocity (VCL)) или мгновенная (фактическая) скорость (перемещаясь от кадра к кадру) вдоль реального пути (траектории), средняя скорость пути (Average Path Velocity (VAP)) или скорость вдоль сглаженного пути, прямолинейная скорость (Straight Line Velocity (VSL)) или поступательная скорость по прямой от начала до конца пути в течение соответствующего периода времени и другие параметры, связанные с колебанием головки сперматозоидов, такие как среднее угловое смещение (Mean Angular Displacement (MAD)), амплитуда латерального смещения головки сперматозоидов (Lateral Head Displacement (ALH)) и частота перекрестного смещения (Beat Cross Frequency (BCF)) и линейность. Наконец, соотношение между средним путем и траекторией прямой линии используется для описания прямолинейности траекторий [187].

Следует обратить внимание на то, что данные, полученные с помощью CASA, частично рассчитываются из других данных, также полученных посредством CASA. Например, колебание – это отношение между VCL и VAP.

Выбор параметра скорости, описывающего подвижность, также зависит от используемой видеокамеры. Согласно данным Wilson-Leedy и Ingemann [275], низкоскоростная запись скроет небольшие отклонения дорожек в течение больших интервалов времени (например, на 1/25 с), так что VCL и VAP будут очень похожи. В этом случае VAP будет более стабильным индексом скорости. CASA объективно оценивает параметры плавания гораздо большего количества сперматозоидов, чем может делать наблюдатель, и обеспечивает индивидуальные характеристики, а также общие особенности пробы спермы. Таким образом, CASA, проводя большую выборку, обеспечивает лучшую оценку качества спермы. Кроме того, CASA, по-видимому, особенно хорошо приспособлен для сперматозоидов рыб, подвижность которых длится очень короткий промежуток времени и очень быстро меняется; хотя сперматозоиды рыб начинают плавать с высокой скоростью, быстрота анализа CASA позволяет изучать форму снижения моторики с точки зрения как процента подвижных клеток, так и качества движения (скорость, прямолинейность и т. д.). И наоборот, рассматривая ограниченный период времени в фазе их подвижности, поведение сперматозоидов рыб намного менее гетерогенно, чем сперматозоидов млекопитающих [95].

Однако большие наборы данных, генерируемые CASA, обычно сводятся к средним значениям различных параметров, которые были достаточны для выявления существенных различий в экспериментальных протоколах [217, 239], хотя эти средние значения скрывают большую индивидуальную изменчивость подвижности, как показала, например, для спермы тунца. Недавний подход по анализу основных компонентов, за которым следует кластеризация подвижности сперматозоидов по типам, показал, что изменчивость моторики объясняется главным образом скоростью (55 % от общей дисперсии) и блужданием (беспорядочным движением) (25 % от общей дисперсии) и выделяет 4 основных типа сперматозоидов, доля которых варьируется в зависимости от различных факторов, таких как репродуктивные качества самца, активирующая среда, время после активации [205]. Такой подход представляется очень интересным, поскольку он может предлагать более дискриминирующую оценку влияния фактора качества, фокуси-

руя исследование на более реакционноспособные группы сперматозоидов. В настоящее время десятки систем CASA являются коммерчески доступными, но они имеют некоторые недостатки. Они довольно дороги, обычно созданы и адаптированы для анализа спермы млекопитающих с длинным периодом подвижности. Однако эти системы могут использоваться и для спермы рыб, если смогут генерировать параметры движения в течение очень короткого периода времени, чтобы можно было провести исследование быстрого снижения моторики гамет рыб. Они более или менее просты в использовании, и довольно сложно узнать, как программное обеспечение производит генерирование данных, так что результаты, получаемые из «черного ящика», могут быть связаны с типом используемого анализатора и их с трудом можно сравнить с результатами, полученными из других программ.

Система CASA, недавно разработанная Wilson-Leedy и Ingermann [275] в среде программного обеспечения ImageJ, находящегося в свободном доступе на интернет-сайте Национального института здоровья (National Institutes of Health (NIH)), была протестирована у разных видов, а недавно у рыбок данио-рерио [276].

Можно было оценить подвижность и скорость спермы морского окуня, а также тунца с помощью микроскопа (Axiolab, Zeiss) с плоским объективом, оснащенный CCD камерой (Sony SSC-DC50AP), записывающей 25 видеок кадров/с, связанным с простым ноутбуком (Samsung NC10), где эпизоды были записаны как видеофайлы в формате AVI. Программное обеспечение ImageJ, написанное на языке JAVA, может быть улучшено с помощью новых плагинов, созданных пользователями или в соответствии с конкретными их требованиями. ImageJ обеспечивает два основных преимущества: программа находится в свободном доступе в интернете и ее просто калибровать. Таким образом, это может быть хорошей возможностью для легкого доступа к параметрам моторики спермы с очень простым и доступным оборудованием и для облегчения межвидовых сопоставлений подвижности сперматозоидов с использованием стандартизованных параметров, особенно когда они получены в разных лабораториях.

По подвижности сперматозоидов можно количественно оценивать внутреннее качество их скорее и объективнее, чем посредством биологических интегративных анализов, таких как скорость оплодотворения. Но другие характеристики сперматозоидов могут быть подвергнуты стандартизованным анализам, чтобы лучше изучить качество спермы.

2. ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ФАКТОРОВ НА ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ СПЕРМАТОЗОИДОВ РЫБ

2.1. Количественные параметры подвижности сперматозоидов

Сперматозоиды рыб имеют несколько отличительных особенностей: кратковременная подвижность [65], непосредственная подвижность при контакте с внешней средой, особые различия между пресноводными и морскими видами [162, 261, 93] и различные виды подвижности жгутиков, проявляющиеся среди видов и (или) состояний [57, 222]. Движение жгутиков традиционно классифицируется по структуре сперматозоидов [163] на том основании, что митохондрии удлиняются у рыб с внутренним оплодотворением, но являются рудиментарными и простыми у рыб с внешним оплодотворением [129].

Подвижность является характерной функцией сперматозоидов, необходимой для достижения и проникновения в яйцеклетку. Сперматозоиды как пресноводных, так и морских рыб неподвижны в семенниках и в растворах с аналогичной осмоляльностью, как у семенной плазмы. В общем, подвижность приобретается при регулировании многих внешних и внутренних факторов, а ее характеристики отражают специализированную структуру жгутика. Сперматозоиды рыб, обитающих в солоноватой и соленой воде, обычно плавают намного дольше, чем у пресноводных видов [148]. Однако подвижная фаза сперматозоидов большинства видов рыб обычно длится всего от 30 с до нескольких минут [61]. У большинства пресноводных видов сперматозоиды обычно подвижны менее чем 2 мин, и во многих случаях движение вперед энергично менее чем 30 с [193, 238, 236, 92]. Продолжительность же подвижности сперматозоидов у осетровых аналогична длительности до нескольких минут [10, 179, 237, 246].

Доказано, что продолжительность подвижности сперматозоидов значительно зависит от температуры, она увеличивается при более низких температурах [10, 65, 268, 172, 54, 174, 175]. Первоначальные переменные подвижности и продолжительности моторики зависят от температуры в экологически значимом диапазоне нереста [175]. Эти данные подтвердили, что переменные подвижности были увеличены при более низких температурах (диапазон 4–12 °C) через 30 с у кумжи (*Salmo trutta*), через 45 с у хариуса (*Thymallus thymallus*) (диапазон 4–16 °C) и через 60 с у налима (*Lota lota*) (диапазон 2–8 °C) в воде в качестве активирующей среды. Кроме того, наблюдалось значительное увеличение

подвижности и жизнеспособности при температуре от 23 до 34 °С у огненного барбуса (*Barbus conchoni*) [250]. Процент подвижных сперматозоидов у культивируемого сибирского осетра (*Acipenser baerii*) зависит от температуры воды в бассейнах-выдерживателях [274]. Температура молок, наряду с активирующей средой, влияет на продолжительность моторики сперматозоидов песчаной силлагии (*Sillago ciliata*) [149]. Продолжительность активности сперматозоидов была самой длинной при хранении молок при 0 °С и активировании в среде с той же температурой по сравнению с комнатной температурой. Высокая температура воды приводила к уменьшению продолжительности моторики, а температура ниже 5 °С (в диапазоне 5–0 °С) была связана с более длительным периодом подвижности сперматозоидов у кольчужного сома (*Rhinelepis aspera*) [130].

Исследования также показали, что температура оказывает значительное влияние на общую продолжительность и продолжительность прямолинейного движения у кумжи [164], движение вперед сперматозоидов у озерной форели (*Salvelinus namaycush*) полностью прекращается через 29 с между 12,5 и 16 °С и через 56 с при 2,25 °С.

Спонтанная подвижность сперматозоидов налима наблюдалась при температурах выше 5 °С в семенной плазме [234]. Есть данные о значительно большей продолжительности моторики для сперматозоидов кумжи и атлантического лосося (*Salmo salar*) при 3–4 °С, значительно дольше, чем при 16 и 28 °С [268]. Было подтверждено, что сперматозоиды остаются подвижными дольше при 20 °С, чем при 26 или 30 °С у карпа (*Cyprinus carpio*) и при 30 °С у белого амурского угря (*Ctenopharyngodon idella*) [65]. Снижающаяся тенденция к длительности моторики сперматозоидов наблюдалась у обычного карпа при более низких температурах активационного раствора [71]. Однако не было обнаружено различий в продолжительности моторики сперматозоидов кумжи при температурах от 2 до 28 °С, но у атлантического лосося продолжительность моторики уменьшалась с повышением температуры [268]. У кумжи снижение скорости подвижности на 15 % наблюдалось при 8 °С по сравнению с 4 °С; у налима скорость подвижности уменьшилась на 20 % и скорость плавания на 20 мкм/с⁻¹ при 1 °С по сравнению с 4 °С. У хариуса исходные параметры подвижности не влияли на температурный диапазон (6–8 °С), при котором происходит естественный нерест [175]. Среди четырех испытываемых температур: 10 °С, 12,5 °С, 15 и 17,5 °С – у сибирского осетра (*A. baerii*) максимальная и самая низкая подвижность сперматозоидов была получена при 10 и 17,5 °С [274]. У полосатого прохилода (*Prochilodus lineatus*) продолжительность мо-

торики была самой длинной при 17 °C и уменьшалась при более низких и высоких температурах [235]. Принимая во внимание вышеупомянутые данные о влиянии температуры на продолжительность моторики сперматозоидов, снижение температуры воды ниже экологически значимых уровней видов может продлить движение сперматозоидов. Влияние температуры на продолжительность моторики сперматозоидов является видоспецифичным, не следует рассматривать чрезмерное обобщение.

2.2. Скорость движения сперматозоидов

Существует мало сведений о том, что температура дифференциально влияет на различные характерные параметры, такие как поступательная подвижность, прямолинейная скорость и криволинейная скорость. В исследовании сенегальской солеи (*Solea senegalensis*) данные показали, что активационный раствор при 20 °C увеличивает скорость сперматозоида в течение 60 с после активации по сравнению с 16 °C. Кроме того, температуры, которые дают максимальные скорости плавания, были одинаковыми для воды и SMPs (подвижность сперматозоидов за счет солевого раствора) при 4–6 °C для кумжи и налима и 8–16 °C для хариуса [175]. При 12,5 и 16 °C сообщаемая скорость движения сперматозоидов хариуса была высокой (160–164 мкм/с⁻¹) при 4-секундной послеактивации в пресной воде. Через 8, 16 и 26 с эти значения составляли 85–91, 24–33 и 2–5 мкм/с⁻¹ соответственно [175]. Кроме того, у европейского окуня степень подвижности и скорость плавания были выше при 4 °C, чем при 8, 12 или 16 °C через 60 мин, когда температура колебалась от 12 до 20 °C [174]. Скорость сперматозоидов не увеличивалась у кумжи, налима или хариуса, но в некоторых случаях уменьшалась при более высоких температурах, тогда как влияние на индекс линейности было незначительным [175]. Спермии атлантической трески (*Gadus morhua*) показали более высокую скорость плавания при 6–11 °C, чем при 3 и 21 °C [259]. Это связано с тем, что энергетические ресурсы рыбных сперматозоидов ограничены, увеличение скорости, связанное с повышением температуры в плавающем растворе, приводит к снижению продолжительности моторики, и наоборот, снижение температуры плавания приводит к длительной подвижности наряду с уменьшенной скоростью и частотой биения жгутика [10, 244, 218]. Влияние температуры на частоту биения жгутика спермия варьируется [54], что, вероятно, может быть связано с адаптацией каждого вида к условиям окружающей среды.

2.3. Частота биения жгутика

Характеристики подвижности непосредственно связаны с морфологией и структурой сперматозоидов. Различия, которые могут влиять на подвижность, наблюдаются среди видов костистых рыб в длине жгутика, жизнеспособности сперматозоидов и числа митохондрий сперматозоидов [138, 173]. Частота биений сперматозоидов увеличивается с повышением температуры [66, 115]. При снижении температуры частота биений снижается, а продолжительность подвижности увеличивается [66]. Уменьшенная частота биения жгутика и более длительная подвижность с понижением температуры, вероятно, связаны с запасом АТФ [184, 246]. По мере того, как запасы АТФ истощаются в течение подвижного периода, происходит постепенное снижение частоты биения жгутика и подвижности сперматозоидов [87, 184, 246]. Более высокие частоты биения жгутика требуют повышенного потребления энергии, что приводит к снижению продолжительности моторики из-за ограничений в доступности АТФ [87, 66, 115].

Частота биения жгутика увеличивается с повышением температуры у сперматозоидов европейского хека (*Merluccius merluccius*) [115]. Было обнаружено, что частота биения жгутиков у сперматозоидов радужной форели (*Oncorhynchus mykiss*) при разных температурах должна быть низкой при 5 °C и быстро возрастать при температуре около 14 °C, при этом стабилизироваться при значениях выше 21 °C [66, 65]. Также отмечено, что начальная частота составляла 25 Гц при 5 °C, 45 Гц при 15 °C и более 80 Гц при 25 °C [66].

В сперматозоидах европейского хека частота биения жгутика снижалась с понижением температуры, а продолжительность подвижности увеличивалась [115]. Аналогичные результаты были получены при изучении сперматозоидов радужной форели [218, 66, 65]. Известно, что температура активационного раствора влияет на сперматозоиды, поскольку он увеличивает клеточный метаболизм, вызывая увеличение скорости с более быстрым истощением дефицитных энергетических ресурсов, способствуя скорейшему прекращению подвижности. Это связано с неспособностью митохондрий сперматозоидов рыб синтезировать АТФ достаточно быстро, чтобы компенсировать его потребление путем биения жгутика.

2.4. Содержание АТФ в клетках сперматозоидов

Среди видов рыб более длительная продолжительность моторики и более высокая скорость плавания достигаются при высоких затратах энергии [52]. Подвижность сперматозоидов зависит от энергии, выделяемой при гидролизе АТФ динеин АТФазой для получения биения жгутика [146]. Энергетические пути, особенно окислительное фосфорилирование митохондриями, активны во время неподвижного хранения и движения [69, 172], но неэффективны при поддержании АТФ на постоянных уровнях [87, 170, 172]. Это является ограничивающим фактором в длительности моторики сперматозоидов [87] и жизнеспособности сперматозоидов во время хранения [172]. Повышение температуры приводит к увеличению скорости сперматозоидов, но с более короткой продолжительностью подвижности из-за истощения АТФ посредством гидролиза динеин АТФазой [69, 114]. Общеизвестно, что более длительная продолжительность моторики приводит к более высокому оплодотворению, что, вероятно, объясняется более высокой доступностью АТФ [269]. Некоторые наблюдения показывают отрицательное соотношение температуры окружающей среды с доступными запасами АТФ в естественных условиях [66, 65]. У обычного карпа продолжительность моторики сперматозоидов была более продолжительной, а снижение уровней АТФ было медленнее при 2 °С, чем при 22 °С [114].

2.5. Состав семенной плазмы

Семенная плазма, продуцируемая сперматозоидом, обеспечивает ионную среду, которая поддерживает жизнеспособность сперматозоидов после их высвобождения из семенников [88]. Корреляции между составом семенной плазмы и подвижностью сперматозоидов были показаны у атлантического лосося [155], обычного карпа [230], уклея (*Alburnus alburnus*) [204], радужной форели [116], персидского осетра (*Acipenser persicus*) [237] и чавычи (*Oncorhynchus tshawytscha*) [85]. Идентификация оптимальной температуры активности ферментов сперматозоидов может дать информацию о том, как влияет метаболизм сперматозоидов на температуру, и показывают ли все ферментные системы в сперматозоиде аналогичные реакции. Эти данные могут дать представление о метаболизме сперматозоидов и способствовать оптимизации ферментных анализов, которые используются в фунда-

ментальных исследованиях и контроле качества свежей и заморожено-размороженной спермы [254, 116, 105].

В общем, активность ферментов увеличивается вместе с температурой до критического уровня и резко снижается с дальнейшим повышением температуры [165]. Активность малатдегидрогеназы, пируваткиназы, аденилаткиназы и Mg^{2+} -АТФазы показывает изменения в зависимости от температуры [175]. Потенциальное снижение активности из-за субоптимальной температуры может быть компенсировано увеличением аффинности фермента и субстрата [175]. На активность ферментов могут влиять ионы и сопутствующие субстраты, а требования к ним и их доступность могут изменяться в зависимости от температуры [153].

В сперме рыб температура влияет на ферменты с помощью ферментативно-субстратных аффинных положительных модуляторов, увеличивая сродство фермента и субстрата и обратное [153]. Изомеры данного фермента могут управлять активностью в широком диапазоне температур [178], отличающихся их сродством к ферментам-субстратам, сопутствующим и ионным требованиям [144]. Предполагается, что цАМФ является основным сигнальным путем для активации сперматозоидов радужной форели [191], но концентрация цАМФ, как было показано, медленно возрастает, особенно при низких температурах, и достигает пика после 100%-ной подвижности сперматозоидов [57]. Исследования термостойкости ферментов сперматозоидов показали, что у кумжи и налима максимальная активность малатдегидрогеназы, пируваткиназы, аденилаткиназы и Mg^{2+} -АТФазы была при 4 °C и соответствовала оптимальной температуре для подвижности сперматозоидов. Активность пероксидазы показала оптимальную температуру 20 °C у всех исследованных видов [175]. На горбыле (*Leiostomus xanthurus*) было продемонстрировано, что изозимы малатдегидрогеназы присутствуют в разных количествах, и их активность может изменяться в зависимости от температуры окружающей среды [226].

Также известно, что температура влияет на фазовое расположение липидов в клеточных мембранах [176]. Изменение температуры оказывает влияние на мембраны, особенно на формирование липидных кластеров, которые разрушают избирательную проницаемость липидного бислоя [270]. Фосфолипиды вносят наибольшую долю липидов в мембраны сперматозоидов, и из них наиболее важными являются фосфатидилхолин и фосфатидилэтаноламин [183, 182].

Охлаждение является основным стресс-фактором, в результате которого фосфолипиды, связанные с мембраной, переориентируются на конфигурацию, которая нарушает работу мембраны и проницаемость [55, 99]. По мере охлаждения мембран липиды переходят из их нормальной жидкости в жидкое кристаллическое состояние, в котором жирные ацильные цепи становятся неупорядоченными [211, 270, 110]. Исследования показали, что свежесобранные сперматозоиды кабанов чувствительны к быстрому снижению температуры из-за процессов липидного фазового перехода и фазового разделения [249]. Пиковая температура фазового перехода для фосфолипидов в мембране жеребца, кабана и бычьих сперматозоидов составляет 20,7 °C, 24,0 и 25,4 °C соответственно. Пиковая температура перехода для гликолипидов в мембранах сперматозоидов жеребца составляет 33,4 °C по сравнению с 36,2 и 42,8 °C для кабана и быка соответственно [211]. У мышей высокая доля неподвижных липидов в плазматической мембране в средней части и голове сперматозоидов чувствительна к температуре [181]. Данных о влиянии температуры на активность ферментов и липидов в сперматозоидах рыб имеется мало.

2.6. Морфологические характеристики сперматозоидов

Сперматозоиды являются изолированными клетками, подверженными изменению под воздействием внешней среды от семенников до оплодотворяющей жидкости. Более того, они могут быть повреждены ксенобиотиками, изменены генетической мутацией или старением, и, наконец, они могут быть частично деградированы при хранении. По этим различным причинам у млекопитающих наблюдались изменения структуры спермы, такие как длина жгутика или размер головки сперматозоида. В 90-х годах появившиеся методы и технологии анализа изображений были адаптированы для описания морфологии сперматозоидов млекопитающих посредством разработки ASMA (Automated Sperm Morphology Analysis – Автоматизированный Анализ Морфологии Сперматозоидов). Этот метод впервые применили к сперме рыб Van Look и Kime [266], изучая влияние увеличения дозы ртути на качество спермы. Позднее ASMA использовал Asturiano [127] для оценки влияния HCG (Human Chorionic Gonadotropin – хорионический гонадотропин человека) на спермиацию у европейского угря. Реñaranda использовал ASMA для изучения влияния разбавляющих сред для криоконсервации [126], а Tuset для изучения возможной корреляции между

морфологией спермы и подвижностью [262]. Marco-Jimenez, наблюдая за сходным размером головки сперматозоида с помощью ASMA и сканирующей электронной микроскопии, подтвердил использование ASMA для быстрой оценки морфологии сперматозоидов [200], но обе методики требуют химической фиксации клеток, что, в свою очередь, может легко спровоцировать артефакты.

Разработанный для сперматозоидов млекопитающих длиной 50 мкм ASMA может стать интересным инструментом для анализа партии сперматозоидов рыб, которые в 10 раз меньше. Однако следует обратить внимание на возможные искажения морфологии сперматозоидов рыб из-за необходимости фиксации.

Сперматозоиды демонстрируют исключительную чувствительность к незначительным изменениям температуры окружающих сред [131]. Влияние температуры на физиологию спермы кабана [83, 50] хорошо документированы. Известно, что прямым влиянием высоких температур на сперматозоиды является снижение процента живых и морфологически нормальных сперматозоидов [81, 75], изменения целостности акросомы и плазматической мембраны [221, 75, 225, 224] и стабильности хроматина сперматозоидов [46, 212]. Митохондрии и мембраны сперматозоидов известны как места, особенно уязвимые для повреждения от внезапных изменений температуры [76]. Температуры ниже порога фазового перехода связаны с увеличением проницаемости мембраны с последующей утечкой катионов, снижением активности ферментов и изменением мембранных белков [111, 211, 90].

Как правило, поражение холодным шоком проявляется как снижение клеточного метаболизма, измененная проницаемость мембраны, потеря внутриклеточных компонентов, необратимая потеря подвижности сперматозоидов и увеличение смертности сперматозоидов. Ущерб клеточной мембране имеет наивысшее значение, так как он оказывает переносимое воздействие на другие клеточные структуры и функции [177]. Диффузия липидов в экваториальном сегменте и постакросомные плазматические мембраны сперматозоидов мыши реагируют на изменения температуры, особенно в пределах от 20 до 37 °C, тогда как плазменная мембрана средней части значительно меньше. Чувствительность плазматической мембраны сперматозоидов мыши к изменениям температуры от 20 и 37 °C представляет особый интерес в отношении выживаемости сперматозоидов в придатке яичка [181].

Количественная мера влияния температуры на данный ионный канал описывается обозначением Q10, что означает изменение складки в

проводимости при повышении температуры на 10 °C. В частности, были зарегистрированы большие температурные эффекты ($Q_{10} > 4$) для ряда ионных каналов, таких как Shaker (K^+), ClC-0 (Cl^-), L-тип (Ca^{2+}) и транзитный рецепторный потенциал (TRP) (Ca^{2+}) каналов [185, 186]. Недавно стало известно, что TRPM8, неселективный катионный канал в сперматозоидах, является важным молекулярным термодатчиком, поскольку он может быть активирован низкой температурой у млекопитающих [252, 185]. Кроме того, впервые появились данные о наличии термочувствительных каналов TRP в сперматозоидах ранних позвоночных, а также водных животных [260].

3. ХРАНЕНИЕ СПЕРМЫ ОСЕТРОВЫХ РЫБ

3.1. Краткосрочное хранение спермы

Кратковременное хранение включает в себя разбавление собранной спермы либо в соответствующей семенной жидкости, либо в специальных разбавителях (растворы, предназначенные для поддержания спермы в состоянии покоя) в сочетании с хранением спермы при пониженных температурах (2–4 °C) от нескольких дней до нескольких недель [62, 158, 271, 169]. Этот метод представляет собой важный инструмент для рыбоводческих хозяйств, например, в тех случаях, когда самцы из маточного стада реагируют на гормональную стимуляцию быстрее, чем самки. Поэтому необходимо хранить сперму в состоянии покоя, пока от самок не будет получена икра. Исследования, проведенные с несколькими видами костистых рыб, показали более высокую подвижность сперматозоидов и способность к оплодотворению у спермы, хранящейся в разбавителе по сравнению с неразбавленной спермой [103, 228, 158, 169]. Использование разбавителя обеспечивает концентрацию ионов и осмотическое давление на изотоническом уровне, близком к уровню семенной плазмы, что предотвращает активацию сперматозоидов [228, 169], защищает сперму от осмотического повреждения и загрязнений, таких как моча [62, 265, 255], и поддерживает источник АТФ, необходимый для биения жгутиков, а также оплодотворяющей способности спермы [169]. При низких температурах сперматозоиды имеют низкий метаболизм и могут сохраняться в течение нескольких дней в соответствующих разбавителях спермы [187]. Тем не менее длительные условия хранения в холодном месте могут значительно повлиять на качество спермы, поскольку анаэробные

условия и связанные с ними мощные микробные загрязнения могут снизить подвижность и жизнеспособность сперматозоидов. Чтобы решить эту проблему, рекомендуется добавлять антибиотики (такие как окситетрациклин, гентамицин и энрофлоксацин) в разбавитель [271].

Проведено несколько исследований, которые показали кратковременное хранение спермы осетровых. К примеру, Conte с соавторами [152] и DiLauro с соавторами [227] хранили неразбавленную сперму белого осетра и атлантического осетра в течение 14 и 17 дней соответственно. После 5-дневного хранения на льду неразбавленная сперма атлантического осетра показала около 80 % подвижности и 99 % жизнеспособности [227]. Mims [189] рекомендовал, чтобы хранение спермы веслоноса не превышало 8 дней в 0,9%-ном растворе NaCl и антибиотиках. Wayman [271] использовал различные виды разбавителей с различной осмоляльностью для хранения спермы осетровых. Это исследование показало значительное влияние состава разбавителя и его осмоляльности на подвижность сперматозоидов, хранящихся в холодильнике. У сперматозоидов, хранящихся в растворе с осмоляльностью выше, чем у семенной плазмы, уменьшается подвижность по сравнению со спермой, хранящейся в состоянии изоосмоляльности или оставленной неразбавленной. Wayman [271] также отметил высокую подвижность, когда сперма хранилась в сахарозе или сбалансированном солевом растворе Хэнкса, а не в разбавителе на основе NaCl. Более эффективные результаты, полученные при использовании разбавителя на основе сахарозы, могут быть связаны с переносом сахарозы через клеточную мембрану и ее использованием в качестве источника энергии [171]. Linhart с соавторами [179] привели аналогичные данные о том, что сперма обыкновенного лопатоноса или веслоноса, хранящаяся в течение 3 дней в разбавителе, состоящем из 150 мМ глюкозы, 20 мМ Трис, pH 8,5, имеет более высокую подвижность после активации в пресной воде. Cosson и Linhart [96] предложили использовать разбавитель с изотоническим состоянием, аналогичным состоянию семенной плазмы (около 100 мОсмоль/кг), содержащей 1 мМ K^+ для кратковременного хранения спермы осетровых. Однако количество ионов K^+ должно определяться согласно ингибирующему действию K^+ на активацию сперматозоидов у каждого конкретного вида. Из данных исследований, проведенных над подвидом атлантического осетра из мексиканского залива (*Acipenser oxyrinchus desotoi*) и тупорылым осетром, известно, что сперматозоиды, хранящиеся при комнатной температуре, портились в течение нескольких часов после сбора, в то

время как сперма, хранящаяся в холодильнике, сохранялась в течение 3–7 дней [210]. Park и Chapman [210] применяли разбавитель на ионной основе (1,0 г NaCl, 0,2 г KCl, 0,5 г NaHCO₃, 0,05 г CaCl₂ (безводный), 0,05 г MgSO₄, 0,15 г NaH₂PO₄, 0,15 г Na₂HPO₄, 9,0 г глюкозы или 17,2 г сахарозы в 1 л дистиллированной воды) с осмоляльностью около 100 мОсмоль/кг, pH 7,3–7,5, что продлевало срок хранения сперматозоидов до 21–28 дней после получения. Недавно Dorsey с соавторами [216] использовали такой ионный разбавитель, Park и Chapman [210] применили его для оценки качества спермы атлантического осетра во время кратковременного хранения. Это исследование показало, что подвижность сперматозоидов снижается в течение 21 дня хранения, и снижение было больше в неразбавленном состоянии, чем в разбавителе. В нескольких исследованиях была показана способность к оплодотворению спермы во время кратковременного хранения. У белого осетра оплодотворяющая способность спермы поддерживалась в течение 12–36 ч, когда сперматозоиды хранили при 14–17 °C и от 8 до 14 дней при хранении в холодильнике [152]. Brown и Mims [77] наблюдали у веслоноса высокую оплодотворяющую способность (93 %) у неразбавленной спермы или спермы, разведенной в разбавителе, хранящейся в течение 1–5 дней. Оплодотворяющая способность разведенной спермы в разбавителе уменьшилась до 61 % после хранения в течение 25 дней, что было значительно выше, чем в случае неразбавленной спермы. Park и Chapman [210] не обнаружили существенных различий в оплодотворяющей способности между свежей спермой и спермой, хранящейся в течение 3–18 дней в разбавителе на ионной основе.

3.2. Криоконсервация спермы

Разработка методов криоконсервации может служить средством управления генетическим улучшением видов аквакультуры, включая осетровых и генетическую консервацию исчезающих видов и находящихся под угрозой исчезновения [273, 68, 271]. Успешная криоконсервация может обеспечить синхронность в доступности мужских и женских гамет и простые средства транспортировки гамет, избежать старения спермы, увеличить количество потомков от генетически превосходящих самцов, уменьшить перенос болезни и количество маточного стада [106]. Существует множество факторов, влияющих на успех криоконсервации, в том числе происхождение производителей, исходное качество спермы, разбавитель, криопротектор, время уравни-

вания, коэффициент разбавления, объем эякулята, скорость замораживания и оттаивания, время между оттаиванием и активацией, а также физиологические аспекты сперматозоидов, которые могут быть видоспецифичными [106, 68, 168, 102, 101]. Поэтому определение «оптимальной» процедуры для криоконсервации спермы для определенного вида не является простой задачей. Согласно данным Mims [107], ранние исследования по криоконсервации сперматозоидов осетровых были проведены в СССР Бурцевым и Серебряковой [5] с ограниченным успехом (менее 1 % оплодотворения), а позднее Пушкарем с соавторами [19] с 40%-ной подвижностью и 35%-ным оплодотворением. В качестве разбавителя часто используются растворы, содержащие NaCl, KCl, сахарозу забуференную раствором трис-HCl до 150 мМ (pH 8–8,5). Активацию сперматозоидов предотвращают добавлением KCl в разбавитель или путем увеличения осмоляльности разбавителя посредством более высоких концентраций NaCl или сахарозы. В нескольких случаях также использовался модифицированный сбалансированный солевой раствор Хэнкса с осмоляльностью около 100 мОсморь/кг. Наиболее распространенными криозащитными веществами являются диметилсульфоксид (DMSO), метанол (MeOH), глицерин, глицин, диметилацетамид (DMA), этиленгликоль (EG), яичный желток, растворы макро- и микроэлементов, буферные растворы и многие другие вещества [13]. Для криоконсервации, как правило, используют 0,5–5 мл эякулята. Замораживание спермы происходит в парах жидкого азота или в морозильной камере с контролируемой скоростью [167]. Обычно емкости с образцами спермы замораживаются на 3–5 см выше уровня жидкого азота в пенопластовом ящике в течение 5–20 мин, а затем погружаются в жидкий азот. Для оттаивания замороженной спермы используют водяную баню при 35–40 °С в течение 3–10 с.

В настоящее время поиск оптимальных условий криоконсервации сводится в основном к разработке оптимального состава криопротекторов [2, 7, 13]. Корректирование состава криопротекторов в основном проводят на основе среды Штайна [3, 29, 13]. В последнее время многие авторы упоминают о новых веществах, которые также обладают протекторными свойствами [41, 4, 17, 13].

В результате криоконсервации клетки подвергаются температурному шоку, что вызывает неизбежные цитоструктурные нарушения. По мнению Земкова с соавторами, более глубокие исследования в этом направлении дают возможность целенаправленного подбора состава

криопротекторных сред [13]. В своих исследованиях по криоконсервации спермы русского осетра Земков с коллегами использовали стандартный криопротектор для различных видов рыб, состав которого ранее был использован Ананьевым для спермы белуги и севрюги [3]. В его состав входили минеральные соли (6,5 г NaCl, 0,25 г KCl, 0,3 г CaCl₂ и 2 г NaHCO₃) и вещества с протекторными свойствами (сахароза, маннит общей навеской 2 г, желток и ДМСО по 10 %). В результате использования стандартного состава криопротектора до и после замораживания спермии теряли подвижность, а сами клетки имели различные по степени морфологические нарушения. В результате чего Земков с коллегами разработали новый состав криопротекторной смеси (глицерин 0,05 мл, ДМСО 0,05 мл, гепарин 0,04 мл), позволившей уменьшить уровень повреждений.

В это же время Пономарева с коллегами, также отталкиваясь от среды Штайна, разработали новую криосреду «№ 3» (NaCl, KCl, NaHCO₃, CaCl₂, маннит, сахароза, 10 % яичного желтка, 10 % ДМСО). В ходе экспериментов установлено, что выживаемость спермиев русского осетра с поступательными движениями на всех этапах замораживания-размораживания выше в криосреде «№ 3» в сравнении со средой Штайна. Так, после эквilibрации процент активности спермиев составляет 90 и 50 %, а после дефростации – 60 и 10 % соответственно [21].

Черепнин с коллегами в экспериментах по криоконсервации спермы карповых осуществляли модификацию стандартных криозащитных сред сывороткой зимней крови карася (10 % об. плазмы крови карася) (*Carassius auratus gibelio* L.), подвергшегося действию термошока [26], и кобамамидом (0,3 мг/л) – коферментом витамина B₁₂ [277]. Лучший результат показала модификация с добавлением плазмы крови карася. Процент живых спермиев в дефростированной сперме карпа и белого амура составил 69,09 и 40 % соответственно [42].

Почти все исследования по криоконсервации сперматозоидов осетровых показали значительно низкую подвижность и скорость дефростированной спермы по сравнению с таковой свежей спермой. Наблюдаемое снижение подвижности и скорости сперматозоидов может быть связано с уменьшением процента жизнеспособности сперматозоидов, высоким повреждением сперматозоидов или снижением содержания АТФ после криоконсервации [203, 63, 100, 256, 267, 124]. Цветкова с соавторами [203] указали на более быстрое снижение скорости дефростированной спермы по сравнению со свежей спермой; скорость спер-

матозоидов значительно снижалась, однако частота биения спермы не отличалась между свежей и дефростированной спермой [203]. Billard с соавторами [63] проиллюстрировали форму волны жгутикового биения как в дефростированной, так и в свежей осетровой сперме. Они наблюдали асимметричную форму у дефростированной спермы после активации в 18 мМ Трис-НСl при pH 8,0, в то время как свежая сперма проявляла только симметричную форму волны. Кроме того, волны жгутикового биения не были хорошо развиты в дефростированной сперме, а параметры волн показали значительную разницу по сравнению со свежей спермой. Например, амплитуда волны была меньше в дефростированной сперме по сравнению со свежей спермой после активации [203, 63].

Хотя подвижность и скорость сперматозоидов являются ключевыми факторами, определяющими успех оплодотворения, такое предположение не всегда справедливо в случае спермы осетровых [256]. Например, у тупорылого осетра и белого лопатоноса подвижность дефростированной спермы была одинакова как с диметилсульфоксидом, так и с метанолом, но более высокая оплодотворяющая способность наблюдалась у сперматозоидов с использованием метанола в качестве криозащитного вещества [256, 267]. Вероятно, это связано с наличием акросомы. Более высокие концентрации акросомных ферментов были зарегистрированы в дефростированной сперме по сравнению со свежей спермой. Предполагается частичное высвобождение этих ферментов из сперматозоидов в семенную жидкость [70, 253]. Lahnsteiner с соавторами [245] также показали потерю или уменьшение акросомной реакции в размороженной сперме по сравнению со свежей спермой. Эти результаты свидетельствуют о том, что криоконсервация влияет на способность к оплодотворению спермы у осетровых как путем снижения функции подвижности сперматозоидов, так и повреждением акросом [47].

Некоторые исследования показали, что использование раствора, содержащего соль или сахарозу с осмоляльностью около 50 мОсмоль/кг (менее 100 мОсмоль/кг), приводит к лучшей активации дефростированной спермы по сравнению с пресной водой (вода для инкубации) [100, 168, 123, 108]. Также важно поддерживать концентрацию KCl в криозащитных средах, близкую к 1 мМ, так как это может предотвратить активацию сперматозоидов вследствие замораживания-размораживания [240, 108]. Установлено также, что после замораживания добавление 1 мМ Ca^{2+} может усилить активацию сперматозоидов, что приведет к

увеличению подвижности сперматозоидов и оплодотворяющей способности [202, 100].

У сперматозоидов разных видов рыб наблюдается различная устойчивость к воздействию замораживания-размораживания. У лососевых и карповых выживаемость сперматозоидов после криоконсервации обычно не превышает 25–70 % в зависимости от температуры нереста [16, 91, 154]. У стерляди выживаемость сперматозоидов может достигать в отдельных случаях и 100 % [78, 100].

В процессе криоконсервации клетки подвергаются ряду стресс-факторов, которые губительно действуют на субклеточные системы. На данный момент не существует единой методики криоконсервации спермы рыб, так как их среды обитания значительно различаются.

На данный момент точно не определены механизмы повреждений сперматозоидов в процессе их криоконсервации [168], однако одним из основных факторов повреждения является температурно-осмотический шок [14].

Различная степень устойчивости сперматозоидов разных видов рыб к криоконсервации обусловлена большей частью отличием в их осмотической резистентности. Клетка, попадая в изотоническую среду, начинает увеличиваться в объеме за счет проникновения в нее внеклеточной воды. Степень увеличения зависит от разницы осмотичности внутриклеточной и внеклеточной среды. Объем воды и скорость ее прохождения в клетку и из нее могут определять степень устойчивости клетки к губительному действию криоконсервации. Степень проницаемости мембраны для молекул воды показывает, насколько клетка устойчива к воздействию криоконсервации. Проницаемость мембраны показывает, насколько быстро клетка может ответить на изменение осмотичности среды [14].

Сперматозоиды рыб имеют меньшую степень проницаемости мембран для молекул воды, чем спермии млекопитающих, в результате чего спермии рыб имеют меньшую сохранность при низкотемпературном воздействии. Следует учитывать, что проницаемость уменьшается при понижении температуры [14].

Пуговкин с коллегами, изучая проницаемость мембран сперматозоидов, установили, что проницаемость мембран спермиев влияет на результаты криоконсервирования половых продуктов рыб. При этом проницаемость мембран сперматозоидов стерляди для молекул воды выше, чем у сперматозоидов карпа. Отсюда следует, что более высокая

проницаемость мембран сперматозоидов у стерляди обуславливает ее более высокий процент сохранности после дефростации [30].

Некоторые авторы утверждают, что повышение проницаемости мембран увеличивает эффективность результатов криоконсервации. Дзюба с соавторами добивались увеличения проницаемости мембран сперматозоидов карпа путем кратковременной экспозиции их в гипотонической среде перед добавлением криозащитной среды [156].

Увеличения выживаемости сперматозоидов себрюги на 30 % в своих исследованиях добились Пономарева с коллегами, путем повышения проницаемости мембран половых клеток, используя метод электростимуляции с частотой сигнала 20 Гц [23].

При криоконсервации осмотичность криозащитной среды может в несколько раз превышать осмотичность спермы рыб. В исследованиях с использованием спермы лососевых, осетровых и карповых рыб установлено, что снижение осмотичности криозащитной среды повышает оплодотворяющую способность размороженной спермы [15, 35, 256, 241, 243]. Из-за большого разнообразия видов рыб, различной реакции сперматозоидов на изменения окружающей среды и отсутствия теории формирования криорезистентности сперматозоидов на сегодняшний день не разработан унифицированный способ их хранения. По мнению А. Хорвача и соавторов [256], осмотичность среды является ключевым фактором криоповреждений сперматозоидов. Исследование свойств спермы рыб, которые нерестятся в пресной и соленой воде, показало, что осмотический градиент – один из главных факторов криоповреждений [15, 9, 168]. Степень этих повреждений зависит как от температуры воды, так и от ее солености, т. е. от экологической ниши нереста рыб [9], которая формирует криорезистентность сперматозоидов при взаимодействии с геномом клеток и организмов. Харвей и соавторы [150, 151] первыми начали использовать низкомолекулярный криопротектор метанол и показали его эффективность при криоконсервировании спермы рыб *Sarotherodon mossambicus* и *Danio rerio*. С 2000 года активно разрабатывались новые методы криоконсервирования спермы лососевых, осетровых и карповых рыб [256, 220, 135, 245, 203, 264] с использованием сред, содержащих метанол и сахарозу, что позволило значительно повысить эффективность низкотемпературного замораживания спермы рыб, однако не полностью решило все проблемы. В эякуляте пресноводных рыб сперматозоиды находятся в неподвижном состоянии. Во время криоконсервирования спермы в разных частях контейнера, в котором замораживают образец, меняется

концентрация солей, что приводит к активации части клеток и уменьшению оплодотворяющей способности спермы [31]. Так, через 5 мин после размораживания оплодотворяющая способность спермы радужной форели *Salmo gairdneri* снижалась с 70 до 10,7 % [242]. При увеличении объема контейнера повышалась вероятность этих изменений. Но в условиях высокой концентрации сперматозоидов лососевых рыб их оплодотворяющая способность была такой же, как и после криоконсервирования в ампулах 0,5 и 1,2 мл [245]. В случае уменьшения объема спермы оплодотворяющая способность спермы из ампул 1,2 мл была значительно ниже, чем из ампул 0,5 мл при оплодотворении такой же массы икры. Это свидетельствовало о меньшей сохранности сперматозоидов, замороженных в больших ампулах. Аналогичный результат был получен и во время оплодотворения размороженной спермой как лососевых, так и карповых видов рыб [9, 135, 104]. При увеличении массы икры для оплодотворения с 80 до 120 г необходимо было повышать и объем размороженной спермы. При этом ее оплодотворяющая способность существенно снижалась с (65 ± 18) до (21 ± 14) %. Таким образом, увеличение объема спермы рыб при криоконсервировании снижало ее качество [245, 104].

Создание криобанка исчезающих видов может помочь в будущем увеличить численность исчезающих или восстановить уже исчезнувшие на тот момент виды рыб. В последние годы актуальным становится применение метода диспермного андрогенеза с использованием криоконсервированной спермы в целях сохранения и восстановления генофондов исчезающих видов. Так, Груниной с соавторами был разработан метод диспермного андрогенеза для осетровых рыб [12].

В данном методе диплоидизация осуществляется путем слияния хромосомных наборов двух спермиев, в результате чего получается гетерозиготное потомство. Метод основан на биологической особенности строения яйцеклетки осетровых рыб – наличии нескольких микропиле. Рентгеновским излучением осуществляли инактивацию ядер яйцеклетки, затем проводили полиспермное оплодотворение и тепловым шоком способствовали слиянию мужских пронуклеусов. Сперма при этом использовалась как нативная, так и дефростированная. Сперму замораживали в пробирках вместимостью 1,5 мл. Криозащитная среда имела следующий состав: метанол (10 %), сахарозу (7 %) и антифризные белки. Размораживание происходило в водяной бане (40 °C) в течение 1 мин, затем полуразмороженную сперму разбавляли водой и осеменяли икру с последующим отмыванием яйцеклеток от криопротектора. В результате

этих исследований Груниной с коллегами впервые были получены андрогенетическое потомство сибирского осетра (*Acipenser baerii*) и андрогенетические ядерно-цитоплазматические гибриды (сибирский осетр, *Acipenser baerii* × русский осетр, *A. gueldenstaedtii*) у осетровых рыб с использованием криоконсервированной спермы [12].

Криоконсервация сперматозоидов в жидком азоте считается одним из перспективных способов сохранения генетического разнообразия редких и исчезающих видов, но в этом способе также имеется и большое количество недостатков. Использование существующих методов замораживания и последующего размораживания спермы приводит к снижению ее активности, т. е. значительная доля мужских половых клеток теряет способность к оплодотворению яйцеклетки [24, 25, 36, 100]. Изучая дефростированные сперматозоиды на свето- и электронно-микроскопическом уровнях многие исследователи отмечают агглютинацию спермиев, утрату ими структур, обуславливающих двигательную активность, и другие морфофункциональные изменения [13].

Некоторые исследователи предполагают существование некого отбора в пользу определенных изоферментов в связи с гибелью или инактивацией отдельной доли сперматозоидов, так как в процессе изменения условий среды происходит биохимическая адаптация [40]. Подтверждением существования некой селективности генотипов при замораживании-размораживании половых продуктов может также косвенно служить и смещение в соотношении полов в пользу самок. Так, в исследованиях Савушкиной с коллегами, при использовании криоконсервированной спермы русского осетра ленской популяции в воспроизводстве на Конаковском заводе товарного осетроводства было отмечено значительное преобладание самок над самцами в полученном «криопотомстве». При этом наблюдалось превосходство по темпу роста данного «криопотомства» над молодью, полученной при оплодотворении икры нативной спермой [34, 33].

Шишанова с соавторами впервые провели исследование о влиянии криоконсервации спермы на выживаемость и генетический полиморфизм личинок русского осетра [43]. В этих исследованиях было доказано, что процесс замораживания-размораживания является для мужских половых клеток значительным стрессовым фактором, в результате воздействия которого наблюдается селективная смертность потомства и избирательное влияние на генофонд.

Результаты эксперимента показали, что только в результате замораживания-размораживания спермы из процесса оплодотворения ис-

ключается 75–80 % мужских половых клеток. Далее на этапе развития икры погибает 40–60 % эмбрионов. Таким образом, в конечном итоге только около 10 % половых клеток от исходных замороженных спермиев внесут свой вклад в генофонд потомства. Вклад нативных же спермиев составляет не менее 70 % [43]. Полученные данные также свидетельствуют об изменении генетической структуры получаемого потомства в сторону увеличения доли гетерозигот как более устойчивых к вредным воздействиям.

По мнению большинства авторов, преобладание гетерозиготного потомства присуще заводскому воспроизводству и является весьма нежелательным фактором, поскольку увеличение гетерозиготности по сравнению с исторически сложившимся оптимумом, характерным для нетронутых популяций, ведет к нарушению популяционной структуры и их постепенной деградации в последующих поколениях [20, 8, 1, 6, 32].

Таким образом, остается необходимым дальнейшее более детальное изучение факторов, влияющих на выживаемость сперматозоидов при криоконсервации.

3.3. Консерванты и антиоксиданты

В современном мире консерванты используются практически повсеместно. Для увеличения сроков хранения продукции консерванты используют во многих производствах, таких как пищевая промышленность, кормопроизводство, фармацевтическая промышленность, изготовление косметики и парфюмерии и многих других.

Консерванты используют с целью предотвращения микробиологической порчи и увеличения срока годности продукции. Консервирование – это меры, направленные против развития вредных микроорганизмов, образования ими токсинов, предотвращения плесневения, появления неприятного вкуса и запаха. Различают физическое, химическое и биологическое консервирование [37].

Химические консерванты – это синтетические химические вещества, используемые для замедления или предотвращения нежелательных изменений пищевых и технических продуктов биологического происхождения, вызываемых микроорганизмами – бактериями, плесенью, дрожжами [27].

По способу действия на микроорганизмы консерванты можно разделить на две группы: бактериостатического и бактерицидного действия. Вещества бактериостатического (фунгистатического) действия

наносят клеткам микроорганизмов обратимые повреждения. В результате таких действий микроорганизмы остаются живыми, но замедляется их рост и размножение. При бактерицидном (фунгицидном) действии микроорганизмы погибают.

Механизм действия консерванта на микроорганизмы многообразен. Антимикробное действие консервантов обусловлено их воздействием на ДНК, синтез белка, активность ферментов, клеточную оболочку, клеточную мембрану и на механизм транспорта питательных веществ [18].

В результате действия консерванта изменяется обмен веществ в клетке микроорганизма, который неразрывно связан с деятельностью ферментов. Определенные химические вещества, действуя на некоторые ферменты, нарушают подготовку питательного материала для усвоения, создавая недостаток питательных веществ, приводящий к остановке роста и размножения микроорганизмов. При истощении клетка в итоге погибает. В результате полного поражения некоторых ферментов, в частности дегидрогеназ, происходит остановка окислительных процессов и сопряженных с ним процессов синтеза, т. е. наступает гибель организма [22].

Большинство консервантов является липофильными веществами, которые атакуют клеточную мембрану и нарушают ее целостность или разрушают полностью. Увеличивается поток протонов в клетку, в результате чего клетка вынуждена потреблять больше энергии, компенсируя возникающую разность потенциалов.

Этиловый спирт (C_2H_5OH) – бесцветная жидкость, смешивается с водой в любых соотношениях и закипает при температуре 78 °С. В концентрированном виде вызывает денатурацию протоплазмальных белков у микроорганизмов. Для дезинфекции чаще применяют 60–70%-ный спирт. При концентрации 5–20 % спирт оказывает консервирующее действие путем снижения активности воды в продукте. В продуктах средней влажности консервирующий эффект можно получить добавлением 2–4 % спирта [18].

Сахар (сахароза) $C_{12}H_{22}O_{11}$ – бесцветные, сладкие на вкус кристаллы, плавящиеся при температуре 185 °С. Сахароза мало растворима в спирте, но хорошо в воде. Консервирующее действие достигается путем снижения активности воды. Сахароза уменьшает растворимость кислорода в воде. В результате чего аэробные микроорганизмы испытывают нехватку кислорода [18].

Борная кислота H_3BO_3 представляет собой белые блестящие пластинки или белый кристаллический порошок, умеренно растворимый в

воде. Консервирующий эффект оказывает путем блокирования ферментов фосфатного обмена. В отличие от других кислот-консервантов борная кислота проявляет антимикробное действие в нейтральной среде. Имеет сравнительно низкую эффективность, в результате чего должна использоваться в достаточно высоких концентрациях. Борная кислота превосходно справляется с дрожжами. Мало эффективна против плесневых грибов и только частично угнетает бактерии [18].

Находясь в атмосфере с кислородом, многие органические и неорганические вещества подвергаются окислению. Действию окислительных процессов наиболее подвержены вещества (например, каучуки и жиры), молекулы которых содержат ненасыщенные связи [28].

Процессы окисления могут проходить в человеческом организме, растениях, в пищевых жирах, в некоторых технических продуктах (каучуки, полимеры, минеральные масла и т. п.)

Веществами, замедляющими или предотвращающими окислительные процессы, являются антиоксиданты (антиокислители).

Одним из наиболее сильных антиокислителей является аскорбиновая кислота (E300, витамин C). Представляет собой кристаллическое соединение, легко растворимое в воде. Аскорбиновая кислота и ее дегидроформа образуют окислительно-восстановительную систему, способную отдавать и принимать водородные атомы [27].

Для усиления антиокислительного действия антиоксиданты или их смеси применяют в комбинации с веществами, которые сами или не обладают антиокислительным действием или являются слабыми антиоксидантами. Эти вещества являются синергистами. К ним относятся некоторые многоосновные органические оксикислоты (лимонная, винная), амины, отдельные неорганические кислоты (фосфорная) и их кислые эфиры, ряд аминокислот, полифосфаты и т. д. [37].

Описано положительное влияние лимонной кислоты на стойкость жиров и масел при хранении. Она образует с ионами металлов растворимые комплексные соединения [27]. Лимонная кислота представляет собой бесцветное кристаллическое вещество, проявляющее свойства многоосновных карбоновых кислот, образующее 3 ряда солей и эфиров (цитратов) по карбоксильным группам [39].

Винная кислота представляет собой бесцветное кристаллическое вещество. Существует в виде 3 стереоизомеров и рацемата (виноградной кислоты) [38].

Применение веществ, обладающих консервирующими и антиоксидантными свойствами, при краткосрочном хранении мужских половых продуктов рыб позволяет значительно увеличить их срок хранения.

4. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В качестве объекта исследований была выбрана сперма самцов ленского осетра, выращенных от стадии личинки до половозрелого состояния в условиях установки замкнутого водоснабжения (фермерское хозяйство «Василек», Дзержинский р-н, Минская обл.). Возраст самцов – 7 лет, средняя масса – 7,0 кг, средняя длина – 99,5 см. Самцов отбирали осенью, для возможного использования в воспроизводстве, с гонадами, находящимися в III–IV и IV стадиях зрелости. Осенняя бонитировка самцов проводилась при снижении температуры воды до 12 °С, при которой рыбу обычно прекращали кормить. Для отбора зрелых самцов при осенней бонитировке использовали метод определения стадий зрелости гонад при помощи неинвазивного экспресс-метода УЗИ. Температурный режим во время зимовки самцов составлял 4–5 °С. При этом допускалось кратковременное повышение температуры до 7 °С и ее понижение до 2 °С. Во время весенней бонитировки основным требованием к режиму преднерестового содержания самцов являлось сохранение их репродуктивных качеств. Поскольку самцы обычно готовы к нересту уже при кратковременном выдерживании при нерестовых температурах, наиболее эффективным приемом сохранения их репродуктивных качеств являлось содержание при невысоких температурах. Для стимулирования созревания самцов применяли суперактивный синтетический аналог гонадотропин-релизинг-гормона млекопитающих (GnRH_a, сурфатон). Для инъекций использовали медицинские шприцы. Инъекцию производили в спинные мышцы между спинными и боковыми жучками на уровне 3–5 спинной жучки. При введении препарата в мышечные ткани соблюдали осторожность и следили за тем, чтобы рыба при сжатии мышц не вытолкнула препарат. Отбор спермы осуществляли при помощи катетера и пластикового шприца Жане. Средний объем полученного эякулянта – 100 см³. Температура воды в период взятия половых продуктов составляла 14,5 °С. Вся отобранная сперма оценивалась в 5 баллов по 5-балльной шкале Персова. Для исследования подвижности спермиев пробу разбавляли водой в соотношении 1:20–1:50. Температура воды соответствовала температуре эякулята. Перед получением спермы, в целях недопущения преждевременной активации, производителей обтирали полотенцем или марлевой салфеткой, особенно тщательно вытирали место у

анального отверстия, а также анальный и хвостовой плавники. При этом следили, чтобы в пробирку не попали вода, полостная жидкость или экскременты рыбы. Пробирки со спермой ставили в холодильник или в холодное затененное место.

После проведения сцеживания спермы производили манипуляции по ее разбавлению. Разбавление осуществляли в сыворотке спермы, которую получали индивидуально для каждого самца. Получение сыворотки осуществляли методом центрифугирования при скорости вращения ротора 800 об/мин в течение 2 мин, а затем на оборотах 3500 об/мин в течение 10 мин. Для проведения исследования были сформированы следующие группы: с разбавлением 0 (контрольная группа), 1:1 (опытная группа 50), 1:3 (опытная группа 30), 1:10 (опытная группа 10) и 1:100 (опытная группа 1). Исследуемая сперма помещалась в пробирки типа Eppendorf объемом 2 мл и хранилась в холодильнике при температуре 5 °С.

Для проведения исследований с консервантами были сформированы следующие группы:

- контрольная группа, в которой сперма разбавлялась в сыворотке без добавления борной кислоты, и опытные группы, в которых сперма разбавлялась в сыворотке с добавлением борной кислоты в концентрациях 125, 250, 500, 1000 мг/л;
- контрольная группа, в которой сперма разбавлялась в сыворотке без добавления винной кислоты, и опытные группы, в которых сперма разбавлялась в сыворотке с добавлением винной кислоты в концентрациях 125, 250, 500, 1000 мг/л;
- контрольная группа, в которой сперма разбавлялась в сыворотке без добавления лимонной кислоты, и опытные группы, в которых сперма разбавлялась в сыворотке с добавлением лимонной кислоты в концентрациях 125, 250, 500 мг/л;
- контрольная группа, в которой сперма разбавлялась в сыворотке без добавления цинка, и опытные группы, в которых сперма разбавлялась в сыворотке с добавлением цинка в концентрациях 125, 250, 500, 1000 мг/л;
- контрольная группа, в которой сперма разбавлялась в сыворотке без добавления сахара, и опытные группы, в которых сперма разбавлялась в сыворотке с добавлением сахара в концентрациях 125, 250, 500 мг/л;

- контрольная группа, в которой сперма разбавлялась в сыворотке без добавления спирта, и опытные группы, в которых сперма разбавлялась в сыворотке с добавлением спирта в конечной концентрации 1, 2, 3, 4, 5 %;

- контрольная группа, в которой сперма разбавлялась в сыворотке без добавления H_2SO_4 (0,1 Н), и опытные группы, в которых сперма разбавлялась в сыворотке с добавлением H_2SO_4 (0,1 Н) в конечной концентрации 10, 50, 100 мг/л.

Исследуемая сперма помещалась в пробирки типа Eppendorf объемом 2 мл и хранилась в холодильнике при температуре 5 °С.

Подвижность сперматозоидов исследовали на тринокулярном (тип Зидентофа) биологическом микроскопе проходящего света серии MMC-KZ-900 с независимой планохроматической оптической системой на бесконечность $F = 200$ мм. Для анализа подвижности использовали счетные камеры с фиксированной глубиной марки Leja. Запись подвижности сперматозоидов осуществляли при помощи видеокamеры MMC-31C12-M, построенной на основе сенсора компании Aptina. Частота кадров в секунду, к/с: 12 при разрешении 2048×1536 , 60 при 800×600 , 95 при 640×480 , 135 при 512×384 . Для исследований качества спермы использовали автоматизированное программное обеспечение MMC Сперм, которое представляло собой основу для компьютерного спермоанализатора (CASA). Оценка концентрации сперматозоидов и анализ их подвижности производились на видеоклипах в формате AVI, на основе алгоритма анализа с учетом требований руководства Всемирной организации здравоохранения.

Для статистической обработки результатов использовали программную среду R, включая пакеты R Commander, MASS, ggplot2, mgcv, drc, corrplot и др. Статистическую достоверность различий оценивали по тесту Тьюки при условии соблюдения нормальности распределения данных (оценивалось тестом Шапиро-Уилка) и однородности групповых дисперсий (оценивалось тестом Ливина). При несоблюдении указанных условий использовали непараметрический тест Ньюмена-Кейлса.

5. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

5.1. Апробация метода CASA в исследовании сперматозоидов осетровых рыб

Основная функция сперматозоида состоит в активации яйца, побуждении его к развитию, а также в снабжении гаплоидным ядром. В связи с этим подвижность сперматозоидов является одним из важных параметров. Основная роль в снабжении сперматозоида энергией принадлежит митохондриям, которые у рыб сконцентрированы в средней части сперматозоида. С функциональной точки зрения подвижность сперматозоидов напрямую зависит от уровня АТФ, поэтому способность влияния на уровень АТФ может существенно изменить подвижность сперматозоидов. Сперматозоиды являются популярным биологическим объектом для оценки влияния факторов физической и химической природы на качество половых продуктов самцов. Так, увеличение срока хранения спермы индейки наблюдалось при добавлении витаминов Е и С, а введение цианокобаламина в криозащитную среду на начальных этапах криоконсервации спермы русского осетра повышало выживаемость и время движения сперматозоидов. Воздействие на сперму человека рентгеновским излучением угнетало, ультрафиолетовым не влияло, а инфракрасным излучением и электромагнитным полем повышало подвижность сперматозоидов. Воздействие гамма-излучением на сперматозоиды крысы оказывало негативное влияние, а воздействие лазерным излучением красной области спектра повышало качество спермы индейки и собаки. Кроме того, воздействие на сперму тилапии светом белой, а также красной областей спектра приводило к повышению подвижности сперматозоидов. Воздействие светом синей и ультрафиолетовой областей спектра оказывало отрицательное влияние.

В ветеринарии и животноводстве много лет известны следующие методы оценки качества спермы животных: изучение анатомического строения сперматозоидов, объема эякулята, цвета, запаха, консистенции; оценка подвижности, густоты, интенсивности дыхания, резистентности, скорости обесцвечивания и др.

В животноводстве оценку спермы по подвижности проводят по 10-балльной системе. Наивысшую оценку – 10 баллов дают сперме в том случае, если все спермии обладают поступательным движением; при оценке в 9 баллов – 9 спермиев из 10 обладают прямолинейно-поступательным движением, 6 баллов – 6 из 10 и т. д. В рыбоводстве активность сперматозоидов выражают в баллах по шкале Персова, в

которой за 5 баллов принимается быстрое поступательное движение всех спермиев; 4 балла – большинства спермиев, но в поле зрения встречаются отдельные сперматозоиды, осуществляющие замедленное зигзагообразное, круговое или колебательное движение; 3 балла – части спермиев, причем преобладает замедленное зигзагообразное, круговое или колебательное движение, имеются неподвижные спермии; 2 балла – быстрое поступательное движение наблюдается редко, у части спермиев колебательное движение, около 75 % спермиев неподвижно; 1 балл – все спермии неподвижны.

Густота спермы, определяемая при глазмерной микроскопической оценке, дает приблизительное представление о количестве спермиев в 1 мл эякулята. Резистентность спермы выражается количеством миллилитров 1%-ного раствора хлористого натрия, которое нужно добавить к 1 мл спермы, чтобы в ней прекратилось поступательное движение спермиев. Активность спермы оценивают по скорости обесцвечивания (восстановления) метиленовой синьки, смешанной со спермой. Подсчет сперматозоидов позволяет оценить число сперматозоидов с приемлемой изменчивостью из-за разбавления и подсчета ошибок до 6 % на 300 сперматозоидов при наблюдении, когда подсчет 1:500 разбавленной спермы повторяется 3 раза.

Все вышеперечисленные методы являются достаточно субъективными, с большим процентом ошибок, который в значительной степени зависит от человеческого фактора.

С развитием высокоскоростной съемки и компьютерных технологий стали возможны исследования движения одновременно нескольких клеток с определением траектории их перемещения и скорости. Использование аппаратно-программных комплексов для определения концентрации, характеристики движения сперматозоидов, а также морфологических критериев клеток легло в основу новой технологии в лабораторной медицине – CASA – компьютерного анализа подвижности сперматозоидов. CASA позволяет проводить оценку таких показателей подвижности, как криволинейная скорость, прямолинейная скорость, линейность. Совокупное использование полученных данных позволяет дать объективную оценку качеству спермы и преодолеть субъективность интерпретации, присущей стандартной спермограмме. Основное преимущество компьютерного анализа – это достоверное определение. В зависимости от количества одновременно находящихся в поле наблюдения сперматозоидов компьютер рассчитывает параметры движения либо всех, либо большей их части, что невозможно при ручном производстве спермограммы. Другим важным преимуществом является воспроизводимость, т. е. результат исследования не

зависит от лаборанта, производящего исследование, от уровня его подготовки, степени концентрации внимания или усталости. Можно быть уверенным, что проведенный одному пациенту анализ подвижности в разное время будет правильно отражать изменения показателей, исключая погрешности преаналитической стадии. Следующее преимущество – объективность: анализатор измеряет истинные скорости движения сперматозоидов, позволяя объективно судить о фертильности спермы. Совершенствование компьютерной морфологической диагностики позволяет получить принципиально новую количественную информацию, недоступную врачу при обычном визуальном анализе изображений под микроскопом.

Простота получения, относительная доступность и массовость сперматозоидов животных и рыб делают их популярными объектами в биологических, ветеринарных и сельскохозяйственных исследованиях при изучении механизмов искусственного оплодотворения. Применение компьютерного анализа при исследовании качества спермы животных и рыб позволяет стандартизировать методику таких исследований и минимизировать субъективизм и человеческий фактор в процессе получения новых научных результатов.

В большинстве случаев сперма, получаемая у рыб в условиях технологии искусственного воспроизводства, находится в неподвижном состоянии. Однако при добавлении обычной воды, в которой осуществляется выращивание и содержание рыб, сперматозоиды приобретают подвижность. Сперматозоиды ленского осетра перед активацией водой представлены на рис. 1.

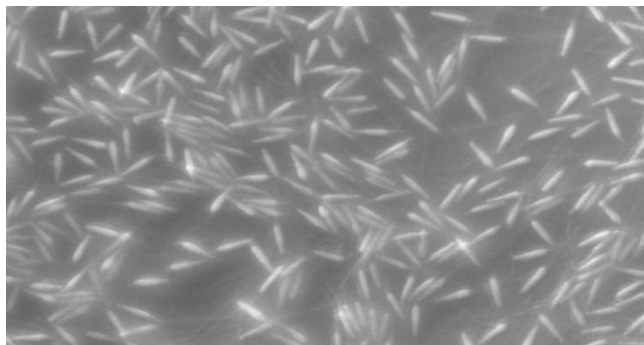


Рис. 1. Сперматозоиды ленского осетра перед активацией

В качестве анализируемых параметров используют следующие показатели, получившие распространение при исследовании подвижности сперматозоидов человека в медицинских исследованиях: VCL – криволинейная скорость (мкм/с) – усредненная по времени скорость движения сперматозоида вдоль его реальной траектории, как она воспринимается в двухмерном пространстве под микроскопом; VSL – прямолинейная скорость (мкм/с) – усредненная по времени скорость движения сперматозоида вдоль линии, проведенной между начальной и конечной точками траектории; VAP – средняя скорость движения по траектории (мкм/с), усредненная по времени скорость движения сперматозоида по усредненной траектории; WOB – колебание – величина, описывающая колебание реальной траектории относительно усредненной $WOB = VAP / VCL$; LIN – линейность (линейность реальной траектории).

Для исследования подвижности сперматозоидов пробу разбавляют активирующей средой в соотношении 1:50. Состав активирующей среды: 10 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 10 mM трис HCl, pH 8,5. Для исследований допускаются образцы, подвижность которых превышает 90 %. Для предотвращения прилипания сперматозоидов предметные стекла обрабатываются 1%-ным сывороточным альбумином. В каждом видеоклипе оцениваются от 20 до 70 сперматозоидов. Сперматозоиды со скоростью менее 3 мкм/с считают неподвижными и исключают из расчета подвижности. По результатам полученных данных определяют величину стимулирующего действия физических факторов на показатели подвижности сперматозоидов.

Схема траекторий подвижности сперматозоидов представлена на рис. 2.

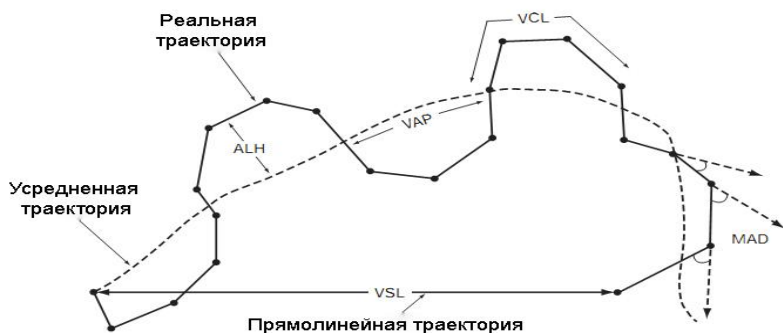


Рис. 2. Показатели подвижности сперматозоидов ленокского осетра

Результаты апробации метода оценки подвижности сперматозоидов осетровых рыб в условиях аквакультуры с использованием современных методов компьютерной диагностики представлены в табл. 1. В результате наших исследований было установлено, что средняя криволинейная скорость сперматозоидов (VCL) ленского осетра составила $(173,37 \pm 1,59)$ мкм/с, средняя прямолинейная скорость (VSL) – $(164,19 \pm 1,82)$ мкм/с, а средняя скорость движения по траектории (VAP) – $(171,22 \pm 1,20)$ мкм/с. Такой подробный анализ подвижности, в случае необходимости оценки массового количества сперматозоидов от племенных производителей рыб, позволяет формировать сперму по категориям подвижности, выделяя пробы с быстрым и прямолинейным движением; с медленным прямолинейным движением; с непрямолинейным движением и пробы с полностью неподвижными сперматозоидами. При этом появляется возможность выявлять умершие или умирающие «от старости» сперматозоиды на фоне здоровых, «молодых» сперматозоидов.

Таблица 1. Результаты измерений подвижности сперматозоидов осетровых рыб с использованием автоматизированного программного обеспечения MMC Сперм

Показатель подвижности	Среднее значение	Коэффициент вариации, %	Среднее квадратичное отклонение
VCL, мкм/с	$173,37 \pm 1,59$	2,9	5,05
VSL, мкм/с	$164,19 \pm 1,82$	3,5	5,76
VAP, мкм/с	$171,22 \pm 1,20$	2,2	3,81
WOB	$0,99 \pm 0,01$	2,7	0,02
LIN	$0,95 \pm 0,01$	3,5	0,03
STR	$0,96 \pm 0,10$	3,2	0,31

В наших исследованиях мы также определяли продолжительность подвижности сперматозоидов и зависимость средней криволинейной скорости от времени после активации водой (рис. 3).

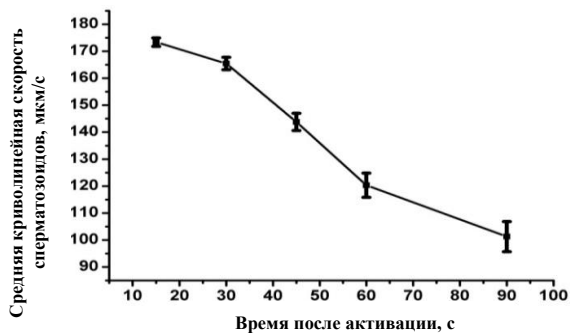


Рис. 3. Зависимость VCL от времени после активации водой

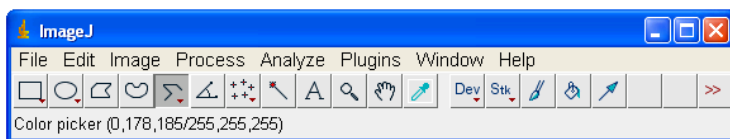
Как видно из данных, представленных на рис. 3, максимальные показатели средней криволинейной скорости у ленского осетра наблюдались в первые 30 с после активации водой. Данный показатель стремительно падал уже к 90 с после активации. После 90 с в наших исследованиях наблюдалось значительное уменьшение показателя VCL, а затем полное прекращение подвижности. Аналогичная зависимость от времени после активации наблюдалась при изучении показателя процента (доли) подвижных сперматозоидов. Поэтому в процессе искусственного оплодотворения икры ленского осетра (и в целом осетровых) очень важно соблюдать четкую последовательную технологическую цепочку и не допускать медлительности в действиях, начиная с момента запуска (разбавления спермы) до момента добавления осеменяющего раствора к икре. Наши результаты показали, что длительное осеменение икры (более 90 с) нецелесообразно, так как возможность успешного оплодотворения икры резко снижается. Учитывая высокую клеящую способность икры, которая наступает уже через 3–5 мин после оплодотворения, передержка икры в осеменяющем растворе опасна, в связи с тем, что может вызвать преждевременное приклеивание икры к поверхности осеменяющей емкости.

Для компьютерного анализа используют программу ImageJ, которую можно скачать:

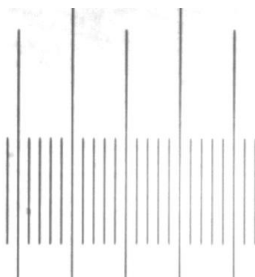
по веб-ссылке: [http:// imagej.nih.gov/ ij/download/ win32/ij148-jdk6-setup.exe](http://imagej.nih.gov/ij/download/win32/ij148-jdk6-setup.exe);

на сайте <http://imagej.nih.gov/ij>.

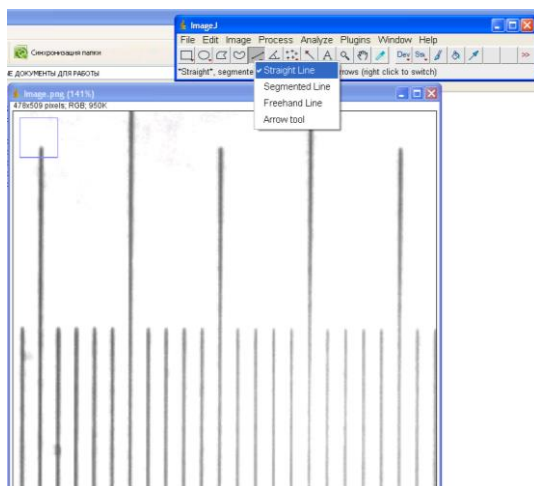
После установления открываем программу ImageJ.



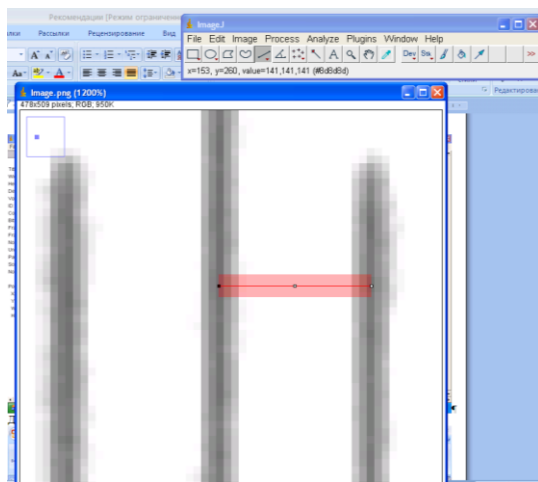
File/Open – открываем рисунок со специальной калибровочной шкалой для микроскопов, которая заранее фотографируется камерой микроскопа с использованием рабочего увеличения записи видеороликов.



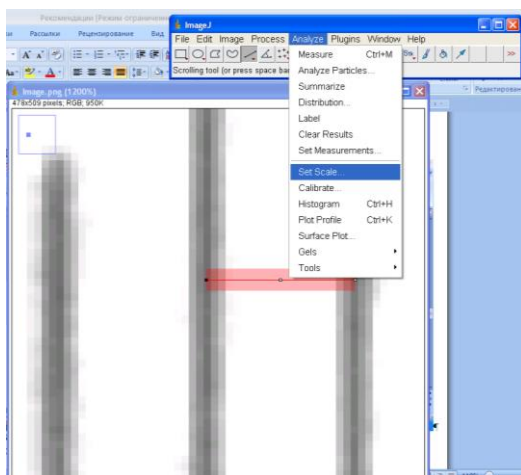
Снимок калибровочной шкалы важно делать в разрешении, одинаковом с разрешением видеоролика подвижности сперматозоидов. Далее выбираем инструмент «Straight Line».



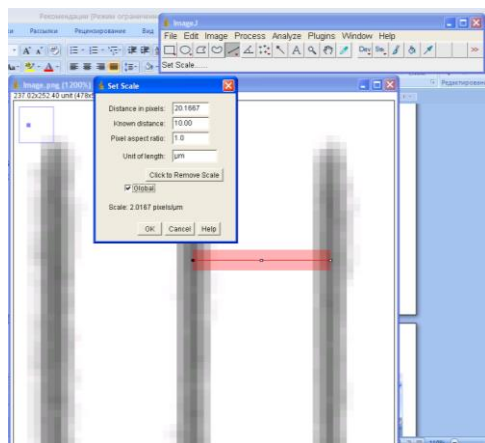
Измеряем шкалу деления в длину. Для точности измерений рисунок увеличиваем.



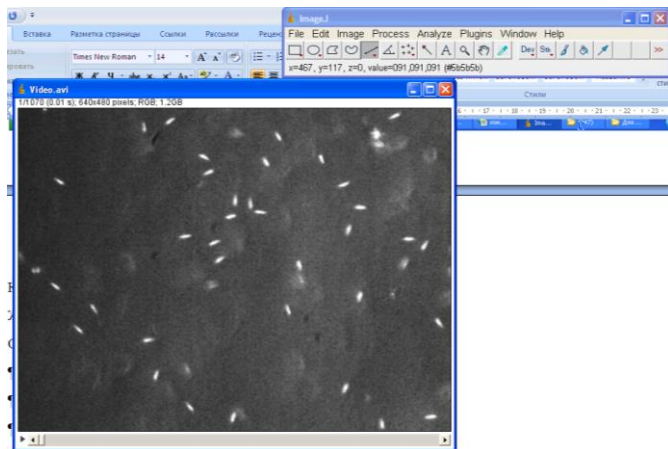
Далее данную длину необходимо откалибровать. Выбираем следующую функцию:



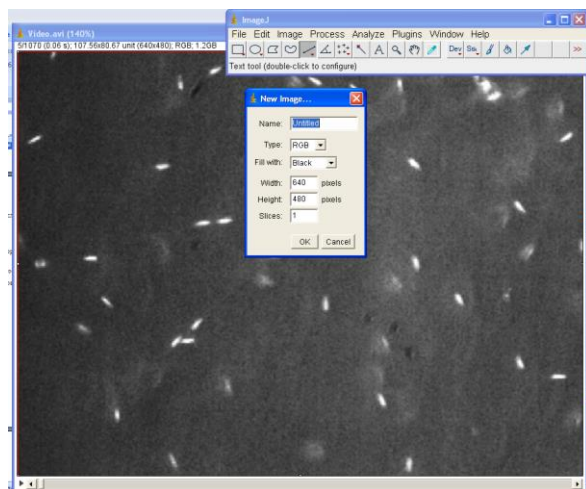
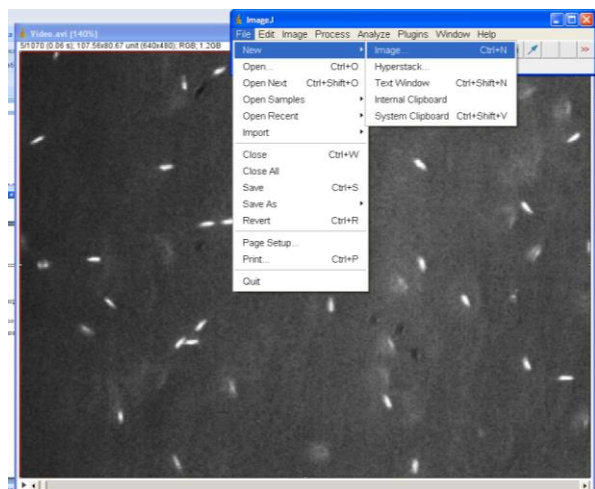
В графе Known distance (известная дистанция) указываем значение 10. В графе Unit of length (единица измерения длины) указываем значение мкм (микрометр). В строке Global необходимо поставить галочку для того, чтобы данные калибровки сохранялись при последующих измерениях. Значения калибровки подходят только для данного примера. Точное значение калибровки зависит от вида используемой калибровочной шкалы.



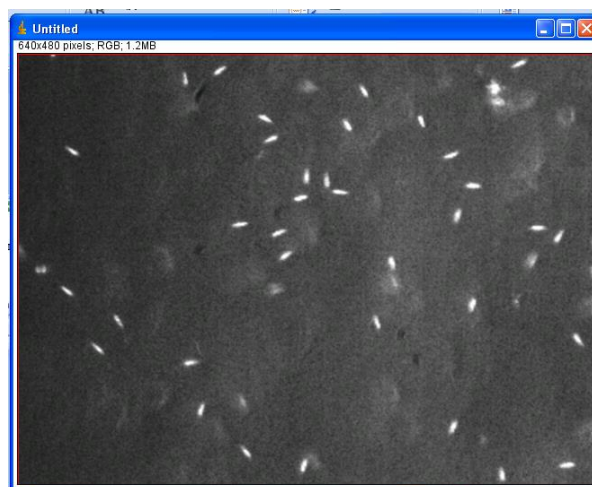
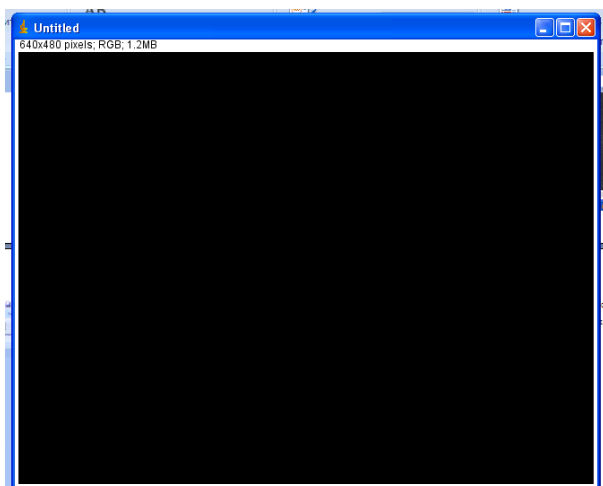
Далее открываем в программе ImageJ исследуемый видеоролик.



В меню видеоролика (внизу) стрелкой вправо проматываем ролик на 5 кадров. Информация о количестве кадров находится вверху ролика. Копируем изображение с ролика. Создаем новое изображение.



Разрешение изображения создаем одинаковое с разрешением видеоролика. В данном примере – 640×480. В открытое новое поле вставляем скопированное изображение.

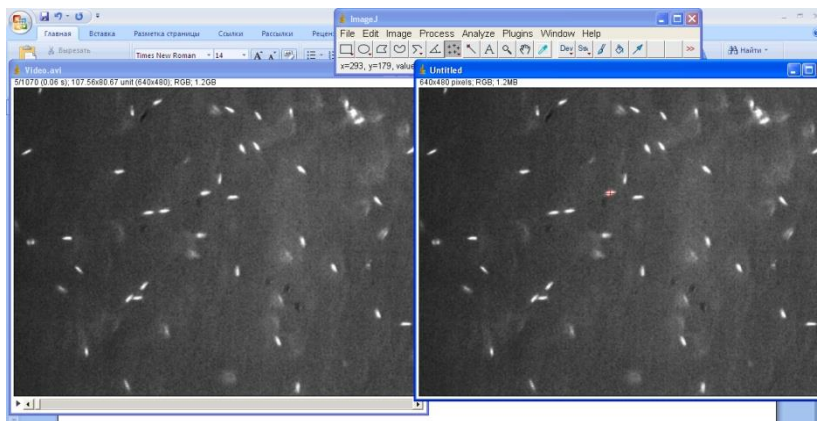


Слева видеоролик, справа начальное (с 5-го кадра) изображение – фото с видео.

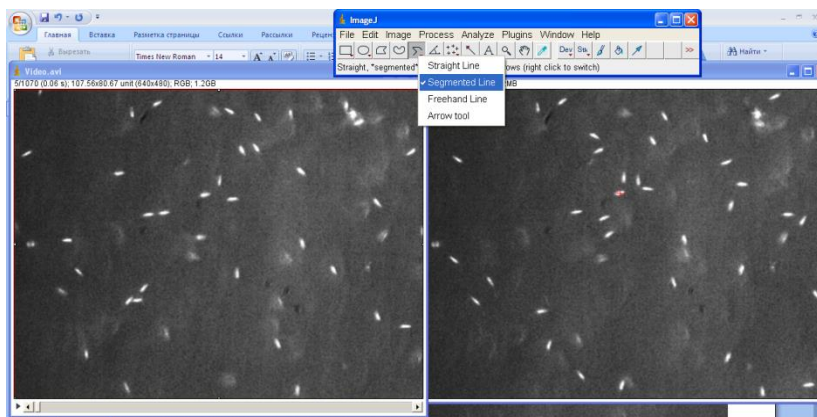
Далее начинаем исследования. Для этого необходимо выбрать инструмент «Multi-point».



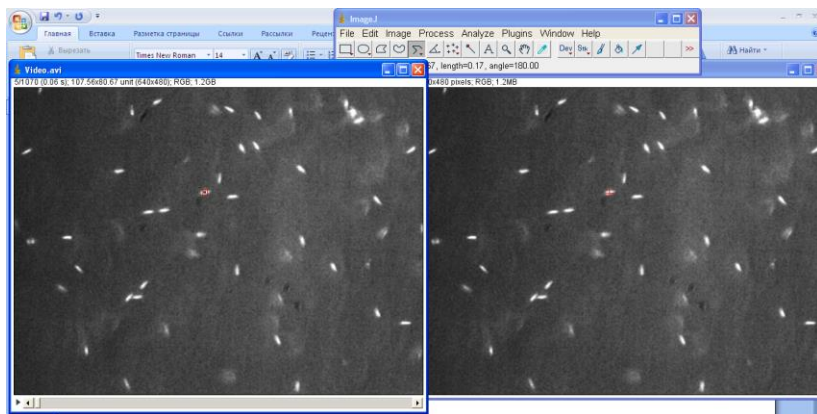
Справа выбираем сперматозоид, за которым будем наблюдать.



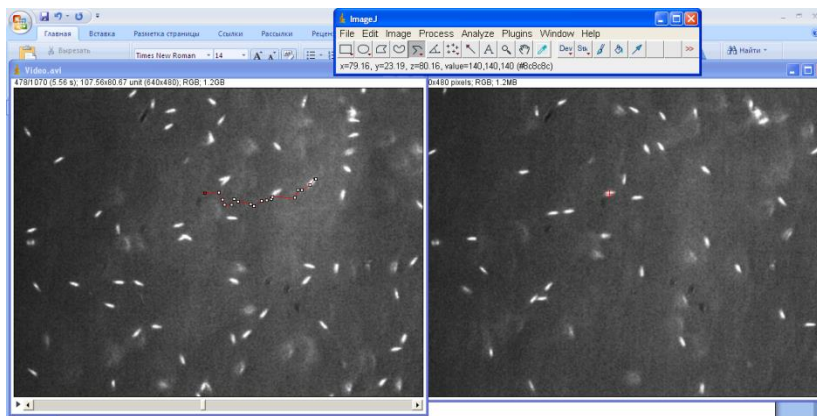
Выбираем инструмент «Segmented Line».



В левом окне ставим курсор на выбранный сперматозоид, кликаем (т. е. начинаем измерения).



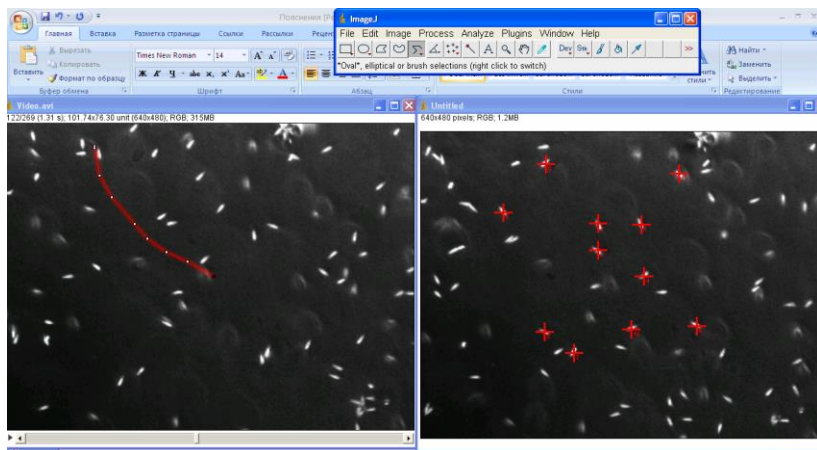
Не отводя курсор от сперматозоида, нажимаем клавишу «/». Данная клавиша запускает и останавливает видеореалик. Запускать и останавливать видеореалик необходимо очень быстро. После остановки видеореалика необходимо отметить точку перемещения сперматозоида, тем самым прорисовывая его траекторию.



Необходимо быть очень внимательным, так как некоторые сперматозоиды перемещаются очень быстро, а некоторые медленно. Процедуру запуска-остановки видеоролика и рисования траектории сперматозоида производят до момента выхода исследуемого сперматозоида из обзора или если сперматозоид медленно движется. После этого измерения в сегментируемой линейке останавливают нажатием правой кнопки мыши с последующим нажатием клавиши «М» (в английской раскладке). Далее появляется меню с измерениями, где значение 32,155 в колонке «Length» дает информацию о длине пройденного пути одним сперматозоидом в микрометрах (мкм), а значение 6,94 с, дает информацию о времени, потраченном на прохождение данной дистанции в секундах (с).

Results				
File Edit Font Results				
	Label	Area	Length	
1	Video.avi: 6.94 s	5.395	32.155	

Далее видеоролик возвращается на 5-й кадр и осуществляется аналогичная процедура измерения с другими сперматозоидами.



На примере, указанном сверху, справа точки с исследуемыми сперматозоидами (в данном примере их 10, в исследованиях должны быть отмечены все сперматозоиды). Слева траектории на видео. Траектории не сохраняются. Каждый раз рисуется новая траектория. В графе результатов накапливаются следующие сведения:

Results			
File	Edit	Font	Results
	Label	Area	Length
1	Video.avi:0.31 s	2.729	17.163
2	Video.avi:0.73 s	6.722	42.158
3	Video.avi:1.08 s	9.375	58.939
4	Video.avi:0.32 s	3.209	20.390
5	Video.avi:1.18 s	11.321	71.146
6	Video.avi:2.89 s	2.527	15.799
7	Video.avi:0.58 s	5.433	34.073
8	Video.avi:0.18 s	1.592	9.964
9	Video.avi:0.63 s	6.596	41.410
10	Video.avi:0.63 s	6.596	41.410
11	Video.avi:2.77 s	0.682	0.318
12	Video.avi:1.87 s	20.924	14.468
13	Video.avi:1.85 s	15.693	10.804
14	Video.avi:1.51 s	1.819	1.112

Результаты могут легко экспортироваться в другие программы для последующей статистической обработки.

5.2. Компьютерный анализ подвижности сперматозоидов ленского осетра в аквакультуре

В большинстве случаев, сперма, получаемая у рыб в условиях технологии искусственного воспроизводства, находится в неподвижном состоянии. Однако при добавлении обычной воды, в которой осуществляется выращивание и содержание рыб, сперматозоиды приобретают подвижность.

Простота получения, относительная доступность и массовость сперматозоидов животных и рыб делают их популярными объектами в биологических, ветеринарных и сельскохозяйственных исследованиях при изучении механизмов искусственного оплодотворения. Применение компьютерного анализа при исследовании качества спермы животных и рыб позволяет стандартизировать методику таких исследований и минимизировать субъективизм и человеческий фактор в процессе получения новых научных результатов.

Результаты исследований подвижности сперматозоидов ленского осетра в аквакультуре с использованием автоматизированного программного обеспечения представлены в табл. 2 и на рис. 4.

Таблица 2. Результаты измерений подвижности сперматозоидов ленского осетра с использованием автоматизированного программного обеспечения MMC Сперм

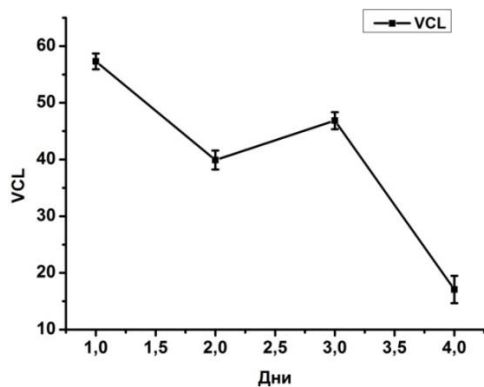
Показатель	День 1		День 2		День 3		День 4	
	<i>Mean</i> ± <i>SE</i>	<i>C_v</i> , %	<i>Mean</i> ± <i>SE</i>	<i>C_v</i> , %	<i>Mean</i> ± <i>SE</i>	<i>C_v</i> , %	<i>Mean</i> ± <i>SE</i>	<i>C_v</i> , %
VCL, мкм/с	57,30±1,39	0,30	39,90±1,67	0,50	46,85±1,50	0,31	17,08±2,42	1,02
VCL (A), мкм/с	60,93±1,01	0,20	50,68±0,96	0,19	52,00±0,84	0,15	52,29±5,03	0,53
Подвижность, %	84,80±4,02	0,08	92,62±3,43	0,06	57,58±4,67	0,14	26,02±11,09	0,73
Подвижность (A), %	90,80±5,93	0,11	73,54±2,24	0,05	73,88±14,47	0,33	26,31±14,55	0,95

Примечание. Здесь и далее *Mean* – среднее значение; *SE* – стандартная ошибка среднего; *C_v* – коэффициент вариации.

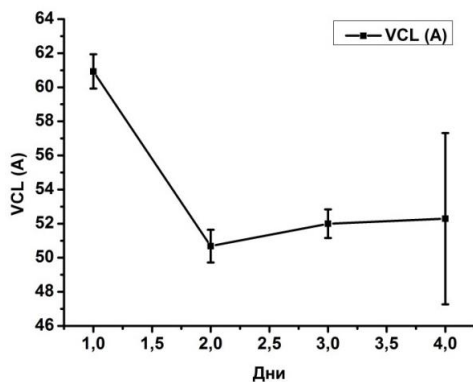
Значения общей средней криволинейной скорости (VCL), а также общей подвижности сперматозоидов на 1 день после сцеживания спермы составили (57,30 ± 1,39) мкм/с и (84,80 ± 4,02) % соответственно. Обращает на себя внимание высокий коэффициент вариации у значения VCL уже через 1 день после хранения. Это объясняется тем, что при регистрации общей средней криволинейной скорости учитываются сперматозоиды всех категорий,двигающиеся поступательно, зигзагообразно и колебательно. Однако непосредственно в оплодотворении принимают участие сперматозоиды, относящиеся к категории A, имеющие

высокую скорость поступательных движений,двигающиеся стремительно, преимущественно по линейной траектории. По этой причине высокий интерес представляет оценка подвижности сперматозоидов категории А.

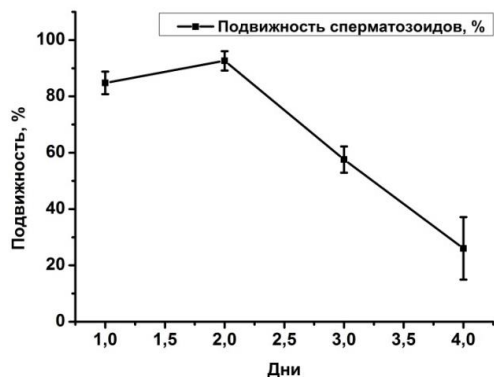
Значения средней криволинейной скорости сперматозоидов категории А (VCL (A)), а также средней подвижности сперматозоидов категории А на 1 день после сцеживания спермы составили $(60,93 \pm 1,01)$ мкм/с и $(90,80 \pm 5,93)$ % соответственно.



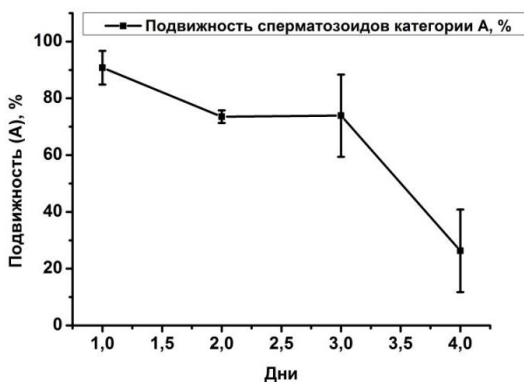
a



б



а



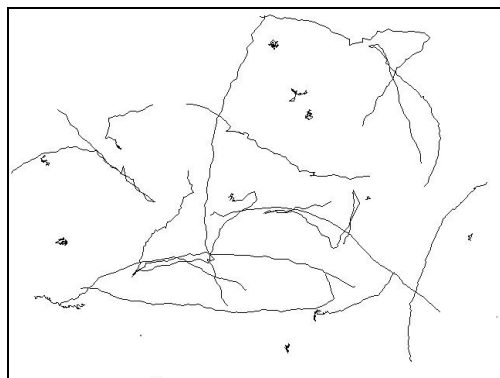
б

Рис. 4. Динамика изменений общей среднелинейной скорости (а), среднелинейной скорости сперматозоидов категории А (б), общей подвижности сперматозоидов (в), среднелинейной скорости сперматозоидов категории А (г)

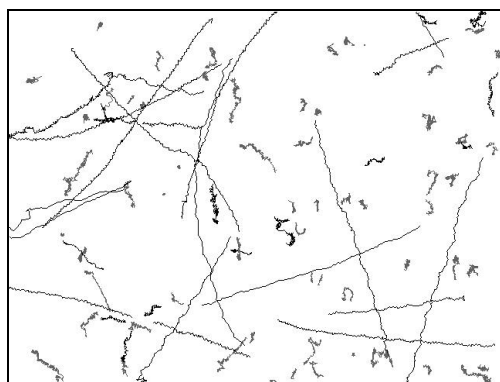
В дальнейшем, в процессе хранения спермы, показатели подвижности прогнозируемо снижались. Однако необходимо отметить следующие выявленные закономерности. На фоне ежедневного снижения показателей VCL значения показателя VCL (А), начиная с 2-го дня, остаются без изменений и даже недостоверно увеличиваются. Это объясняется тем, что при регистрации VCL учитываются сперматозоиды всех кате-

горий, у которых в течение хранения значительно снижались показатели подвижности, что сказывалось на результатах средних значений VCL. При регистрации значений VCL (A) учитываются только результаты подвижности сперматозоидов категории А, которые характеризуются повышенной подвижностью и длительным сроком хранения.

Визуальную оценку подвижности сперматозоидов ленского осетра и изменения подвижности в процессе хранения можно осуществить при изучении траекторий движения, сформированных программой CASA на базе платформы ImageJ рис. 5.



a



б

Рис. 5. Траектории движения сперматозоидов ленского осетра через 1 (*a*) и 4 (*б*) дня после сцеживания

Как видно из представленных рисунков, через 1 день после сцеживания траектории сперматозоидов представляют собой прямые протяженные линии (рис. 5, *а*), при этом присутствуют единичные траектории малоподвижных сперматозоидов. Через 4 дня после сцеживания (рис. 5, *б*) появляются многочисленные траектории малоподвижных сперматозоидов. У линейно двигающихся траекторий появляется большое количество незначительных так называемых «помех» или отклонений от линейной траектории.

Такой подробный анализ подвижности в случае необходимости оценки массового количества сперматозоидов от племенных производителей рыб позволяет формировать сперму по категориям подвижности, выделяя пробы с быстрым и прямолинейным движением; пробы с медленным прямолинейным движением; пробы с непрямолинейным движением и пробы с полностью неподвижными сперматозоидами. При этом появляется возможность выявлять умершие или умирающие «от старости» сперматозоиды на фоне здоровых, «молодых» сперматозоидов.

5.3. Влияние различной концентрации разбавления спермы сибирского осетра на качественные и количественные показатели сперматозоидов в течение краткосрочного хранения

В результате проведенных исследований нами было установлено, что разбавление спермы сибирского осетра способно оказывать влияние на качественные и количественные показатели сперматозоидов в период краткосрочного хранения (табл. 3).

Общая средняя криволинейная скорость сперматозоидов (VCL). Через сутки после сцеживания в контрольной группе, сперма которой не подвергалась разбавлению, общая средняя криволинейная скорость сперматозоидов (VCL) составила $(41,5 \pm 1,33)$ мкм/с. Достоверно выше ($p < 0,05$) общая средняя криволинейная скорость сперматозоидов была в опытных группах 30 и 10 с достижением максимального значения $(57,30 \pm 1,39)$ мкм/с, в опытной группе 1 (рис. 6, *а*). В дальнейшем значения VCL в исследуемых группах плавно снижаются в течение срока хранения. Однако подвижность сперматозоидов в контрольной группе и в опытной группе 50 через 2 дня после сцеживания резко сократилась и достигла нулевых значений.

Через 2 дня после сцеживания максимальные значения VCL наблюдались в опытной группе 1 и достигали $(54,61 \pm 0,98)$ мкм/с достоверно отличаясь ($p < 0,05$) от опытной группы 30 и опытной группы 10 (рис. 6, *б*).

Через 3 дня после сцеживания нами был обнаружен интересный факт: в опытной группе 1 подвижные сперматозоиды отсутствовали.

При этом такая закономерность наблюдалась во всех повторностях.

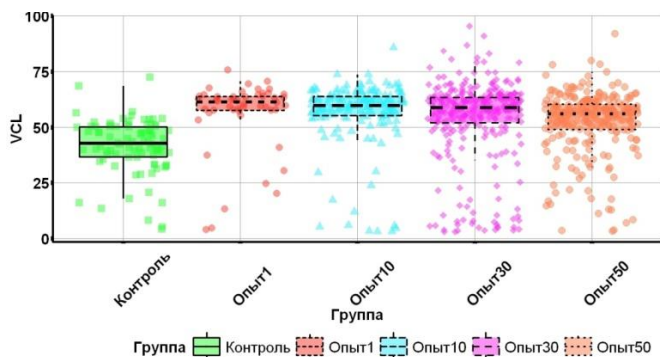
Данный обнаруженный факт требует отдельного изучения.

Таблица 3. Изменение подвижности сперматозоидов сибирского осетра в зависимости от разбавления и срока хранения

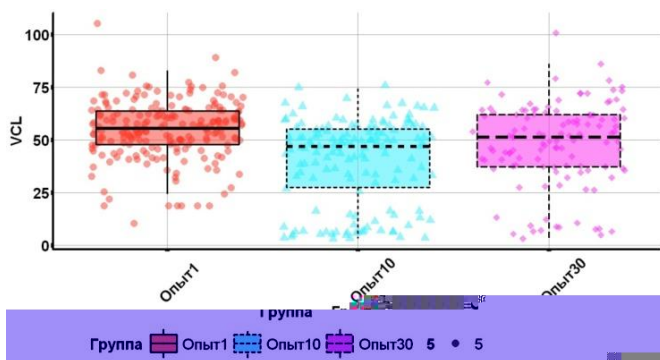
Показатель	День 1		День 2		День 3		День 4	
	<i>Mean</i> ± <i>SE</i>	<i>C_v</i> , %	<i>Mean</i> ± <i>SE</i>	<i>C_v</i> , %	<i>Mean</i> ± <i>SE</i>	<i>C_v</i> , %	<i>Mean</i> ± <i>SE</i>	<i>C_v</i> , %
Разбавление 0								
VCL, мкм/с	41,50 ± 1,33	0,29	–	–	–	–	–	–
VCL (A), мкм/с	44,54 ± 1,05	0,20	–	–	–	–	–	–
Подвижность, %	15,60 ± 3,59	0,39	–	–	–	–	–	–
Подвижность (A), %	86,02 ± 4,66	0,09	–	–	–	–	–	–
Разбавление 1:1								
VCL, мкм/с	52,38 ± 0,89	0,27	–	–	–	–	–	–
VCL (A), мкм/с	55,54 ± 0,61	0,16	–	–	–	–	–	–
Подвижность, %	60,96 ± 6,40	0,18	–	–	–	–	–	–
Подвижность (A), %	88,93 ± 5,65	0,11	–	–	–	–	–	–
Разбавление 1:3								
VCL, мкм/с	54,38 ± 1,07	0,36	48,11 ± 1,83	0,41	47,36 ± 2,57	0,29	31,00 ± 5,62	0,62
VCL (A), мкм/с	59,60 ± 0,74	0,21	54,70 ± 1,34	0,24	51,41 ± 1,87	0,18	45,72 ± 2,70	0,15
Подвижность, %	81,33 ± 6,33	0,13	71,26 ± 12,40	0,30	12,96 ± 6,67	0,89	15,38 ± 15,38	1,73
Подвижность (A), %	87,37 ± 5,71	0,11	83,83 ± 6,32	0,13	56,74 ± 29,25	0,89	20,11 ± 19,11	1,64
Разбавление 1:10								
VCL, мкм/с	57,30 ± 1,39	0,30	39,90 ± 1,67	0,50	46,85 ± 1,50	0,31	17,08 ± 2,42	1,02
VCL (A), мкм/с	60,93 ± 1,01	0,20	50,68 ± 0,96	0,19	52,00 ± 0,84	0,15	52,29 ± 5,03	0,53
Подвижность, %	84,80 ± 4,02	0,08	92,62 ± 3,43	0,06	57,58 ± 4,67	0,14	26,02 ± 11,09	0,73
Подвижность (A), %	90,80 ± 5,93	0,11	73,54 ± 2,24	0,05	73,88 ± 14,47	0,33	26,31 ± 14,55	0,95
Разбавление 1:100								
VCL, мкм/с	55,76 ± 2,31	0,29	54,61 ± 0,98	0,25	–	–	–	–
VCL (A), мкм/с	60,55 ± 1,15	0,12	56,58 ± 0,83	0,20	–	–	–	–
Подвижность, %	67,10 ± 10,02	0,25	18,45 ± 14,24	1,33	–	–	–	–
Подвижность (A), %	88,63 ± 5,87	0,11	33,15 ± 32,15	1,67	–	–	–	–

В этот период максимальные значения VCL наблюдались у опытной группы 30 и составили $(47,36 \pm 2,57)$ мкм/с, однако достоверных отличий между оставшимися исследуемыми группами не наблюдалось (рис. 6, в).

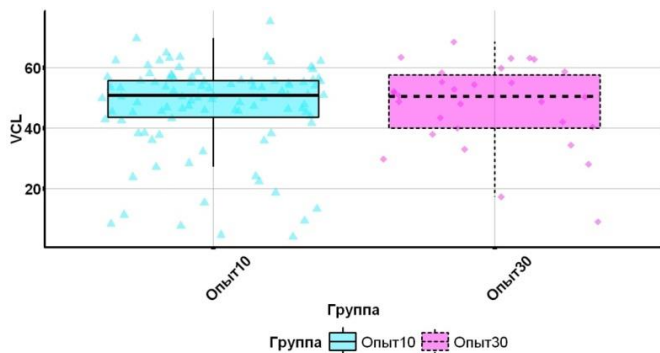
Через 4 дня после сцеживания достоверные ($p < 0,05$) максимальные значения VCL наблюдались у опытной группы 30 и составили $(31,00 \pm 5,62)$ мкм/с (рис. 6, г).



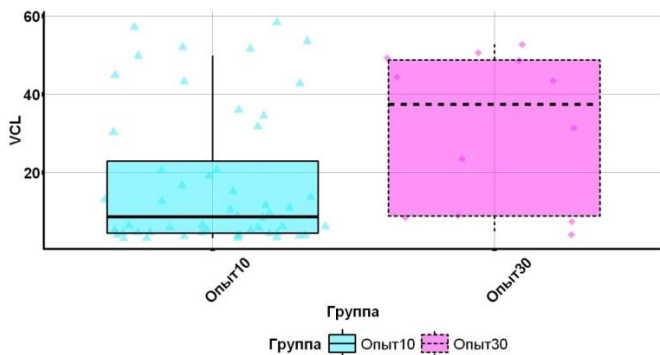
а



б



6



2

Рис. 6. Совмещенная диаграмма одномерного рассеяния и размахов изменения общей средней криволинейной скорости сперматозоидов в зависимости от величины разбавления спермы. Здесь и далее прямоугольник диаграммы размахов обозначает медиану, а также 0,25 и 0,75 квантиль

Средняя криволинейная скорость сперматозоидов категории А (VCL (А)). Выше рассматривался показатель, который фиксируется у сперматозоидов всех категорий,двигающихся поступательно, зигзагообразно и колебательно. Однако непосредственно в оплодотворении принимают участие сперматозоиды, относящиеся к категории А, имеющие высокую скорость поступательных движений,двигающихся стремительно, преимущественно по линейной траектории. По этой

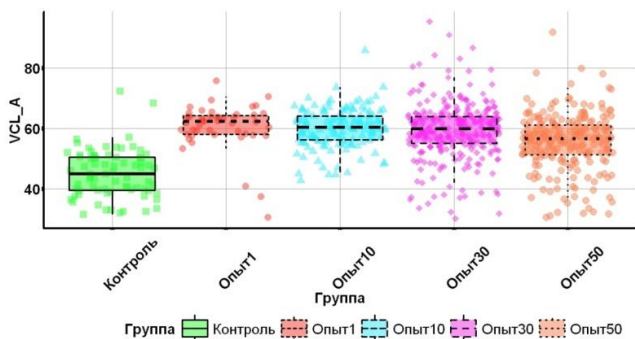
причине высокий интерес имеет оценка спермы по средней криволинейной скорости сперматозоидов категории А.

Через сутки после сцеживания в контрольной группе, сперма которой не подвергалась разбавлению, средняя криволинейная скорость сперматозоидов категории А составила $(44,54 \pm 1,05)$ мкм/с. Достоверно выше ($p < 0,05$) общая средняя криволинейная скорость сперматозоидов была в опытных группах 30, 1 и 10 с достижением максимального значения $(60,93 \pm 1,01)$ мкм/с (рис. 7, а). В дальнейшем значения VCL (А) в исследуемых группах плавно снижались в течение срока хранения. Однако, как было указано выше, подвижность всех сперматозоидов в контрольной группе и в опытной группе 50 через 2 дня после сцеживания резко сократилась и достигла нулевых значений.

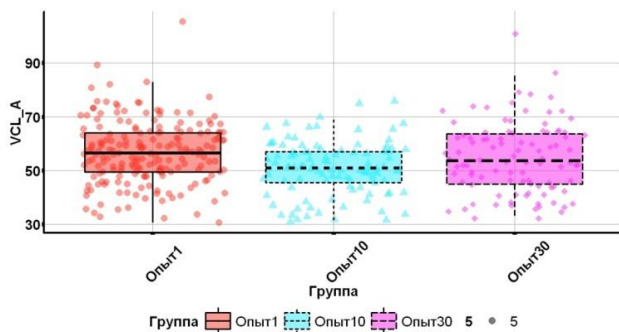
Через 2 дня после сцеживания максимальные значения VCL (А) наблюдались в опытной группе 1 и достигали $(56,58 \pm 0,83)$ мкм/с, недостоверно отличаясь ($p > 0,05$) от опытной группы 30 и опытной группы 10 (рис. 7, б).

Через 3 дня после сцеживания максимальные значения VCL (А) наблюдались у опытной группы 10 и составили $(52,00 \pm 0,84)$ мкм/с, однако достоверных отличий между оставшимися исследуемыми группами не наблюдалось (рис. 7, в).

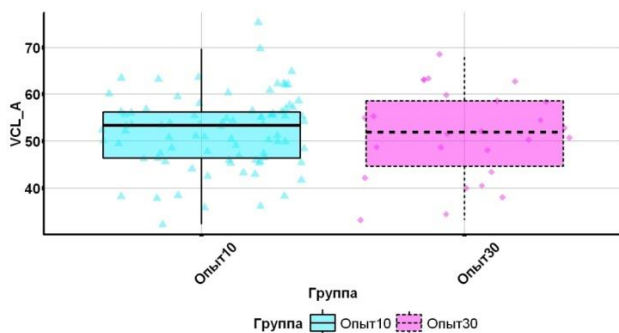
Через 4 дня после сцеживания недостоверные ($p > 0,05$) максимальные значения VCL (А) наблюдались у опытной группы 10 и составили $(52,29 \pm 5,03)$ мкм/с (рис. 7, г), что было выше по отношению к предыдущему дню хранения. Этот факт объясняется тем, что слабые сперматозоиды, которые на 3-й день после сцеживания входили в статистику показателя VCL (А) к 4-му дню погибли, оставив только сперматозоиды с повышенной подвижностью. Поэтому мы наблюдали данное повышение.



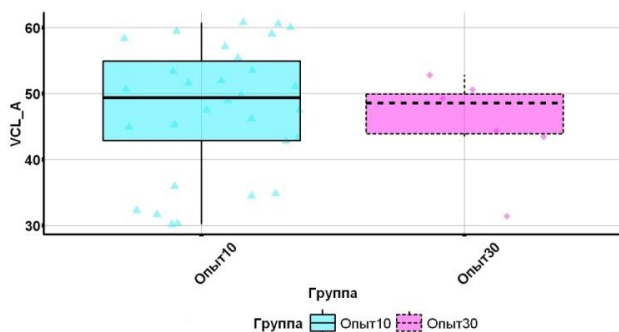
а



б



в



г

Рис. 7. Совмещенная диаграмма одномерного рассеяния и размахов изменения средней криволинейной скорости сперматозоидов категории А в зависимости от величины разбавления спермы

Процент общей подвижности сперматозоидов. Наряду со скоростью подвижности сперматозоидов, особенно в условиях высокой продуктивности самок и разбавления водой, процент подвижности (количество подвижных) сперматозоидов является важным показателем.

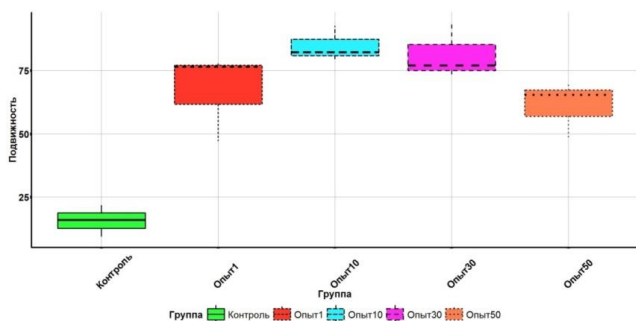
Через сутки после сцеживания в контрольной группе, сперма которой не подвергалась разбавлению, средний процент общей подвижности сперматозоидов составил $(15,60 \pm 3,59) \%$.

Достоверно выше ($p < 0,05$) средний процент общей подвижности сперматозоидов был в опытной группе 30, с достижением максимального значения $(84,8 \pm 4,02) \%$ в опытной группе 10 (рис. 8, а). В дальнейшем значения процента общей подвижности в исследуемых группах плавно снижались в течение срока хранения. Однако, как было указано выше, подвижность всех сперматозоидов в контрольной группе и в опытной группе 50 через 2 дня после сцеживания резко сократилась и достигла нулевых значений.

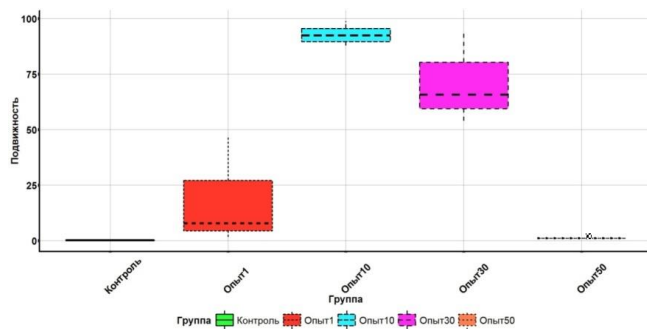
Через 2 дня после сцеживания максимальные значения среднего процента общей подвижности сперматозоидов наблюдались в опытной группе 10 и достигали $(92,62 \pm 3,43) \%$, достоверно отличаясь ($p < 0,05$) от опытной группы 30 и опытной группы 1 (рис. 8, б). Такое повышение процента общей подвижности, относительно 1-го дня после сцеживания также объясняется вышеназванными причинами.

Через 3 дня после сцеживания значения среднего процента общей подвижности сперматозоидов наблюдались у опытной группы 10 и составили $(57,58 \pm 4,67) \%$, достоверно отличаясь ($p < 0,05$) от оставшихся исследуемых групп (рис. 8, в).

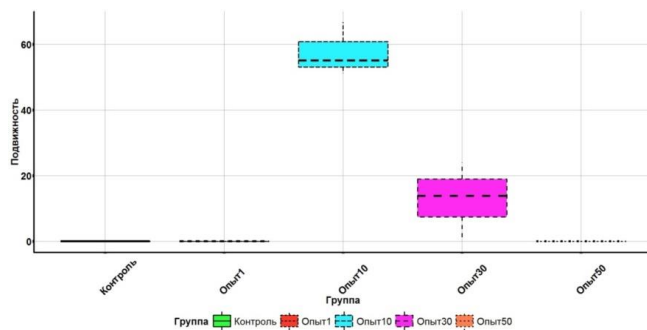
Через 4 дня после сцеживания недостоверные ($p > 0,05$) максимальные значения среднего процента общей подвижности сперматозоидов наблюдались у опытной группы 10 и составили $(26,02 \pm 11,09) \%$ (рис. 8, г).



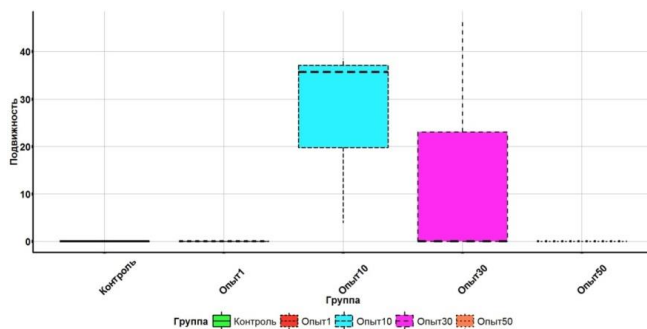
а



б



в



г

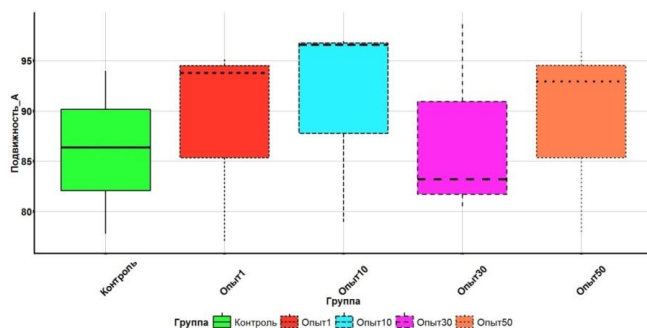
Рис. 8. Диаграмма размахов изменения средней общей подвижности сперматозоидов в зависимости от величины разбавления спермы

Процент подвижности сперматозоидов категории А. Через сутки после сцеживания в контрольной группе, сперма которой не подвергалась разбавлению, средний процент подвижности сперматозоидов категории А составил $(86,02 \pm 4,66) \%$ от всего количества подвижных сперматозоидов. Недостоверно выше ($p > 0,05$) средний процент общей подвижности сперматозоидов категории А был в опытной группе 30, с достижением максимального значения $(90,80 \pm 5,93) \%$ в опытной группе 10 (рис. 9, а). В дальнейшем значения процента подвижности сперматозоидов категории А в исследуемых группах плавно снижались в течение срока хранения. Однако, как было указано выше, подвижность всех сперматозоидов в контрольной группе и в опытной группе 50 через 2 дня после сцеживания резко сократилась и достигла нулевых значений.

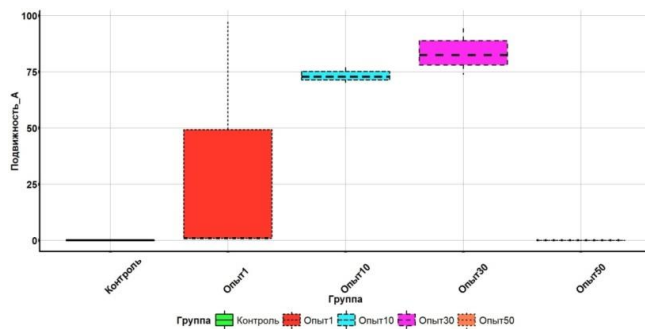
Через 2 дня после сцеживания максимальные значения среднего процента подвижности сперматозоидов категории А наблюдались в опытной группе 30 и достигали $(83,83 \pm 6,32) \%$, недостоверно отличаясь ($p > 0,05$) от опытной группы 10 и достоверно отличаясь ($p < 0,05$) от опытной группы 1 (рис. 9, б).

Через 3 дня после сцеживания максимальные значения среднего процента подвижности сперматозоидов категории А наблюдались у опытной группы 10 и составили $(73,88 \pm 14,47) \%$, недостоверно отличаясь ($p > 0,05$) от оставшихся исследуемых групп (рис. 9, в).

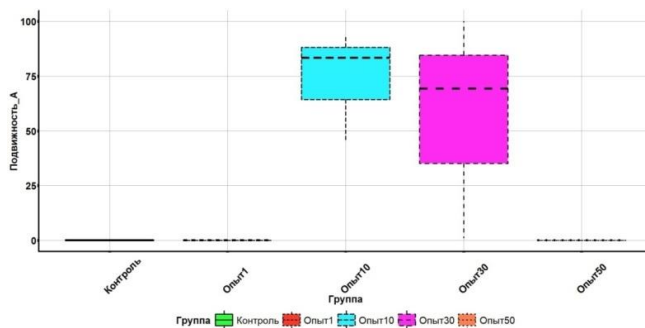
Через 4 дня после сцеживания недостоверные ($p > 0,05$) максимальные значения среднего процента подвижности сперматозоидов категории А наблюдались у опытной группы 10 и составили $(26,31 \pm 14,55) \%$ (рис. 9, г).



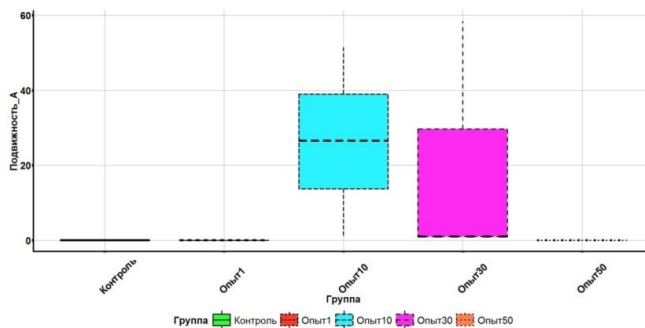
а



б



в



г

Рис. 9. Диаграмма размахов изменения средней подвижности сперматозоидов категории А в зависимости от величины разбавления спермы

Как показали приведенные выше результаты, величина разбавления спермы оказывает влияние на качественные и количественные показатели сперматозоидов в течение краткосрочного хранения. При этом наиболее высокие значения были зафиксированы для сперматозоидов, которые разбавляли в концентрации 1:10. Обращает на себя внимание важность определения не только общих показателей качества сперматозоидов, но и показателей, характеризующих сперматозоиды, относящиеся к категории А, у которых наиболее высокая вероятность участия в оплодотворении. Так, при изучении VCL и общего процента подвижности сперматозоидов лучшие показатели были продемонстрированы опытной группой 30. Тогда как при более углубленном изучении показателей VCL (А) средней подвижности сперматозоидов категории А лучшие показатели были продемонстрированы опытной группой 10.

В целом следует отметить, что разбавление спермы способно значительно увеличить срок краткосрочного хранения с 1 (в контрольной группе) до 4 дней (в опытных группах 10 и 30). Использование разбавления обеспечивает поддержание нормальной концентрации иона и осмотического давления на изотоническом уровне, которая предотвращает активацию спермы, обеспечивает защиту спермы от осмотического повреждения и загрязнителей и поддерживает необходимый уровень АТФ, требуемый для биения жгутиков. При прохладных температурах сперматозоиды имеют низкий метаболизм и могут содержаться в течение нескольких дней в соответствующих разбавителях спермы. Однако длительные холодные условия хранения могут значительно затронуть качество спермы, так как мощные микробные загрязнения могут уменьшить подвижность сперматозоидов и их жизнеспособность, что выразилось в наших исследованиях, когда срок краткосрочного хранения достигал только 4 дней.

5.4. Влияние консервирующих веществ на период краткосрочного хранения спермы осетровых рыб

Влияние борной кислоты. В результате проведенных исследований нами было установлено, что борная кислота оказывает выраженное действие на качественные и количественные показатели сперматозоидов сибирского осетра ленской популяции в течение краткосрочного хранения (табл. 4).

Таблица 4. Влияние борной кислоты на параметры подвижности сперматозоидов ленского осетра в период краткосрочного хранения в условиях *in vitro*

Группа	Дозировка борной кислоты, мг/л	VCL, мкм/с			VCL (A), мкм/с			Подвижность, %			Доля сперматозоидов (A), %		
		<i>Mean</i> ± <i>SE</i>	<i>C_v</i> , %	Объем выборки <i>n</i>	<i>Mean</i> ± <i>SE</i>	<i>C_v</i> , %	Объем выборки <i>n</i>	<i>Mean</i> ± <i>SE</i>	<i>C_v</i> , %	Объем выборки <i>n</i>	<i>Mean</i> ± <i>SE</i>	<i>C_v</i> , %	Объем выборки <i>n</i>
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
2-й день													
Контрольная	0	59,90 ± 0,52	0,13	238	60,13 ± 0,47	0,12	237	98,44 ± 1,15	0,02	3	99,71 ± 0,29	0,01	3
Опытная	125	61,76 ± 0,78	0,19	242	62,63 ± 0,65	0,16	238	97,52 ± 1,05	0,02	3	98,14 ± 1,41	0,02	3
Опытная	250	58,39 ± 0,67	0,17	223	59,42 ± 0,49	0,12	218	97,37 ± 0,11	0,00	3	97,80 ± 1,52	0,03	3
Опытная	500	57,11 ± 0,62***	0,15	210	57,55 ± 0,54***	0,13	208	96,65 ± 1,11	0,02	3	99,14 ± 0,44	0,01	3
Опытная	1000	50,12 ± 0,90***	0,22	162	51,81 ± 0,65***	0,15	155	90,77 ± 3,50	0,07	3	96,70 ± 1,66	0,03	3
3-й день													
Контрольная	0	56,11 ± 0,75	0,24	323	58,86 ± 0,45	0,13	304	99,15 ± 0,85	0,01	3	95,00 ± 1,82	0,03	3
Опытная	125	55,82 ± 0,66	0,18	228	57,30 ± 0,46	0,11	219	98,63 ± 0,85	0,02	3	95,87 ± 1,49	0,03	3
Опытная	250	56,47 ± 0,79	0,22	246	58,78 ± 0,49	0,12	233	97,68 ± 0,55	0,01	3	94,87 ± 1,93	0,04	3
Опытная	500	48,61 ± 0,96***	0,36	344	55,68 ± 0,47***	0,14	288	97,94 ± 0,58	0,01	3	83,28 ± 6,49	0,14	3
Опытная	1000	39,61 ± 0,95***	0,30	159	44,31 ± 0,58***	0,14	130	91,28 ± 1,35	0,03	3	82,20 ± 6,02	0,13	3
4-й день													
Контрольная	0	54,50 ± 1,22	0,31	199	59,83 ± 0,68	0,15	176	85,06 ± 9,97	0,20	3	88,64 ± 1,45	0,03	3
Опытная	125	53,11 ± 0,94***	0,29	267	57,17 ± 0,65***	0,18	239	95,89 ± 1,20	0,02	3	88,87 ± 2,62	0,05	3
Опытная	250	53,93 ± 1,26	0,32	196	59,38 ± 0,87	0,19	170	97,23 ± 1,70	0,03	3	81,68 ± 8,31	0,18	3
Опытная	500	53,20 ± 1,01*	0,24	169	55,82 ± 0,69***	0,15	158	92,27 ± 4,09	0,08	3	92,74 ± 1,747082	0,03	3
Опытная	1000	47,41 ± 1,48***	0,25	66	50,65 ± 0,96***	0,15	59	81,49 ± 1,00	0,02	3	89,39 ± 1,51	0,02	3
5-й день													
Контрольная	0	34,91 ± 2,51	0,43	37	44,06 ± 1,83	0,20	24	23,27 ± 23,27	1,73	3	21,62 ± 21,62	1,73	3
Опытная	125	48,34 ± 1,58***	0,39	145	55,10 ± 1,10***	0,22	121	66,93 ± 13,44	0,35	3	86,85 ± 4,23	0,08	3
Опытная	250	53,61 ± 1,52***	0,31	122	58,51 ± 0,88***	0,16	109	79,65 ± 9,10*	0,20	3	89,37 ± 0,51*	0,01	3

Продолжение табл. 4

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Опытная	500	45,97 ± 2,31***	0,51	107	58,18 ± 1,24***	0,19	81	62,00 ± 21,75*	0,61	3	71,04 ± 5,54*	0,14	3
Опытная	1000	47,65 ± 1,86*	0,32	59	51,01 ± 1,42	0,20	53	53,37 ± 25,44	0,83	3	83,16 ± 8,69	0,18	3
6-й день													
Контрольная	0	35,31 ± 4,34	0,55	20	39,89 ± 4,63	0,46	16	33,33±33,33	1,73	3	25,93 ± 25,93	1,73	3
Опытная	125	47,17 ± 1,51*	0,42	175	54,99 ± 0,95**	0,21	144	67,37±4,73	0,14	3	82,35±3,86	0,09	3
Опытная	250	44,85 ± 1,65	0,46	163	55,71 ± 0,88**	0,17	122	87,57 ± 3,73	0,07	3	77,92 ± 9,67	0,21	3
Опытная	500	49,08 ± 1,81**	0,41	127	57,17±1,02***	0,18	105	57,27 ± 29,77	0,90	3	55,37 ± 27,71	0,87	3
Опытная	1000	41,75 ± 1,86	0,32	52	45,89 ± 1,61	0,23	43	48,91 ± 24,46	0,87	3	52,02 ± 26,50	0,88	3
7-й день													
Контрольная	0	25,45 ± 3,52	0,63	21	34,15 ± 6,13	0,57	10	24,36 ± 24,36	1,73	3	14,04 ± 14,04	1,73	3
Опытная	125	40,38 ± 1,53***	0,53	195	52,81 ± 0,88**	0,19	137	76,54 ± 11,94	0,27	3	70,16 ± 0,39	0,01	3
Опытная	250	38,54 ± 1,55*	0,52	173	51,13 ± 1,00**	0,21	115	63,88 ± 8,71	0,24	3	68,40 ± 5,84	0,15	3
Опытная	500	40,64 ± 2,20***	0,56	110	54,74 ± 1,26**	0,20	75	78,71 ± 8,50	0,15	3	66,97 ± 6,36	0,13	3
Опытная	1000	35,84 ± 1,98	0,45	68	46,85 ± 1,25	0,17	42	48,35 ± 15,55	0,56	3	39,44 ± 21,35	0,94	3
8-й день													
Контрольная	0	19,69 ± 5,23	0,88	11	24,30 ± 10,95	1,01	5	3,75 ± 3,75	1,73	3	11,11 ± 11,11	1,73	3
Опытная	125	37,23 ± 2,85	0,61	64	53,56 ± 1,70*	0,20	39	60,72 ± 8,72	0,20	3	64,36 ± 15,64	0,34	3
Опытная	250	49,17 ± 4,63**	0,41	19	51,35 ± 4,33	0,36	18	50,00 ± 28,87	1,00	3	62,50 ± 31,45	0,87	3
Опытная	500	39,43 ± 2,62*	0,53	64	50,63 ± 1,91	0,25	45	42,13 ± 21,44*	0,88	3	42,59 ± 21,83	0,89	3
Опытная	1000	33,45 ± 2,53	0,42	32	43,73 ± 2,06	0,20	18	38,53 ± 1,95	0,07	3	54,51 ± 27,84	0,72	3
9-й день													
Контрольная	0	00,00 ± 0,00	0,00	—	0,00 ± 0,00	—	—	0,00 ± 0,00	—	3	0,00 ± 0,00	—	3
Опытная	125	38,65 ± 3,12*	0,56	48	50,63 ± 2,37*	0,27	33	31,37 ± 18,42*	1,02	3	48,29 ± 24,53*	0,88	3
Опытная	250	38,34 ± 2,29*	0,42	50	45,97 ± 1,95*	0,25	35	53,27 ± 26,70*	0,87	3	36,50 ± 23,17*	1,10	3
Опытная	500	25,70 ± 2,09*	0,55	47	37,33 ± 2,43*	0,29	20	31,54 ± 16,10*	0,88	3	32,04 ± 17,438*	0,94	3
Опытная	1000	31,51 ± 5,45*	0,62	13	36,42 ± 6,26*	0,54	10	28,21 ± 28,20*	1,73	3	24,24 ± 24,24*	1,73	3
10-й день													
Контрольная	0	00,00 ± 0,00	0,00	—	0,00 ± 0,00	—	—	0,00 ± 0,00	—	3	0,00 ± 0,00	—	3
Опытная	125	14,96 ± 2,63*	1,02	34	35,19 ± 5,84*	0,47	8	28,99 ± 16,30*	0,97	3	18,18 ± 13,89*	1,32	3

Опытная	250	35,53 ± 4,39*	0,66	29	50,37 ± 3,15*	0,27	19	47,22 ± 23,73*	0,87	3	45,83 ± 23,20*	0,87	3
Опытная	500	31,14 ± 2,38*	0,70	85	49,06 ± 1,62*	0,22	45	56,16 ± 28,09*	0,87	3	31,94 ± 17,07*	0,92	3
Опытная	1000	17,92 ± 2,42*	0,75	31	26,45 ± 5,81*	0,62	8	25,44 ± 25,44*	1,73	3	6,90 ± 6,90*	1,73	3
11-й день													
Контрольная	0	00,00 ± 0,00	0,00	—	0,00 ± 0,00	—	—	0,00 ± 00,00	—	3	0,00 ± 0,00	—	3
Опытная	125	00,00 ± 0,00	0,00	—	0,00 ± 0,00	—	—	0,00±00,00	—	3	0,00 ± 0,00	—	3
Опытная	250	32,80 ± 3,32*	0,59	35	42,37 ± 3,74*	0,41	22	14,47 ± 14,47*	1,73	3	20,20 ± 20,20*	1,73	3
Опытная	500	35,00 ± 3,00*	0,47	31	44,12 ± 3,18*	0,31	19	35,29 ± 17,73*	0,87	3	37,96 ± 20,10*	0,92	3
Опытная	1000	27,02 ± 2,42*	0,75	5	36,52 ± 1,11*	0,04	2	40,00 ± 19,53*	0,90	3	40,00 ± 19,53*	0,90	3
12-й день													
Контрольная	0	00,00 ± 0,00	0,00	—	0,00 ± 0,00	—	—	0,00 ± 00,00	—	3	0,00 ± 0,00	—	3
Опытная	125	00,00 ± 0,00	0,00	—	0,00 ± 0,00	—	—	0,00 ± 00,00	—	3	0,00 ± 0,00	—	3
Опытная	250	16,92 ± 7,43*	1,16	7	20,71 ± 12,05*	1,16	4	6,94 ± 6,94*	1,73	3	13,33 ± 13,33*	1,73	3
Опытная	500	26,59 ± 4,45*	0,66	16	36,45 ± 5,45*	0,45	9	30,43 ± 15,22*	0,87	3	34,85 ± 17,47*	0,87	3
Опытная	1000	27,13 ± 4,57*	0,63	14	31,78 ± 5,41*	0,54	10	5,97 ± 5,97*	1,73	3	22,22 ± 22,22*	1,73	3
13-й день													
Контрольная	0	00,00 ± 0,00	0,00	—	0,00 ± 0,00	—	—	0,00 ± 00,00	—	3	0,00 ± 0,00	—	3
Опытная	125	00,00 ± 0,00	0,00	—	0,00 ± 0,00	—	—	0,00 ± 0,00	—	3	0,00 ± 0,00	—	3
Опытная	250	00,00 ± 0,00	0,00	—	0,00 ± 0,00	—	—	0,00 ± 0,00	—	3	0,00 ± 0,00	—	3
Опытная	500	27,29 ± 3,59*	0,58	20	39,08 ± 5,49*	0,42	9	15,10 ± 7,59*	0,87	3	29,49 ± 15,12*	0,89	3
Опытная	1000	23,69 ± 4,35*	0,60	11	30,88 ± 10,58*	0,69	4	11,04 ± 5,73*	0,90	3	20,00 ± 11,55*	1,00	3

Примечание. Здесь и далее n – объем выборки; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

Общая средняя криволинейная скорость сперматозоидов (VCL). Через сутки после сцеживания (на 2-й день хранения) в контрольной группе, в сыворотку которой не добавляли борную кислоту, общая средняя криволинейная скорость сперматозоидов (VCL) составила $(59,90 \pm 0,52)$ мкм/с. В опытных группах значения VCL составили: $(61,76 \pm 0,78)$ мкм/с при концентрации борной кислоты в сыворотке спермы 125 мг/л, $(58,39 \pm 0,67)$ мкм/с – 250 мг/л, $(57,11 \pm 0,62)$ мкм/с ($p \leq 0,001$) – 500 мг/л, $(50,12 \pm 0,90)$ мкм/с ($p \leq 0,001$) – 1000 мг/л.

На 3-й день хранения в контрольной группе VCL составила $(56,11 \pm 0,75)$ мкм/с. В опытных группах значения VCL составили: $(55,82 \pm 0,66)$ мкм/с при концентрации борной кислоты в сыворотке спермы 125 мг/л, $(56,47 \pm 0,79)$ мкм/с – 250 мг/л, $(48,61 \pm 0,96)$ мкм/с ($p \leq 0,001$) – 500 мг/л, $(39,61 \pm 0,95)$ мкм/с ($p \leq 0,001$) – 1000 мг/л.

На 4-й день хранения в контрольной группе VCL составила $(54,50 \pm 1,22)$ мкм/с. В опытных группах значения VCL составили: $(53,11 \pm 0,94)$ мкм/с при концентрации борной кислоты в сыворотке спермы 125 мг/л, $(53,93 \pm 1,26)$ мкм/с – 250 мг/л, $(53,20 \pm 1,01)$ мкм/с ($p \leq 0,05$) – 500 мг/л, $(47,41 \pm 1,48)$ мкм/с ($p \leq 0,001$) – 1000 мг/л.

На 5-й день хранения в контрольной группе VCL составила $(34,91 \pm 2,51)$ мкм/с. В опытных группах значения VCL составили: $(48,34 \pm 1,58)$ мкм/с ($p \leq 0,001$) при концентрации борной кислоты в сыворотке спермы 125 мг/л, $(53,61 \pm 1,52)$ мкм/с ($p \leq 0,001$) – 250 мг/л, $(45,97 \pm 2,31)$ мкм/с ($p \leq 0,001$) – 500 мг/л, $(47,65 \pm 1,86)$ мкм/с ($p \leq 0,05$) – 1000 мг/л.

На 6-й день хранения в контрольной группе VCL составила $(35,31 \pm 4,34)$ мкм/с. В опытных группах значения VCL составили: $(47,17 \pm 1,51)$ мкм/с при концентрации борной кислоты в сыворотке спермы 125 мг/л ($p \leq 0,05$), $(44,85 \pm 1,65)$ мкм/с – 250 мг/л, $(49,08 \pm 1,81)$ мкм/с ($p \leq 0,01$) – 500 мг/л, $(41,75 \pm 1,86)$ мкм/с – 1000 мг/л.

На 7-й день хранения в контрольной группе VCL составила $(25,45 \pm 3,52)$ мкм/с. В опытных группах значения VCL составили: $(40,38 \pm 1,53)$ мкм/с при концентрации борной кислоты в сыворотке спермы 125 мг/л ($p \leq 0,001$), $(38,54 \pm 1,55)$ мкм/с ($p \leq 0,05$) – 250 мг/л, $(40,64 \pm 2,20)$ мкм/с ($p \leq 0,001$) – 500 мг/л, $(35,84 \pm 1,98)$ мкм/с – 1000 мг/л.

На 8-й день хранения в контрольной группе VCL составила $(19,69 \pm 5,23)$ мкм/с. В опытных группах значения VCL составили:

(37,23 ± 2,85) мкм/с при концентрации борной кислоты в сыворотке спермы 125 мг/л, (49,17 ± 4,63) мкм/с ($p \leq 0,01$) – 250 мг/л, (39,43 ± 2,62) мкм/с ($p \leq 0,05$) – 500 мг/л, (33,45 ± 2,53) мкм/с ($p \leq 0,001$) – 1000 мг/л.

На 9-й день хранения в контрольной группе подвижных сперматозоидов обнаружено не было. В опытных группах значения VCL составили: (38,65 ± 3,12) мкм/с при концентрации борной кислоты в сыворотке спермы 125 мг/л ($p \leq 0,05$), (38,34 ± 2,29) мкм/с ($p \leq 0,05$) – 250 мг/л, (25,70 ± 2,09) мкм/с ($p \leq 0,05$) – 500 мг/л, (31,51 ± 5,45) мкм/с ($p \leq 0,05$) – 1000 мг/л.

На 10-й день хранения в контрольной группе подвижных сперматозоидов обнаружено не было. В опытных группах значения VCL составили: (14,96 ± 2,63) мкм/с при концентрации борной кислоты в сыворотке спермы 125 мг/л ($p \leq 0,05$), (35,53 ± 4,39) мкм/с ($p \leq 0,05$) – 250 мг/л, (31,14 ± 2,38) мкм/с ($p \leq 0,05$) – 500 мг/л, (17,92 ± 2,42) мкм/с ($p \leq 0,05$) – 1000 мг/л.

На 11-й день хранения в контрольной и опытной группах с концентрацией борной кислоты 125 мг/л подвижных сперматозоидов обнаружено не было. В остальных опытных группах значения VCL составили: (32,80 ± 3,32) мкм/с ($p \leq 0,05$) – 250 мг/л, (35,00 ± 3,00) мкм/с ($p \leq 0,05$) – 500 мг/л, (27,02 ± 2,42) мкм/с ($p \leq 0,05$) – 1000 мг/л.

На 12-й день хранения в контрольной и опытной группах с концентрацией борной кислоты 125 мг/л подвижных сперматозоидов обнаружено не было. В остальных опытных группах значения VCL составили: (16,92 ± 7,43) мкм/с ($p \leq 0,05$) – 250 мг/л, (26,59 ± 4,45) мкм/с ($p \leq 0,05$) – 500 мг/л, (27,13 ± 4,57) мкм/с ($p \leq 0,05$) – 1000 мг/л.

На 13-й день хранения в контрольной и опытных группах с концентрацией борной кислоты 125 и 250 мг/л подвижных сперматозоидов обнаружено не было. В остальных опытных группах значения VCL составили: (27,29 ± 3,59) мкм/с ($p \leq 0,05$) – 500 мг/л, (23,69 ± 4,35) мкм/с ($p \leq 0,05$) – 1000 мг/л.

На 14-й день хранения в контрольной и опытных группах подвижных сперматозоидов обнаружено не было. Визуализация полученных результатов представлена на рис. 10.

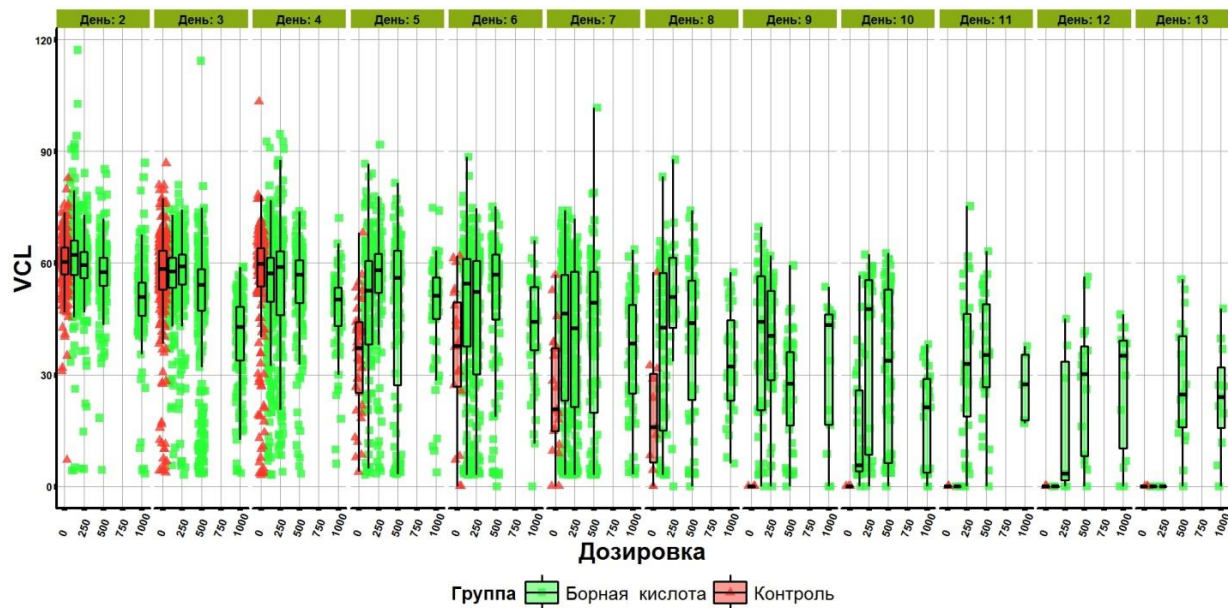


Рис. 10. Совмещенная диаграмма одномерного рассеяния и размахов изменения общей средней криволинейной скорости сперматозоидов сибирского осетра (VCL, мкм/с) под влиянием борной кислоты в период краткосрочного хранения

Средняя криволинейная скорость сперматозоидов категории А (VCL (А)). Через сутки после сцеживания (на 2-й день хранения) в контрольной группе, в сыворотку которой не добавляли борную кислоту, средняя криволинейная скорость сперматозоидов категории А (VCL (А)) составила $(60,13 \pm 0,47)$ мкм/с. В опытных группах значения VCL (А) составили: $(62,63 \pm 0,65)$ мкм/с при концентрации борной кислоты в сыворотке спермы 125 мг/л, $(59,42 \pm 0,49)$ мкм/с – 250 мг/л, $(57,55 \pm 0,54)$ мкм/с ($p \leq 0,001$) – 500 мг/л, $(51,81 \pm 0,65)$ мкм/с ($p \leq 0,001$) – 1000 мг/л.

На 3-й день хранения в контрольной группе VCL (А) составила $(58,86 \pm 0,45)$ мкм/с. В опытных группах значения VCL (А) составили: $(57,30 \pm 0,46)$ мкм/с при концентрации борной кислоты в сыворотке спермы 125 мг/л, $(58,78 \pm 0,49)$ мкм/с – 250 мг/л, $(55,68 \pm 0,47)$ мкм/с ($p \leq 0,001$) – 500 мг/л, $(44,31 \pm 0,58)$ мкм/с ($p \leq 0,001$) – 1000 мг/л.

На 4-й день хранения в контрольной группе VCL (А) составила $(59,83 \pm 0,68)$ мкм/с. В опытных группах значения VCL (А) составили: $(57,17 \pm 0,65)$ мкм/с при концентрации борной кислоты в сыворотке спермы 125 мг/л, $(59,38 \pm 0,87)$ мкм/с – 250 мг/л, $(55,82 \pm 0,69)$ мкм/с ($p \leq 0,05$) – 500 мг/л, $(50,65 \pm 0,96)$ мкм/с ($p \leq 0,001$) – 1000 мг/л.

На 5-й день хранения в контрольной группе VCL (А) составила $(44,06 \pm 1,83)$ мкм/с. В опытных группах значения VCL (А) составили: $(55,10 \pm 1,10)$ мкм/с ($p \leq 0,001$) при концентрации борной кислоты в сыворотке спермы 125 мг/л, $(58,51 \pm 0,88)$ мкм/с ($p \leq 0,001$) – 250 мг/л, $(58,18 \pm 1,24)$ мкм/с ($p \leq 0,001$) – 500 мг/л, $(51,01 \pm 1,42)$ мкм/с ($p \leq 0,05$) – 1000 мг/л.

На 6-й день хранения в контрольной группе VCL (А) составила $(39,89 \pm 4,63)$ мкм/с. В опытных группах значения VCL (А) составили: $(54,99 \pm 0,95)$ мкм/с при концентрации борной кислоты в сыворотке спермы 125 мг/л ($p \leq 0,05$), $(55,71 \pm 0,88)$ мкм/с ($p \leq 0,01$) – 250 мг/л, $(57,17 \pm 1,02)$ мкм/с ($p \leq 0,01$) – 500 мг/л, $(45,89 \pm 1,61)$ мкм/с – 1000 мг/л.

На 7-й день хранения в контрольной группе VCL (А) составила $(34,15 \pm 6,13)$ мкм/с. В опытных группах значения VCL (А) составили: $(52,81 \pm 0,88)$ мкм/с при концентрации борной кислоты в сыворотке спермы 125 мг/л ($p \leq 0,01$), $(51,13 \pm 1,00)$ мкм/с ($p \leq 0,01$) – 250 мг/л, $(54,74 \pm 1,26)$ мкм/с ($p \leq 0,01$) – 500 мг/л, $(46,85 \pm 1,25)$ мкм/с – 1000 мг/л.

На 8-й день хранения в контрольной группе VCL (А) составила $(24,30 \pm 10,95)$ мкм/с. В опытных группах значения VCL (А) составили: $(53,56 \pm 1,70)$ мкм/с при концентрации борной кислоты в сыворотке спер-

мы 125 мг/л, $(51,35 \pm 4,33)$ мкм/с ($p \leq 0,05$) – 250 мг/л, $(50,63 \pm 1,91)$ мкм/с ($p \leq 0,05$) – 500 мг/л, $(43,73 \pm 2,06)$ мкм/с ($p \leq 0,05$) – 1000 мг/л.

На 9-й день хранения в контрольной группе подвижных сперматозоидов обнаружено не было. В опытных группах значения VCL (A) составили: $(50,63 \pm 2,37)$ мкм/с при концентрации борной кислоты в сыворотке спермы 125 мг/л ($p \leq 0,05$), $(45,97 \pm 1,95)$ мкм/с ($p \leq 0,05$) – 250 мг/л, $(37,33 \pm 2,43)$ мкм/с ($p \leq 0,05$) – 500 мг/л, $(36,42 \pm 6,26)$ мкм/с ($p \leq 0,05$) – 1000 мг/л.

На 10-й день хранения в контрольной группе подвижных сперматозоидов обнаружено не было. В опытных группах значения VCL (A) составили: $(35,19 \pm 5,84)$ мкм/с при концентрации борной кислоты в сыворотке спермы 125 мг/л ($p \leq 0,05$), $(50,37 \pm 3,15)$ мкм/с ($p \leq 0,05$) – 250 мг/л, $(49,06 \pm 1,62)$ мкм/с ($p \leq 0,05$) – 500 мг/л, $(26,45 \pm 5,81)$ мкм/с ($p \leq 0,05$) – 1000 мг/л.

На 11-й день хранения в контрольной и опытной группах с концентрацией борной кислоты 125 мг/л подвижных сперматозоидов обнаружено не было. В остальных опытных группах значения VCL (A) составили: $(42,37 \pm 3,74)$ мкм/с ($p \leq 0,05$) – 250 мг/л, $(44,12 \pm 3,18)$ мкм/с ($p \leq 0,05$) – 500 мг/л, $(36,52 \pm 1,11)$ мкм/с ($p \leq 0,05$) – 1000 мг/л.

На 12-й день хранения в контрольной и опытной группах с концентрацией борной кислоты 125 мг/л подвижных сперматозоидов обнаружено не было. В остальных опытных группах значения VCL (A) составили: $(20,71 \pm 12,05)$ мкм/с ($p \leq 0,05$) – 250 мг/л, $(36,45 \pm 5,45)$ мкм/с ($p \leq 0,05$) – 500 мг/л, $(31,78 \pm 5,41)$ мкм/с ($p \leq 0,05$) – 1000 мг/л.

На 13-й день хранения в контрольной и опытных группах с концентрацией борной кислоты 125 и 250 мг/л подвижных сперматозоидов обнаружено не было. В остальных опытных группах значения VCL (A) составили: $(39,08 \pm 5,49)$ мкм/с ($p \leq 0,05$) – 500 мг/л, $(30,88 \pm 10,58)$ мкм/с ($p \leq 0,05$) – 1000 мг/л.

На 14-й день хранения в контрольной и опытных группах подвижных сперматозоидов обнаружено не было. Визуализация полученных результатов представлена на рис. 11.

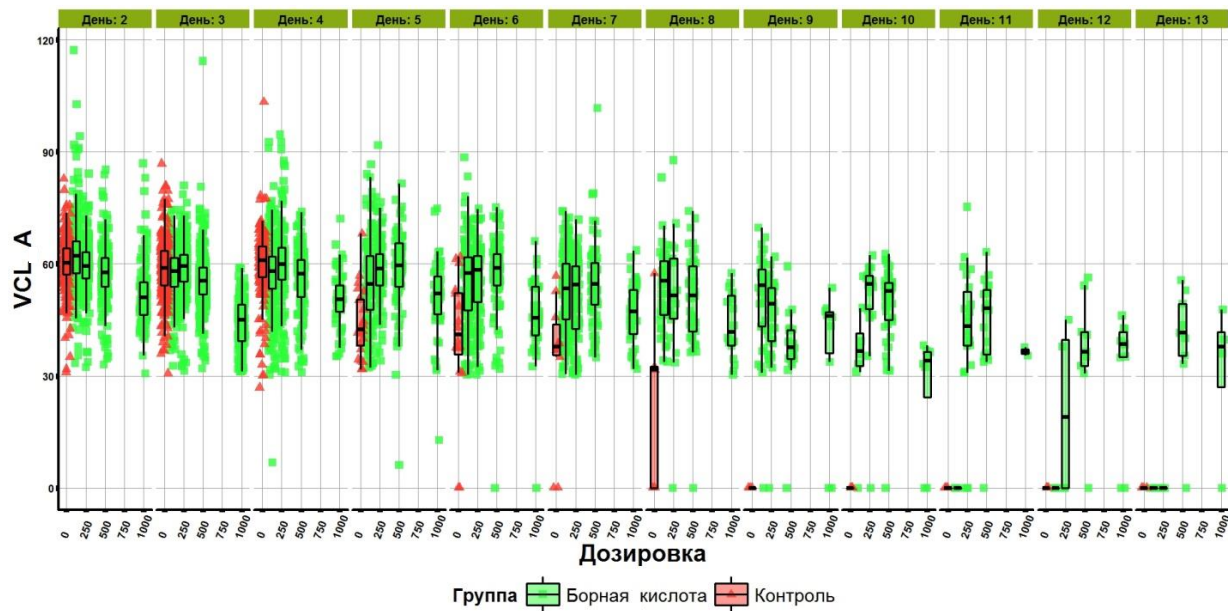


Рис. 11. Совмещенная диаграмма одномерного рассеяния и размахов изменения средней криволинейной скорости сперматозоидов категории А сибирского осетра (VCL, мкм/с) под влиянием борной кислоты в период краткосрочного хранения

Процент общей подвижности сперматозоидов. Наряду со скоростью подвижности сперматозоидов, особенно в условиях высокой продуктивности самок и разбавления водой, процент подвижности (количество подвижных) сперматозоидов является важным показателем.

Через сутки после сцеживания спермы (на 2-й день хранения) в контрольной группе, в сыворотку которой не добавляли борную кислоту, процент общей подвижности сперматозоидов составил $(98,44 \pm 1,15) \%$. В опытных группах значения процента общей подвижности сперматозоидов составили: $(97,52 \pm 1,05) \%$ при концентрации борной кислоты в сыворотке спермы 125 мг/л, $(97,37 \pm 0,11) \%$ – 250 мг/л, $(96,65 \pm 1,11) \%$ – 500 мг/л, $(90,77 \pm 3,50) \%$ – 1000 мг/л.

На 3-й день хранения в контрольной группе процент общей подвижности составил $(99,15 \pm 0,85) \%$. В опытных группах значения процентов общей подвижности составили: $(98,63 \pm 0,85) \%$ при концентрации борной кислоты в сыворотке спермы 125 мг/л, $(97,68 \pm 0,55) \%$ – 250 мг/л, $(97,94 \pm 0,58) \%$ – 500 мг/л, $(91,28 \pm 1,35) \%$ – 1000 мг/л.

На 4-й день хранения в контрольной группе процент общей подвижности составил $(85,06 \pm 9,97) \%$. В опытных группах значения процентов общей подвижности составили: $(95,89 \pm 1,20) \%$ при концентрации борной кислоты в сыворотке спермы 125 мг/л, $(97,23 \pm 1,70) \%$ – 250 мг/л, $(92,27 \pm 4,09) \%$ – 500 мг/л, $(81,49 \pm 1,00) \%$ – 1000 мг/л.

На 5-й день хранения в контрольной группе процент общей подвижности составил $(23,27 \pm 23,27) \%$. В опытных группах значения процентов общей подвижности составили: $(66,93 \pm 13,44) \%$ при концентрации борной кислоты в сыворотке спермы 125 мг/л, $(79,65 \pm 9,10) \%$ ($p \leq 0,05$) – 250 мг/л, $(62,00 \pm 21,75) \%$ ($p \leq 0,05$) – 500 мг/л, $(53,37 \pm 25,44) \%$ – 1000 мг/л.

На 6-й день хранения в контрольной группе процент общей подвижности составил $(33,33 \pm 3,33) \%$. В опытных группах значения процентов общей подвижности составили: $(67,37 \pm 4,73) \%$ при концентрации борной кислоты в сыворотке спермы 125 мг/л ($p \leq 0,05$), $(87,57 \pm 3,73) \%$ ($p \leq 0,05$) – 250 мг/л, $(57,27 \pm 29,77) \%$ ($p \leq 0,05$) – 500 мг/л, $(48,91 \pm 24,46) \%$ ($p \leq 0,05$) – 1000 мг/л.

На 7-й день хранения в контрольной группе процент общей подвижности составил $(24,36 \pm 4,36) \%$. В опытных группах значения процентов общей подвижности составили: $(76,54 \pm 11,94) \%$ при концентрации борной кислоты в сыворотке спермы 125 мг/л ($p \leq 0,05$), $(63,88 \pm 8,71) \%$ ($p \leq 0,05$) – 250 мг/л, $(78,71 \pm 8,50) \%$ ($p \leq 0,05$) – 500 мг/л, $(48,35 \pm 15,55) \%$ ($p \leq 0,05$) – 1000 мг/л.

На 8-й день хранения в контрольной группе процент общей подвижности составил $(3,75 \pm 3,75) \%$. В опытных группах значения процентов общей подвижности составили: $(60,72 \pm 8,72) \%$ при концентрации борной кислоты в сыворотке спермы 125 мг/л ($p \leq 0,05$), $(50,00 \pm 28,87) \%$ ($p \leq 0,05$) – 250 мг/л, $(42,13 \pm 21,44) \%$ ($p \leq 0,05$) – 500 мг/л, $(38,53 \pm 1,95) \%$ ($p \leq 0,05$) – 1000 мг/л.

На 9-й день хранения в контрольной группе подвижных сперматозоидов обнаружено не было. В опытных группах значения процентов общей подвижности составили: $(31,37 \pm 18,42) \%$ при концентрации борной кислоты в сыворотке спермы 125 мг/л ($p \leq 0,05$), $(53,27 \pm 26,70) \%$ ($p \leq 0,05$) – 250 мг/л, $(31,54 \pm 16,10) \%$ ($p \leq 0,05$) – 500 мг/л, $(28,21 \pm 28,20) \%$ ($p \leq 0,05$) – 1000 мг/л.

На 10-й день хранения в контрольной группе подвижных сперматозоидов обнаружено не было. В опытных группах значения процентов общей подвижности составили: $(28,99 \pm 16,30) \%$ при концентрации борной кислоты в сыворотке спермы 125 мг/л ($p \leq 0,05$), $(47,22 \pm 23,73) \%$ ($p \leq 0,05$) – 250 мг/л, $(56,16 \pm 28,09) \%$ ($p \leq 0,05$) – 500 мг/л, $(25,44 \pm 25,44) \%$ ($p \leq 0,05$) – 1000 мг/л.

На 11-й день хранения в контрольной и опытной группах с концентрацией борной кислоты 125 мг/л подвижных сперматозоидов обнаружено не было. В остальных опытных группах значения процентов общей подвижности составили: $(14,47 \pm 14,47) \%$ ($p \leq 0,05$) – 250 мг/л, $(35,29 \pm 17,73) \%$ ($p \leq 0,05$) – 500 мг/л, $(40,00 \pm 19,53) \%$ ($p \leq 0,05$) – 1000 мг/л.

На 12-й день хранения в контрольной и опытной группах с концентрацией борной кислоты 125 мг/л подвижных сперматозоидов обнаружено не было. В остальных опытных группах значения процентов общей подвижности составили: $(6,94 \pm 6,94) \%$ ($p \leq 0,05$) – 250 мг/л, $(30,43 \pm 15,22) \%$ ($p \leq 0,05$) – 500 мг/л, $(5,97 \pm 5,97) \%$ ($p \leq 0,05$) – 1000 мг/л.

На 13-й день хранения в контрольной и опытных группах с концентрацией борной кислоты 125 и 250 мг/л подвижных сперматозоидов обнаружено не было. В остальных опытных группах значения процентов общей подвижности составили: $(15,10 \pm 7,59) \%$ ($p \leq 0,05$) – 500 мг/л, $(11,04 \pm 5,73) \%$ ($p \leq 0,05$) – 1000 мг/л.

На 14-й день хранения в контрольной и опытных группах подвижных сперматозоидов обнаружено не было. Визуализация полученных результатов представлена на рис. 12.

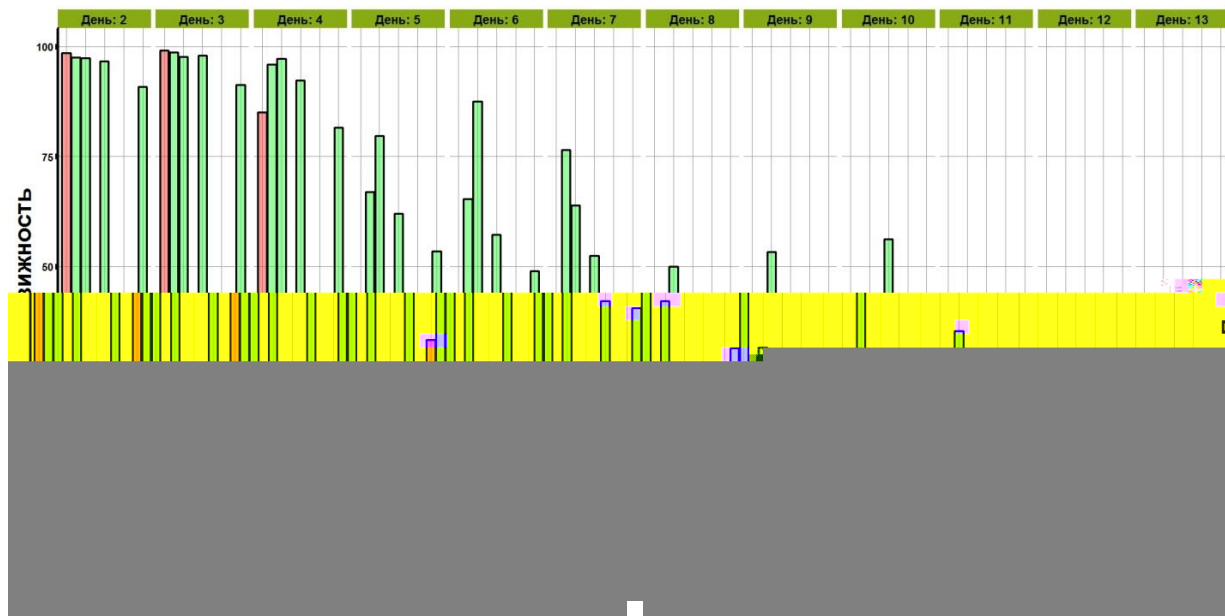


Рис. 12. Диаграмма изменения средней общей подвижности сперматозоидов сибирского осетра (%) под влиянием борной кислоты в период краткосрочного хранения

Процент сперматозоидов категории А. Через сутки после сцеживания (на 2-й день хранения) в контрольной группе, в сыворотку которой не добавляли борную кислоту, процент сперматозоидов категории А составил $(99,71 \pm 0,29) \%$. В опытных группах процент сперматозоидов категории А составил: $(98,14 \pm 1,41) \%$ при концентрации борной кислоты в сыворотке спермы 125 мг/л, $(97,80 \pm 1,52) \%$ – 250 мг/л, $(99,14 \pm 0,44) \%$ – 500 мг/л, $(96,70 \pm 1,66) \%$ – 1000 мг/л.

На 3-й день хранения в контрольной группе процент сперматозоидов категории А составил $(95,00 \pm 1,82) \%$. В опытных группах значения данного показателя были следующие: $(95,87 \pm 1,49) \%$ при концентрации борной кислоты в сыворотке спермы 125 мг/л, $(94,87 \pm 1,93) \%$ – 250 мг/л, $(83,28 \pm 6,49) \%$ – 500 мг/л, $(82,20 \pm 6,02) \%$ – 1000 мг/л.

На 4-й день хранения в контрольной группе процент сперматозоидов категории А составил $(88,64 \pm 1,45) \%$. В опытных группах процент сперматозоидов категории А составил: $(88,87 \pm 2,62) \%$ при концентрации борной кислоты в сыворотке спермы 125 мг/л, $(81,68 \pm 8,31) \%$ – 250 мг/л, $(92,74 \pm 1,74) \%$ – 500 мг/л, $(89,39 \pm 1,51) \%$ – 1000 мг/л.

На 5-й день хранения в контрольной группе процент сперматозоидов категории А составил $(21,62 \pm 21,62) \%$. В опытных группах процент сперматозоидов категории А составил: $(86,85 \pm 4,23) \%$ при концентрации борной кислоты в сыворотке спермы 125 мг/л, $(89,37 \pm 0,51) \%$ ($p \leq 0,05$) – 250 мг/л, $(71,04 \pm 5,54) \%$ ($p \leq 0,05$) – 500 мг/л, $(83,16 \pm 8,69) \%$ – 1000 мг/л.

На 6-й день хранения в контрольной группе процент сперматозоидов категории А составил $(25,93 \pm 25,93) \%$. В опытных группах процент сперматозоидов категории А составил: $(82,35 \pm 3,86) \%$ при концентрации борной кислоты в сыворотке спермы 125 мг/л ($p \leq 0,05$), $(77,92 \pm 9,67) \%$ ($p \leq 0,05$) – 250 мг/л, $(55,37 \pm 27,71) \%$ ($p \leq 0,05$) – 500 мг/л, $(52,02 \pm 26,50) \%$ ($p \leq 0,05$) – 1000 мг/л.

На 7-й день хранения в контрольной группе процент сперматозоидов категории А составил $(14,04 \pm 14,04) \%$. В опытных группах процент сперматозоидов категории А составил: $(70,16 \pm 0,39) \%$ при концентрации борной кислоты в сыворотке спермы 125 мг/л ($p \leq 0,05$), $(68,40 \pm 5,84) \%$ ($p \leq 0,05$) – 250 мг/л, $(66,97 \pm 6,36) \%$ ($p \leq 0,05$) – 500 мг/л, $(39,44 \pm 21,35) \%$ ($p \leq 0,05$) – 1000 мг/л.

На 8-й день хранения в контрольной группе процент сперматозоидов категории А составил $(11,11 \pm 11,11) \%$. В опытных группах процент сперматозоидов категории А составил: $(64,36 \pm 15,64) \%$ при кон-

центрации борной кислоты в сыворотке спермы 125 мг/л ($p \leq 0,05$), $(62,50 \pm 31,45) \%$ ($p \leq 0,05$) – 250 мг/л, $(42,59 \pm 21,83) \%$ ($p \leq 0,05$) – 500 мг/л, $(54,51 \pm 27,84) \%$ ($p \leq 0,05$) – 1000 мг/л.

На 9-й день хранения в контрольной группе подвижных сперматозоидов обнаружено не было. В опытных группах процент сперматозоидов категории А составил: $(48,29 \pm 24,53) \%$ при концентрации борной кислоты в сыворотке спермы 125 мг/л ($p \leq 0,05$), $(36,50 \pm 23,17) \%$ ($p \leq 0,05$) – 250 мг/л, $(32,04 \pm 17,43) \%$ ($p \leq 0,05$) – 500 мг/л, $(24,24 \pm 24,24) \%$ ($p \leq 0,05$) – 1000 мг/л.

На 10-й день хранения в контрольной группе подвижных сперматозоидов обнаружено не было. В опытных группах процент сперматозоидов категории А составил: $(18,18 \pm 13,89) \%$ при концентрации борной кислоты в сыворотке спермы 125 мг/л ($p \leq 0,05$), $(45,83 \pm 23,20) \%$ ($p \leq 0,05$) – 250 мг/л, $(31,94 \pm 17,07) \%$ ($p \leq 0,05$) – 500 мг/л, $(6,90 \pm 6,90) \%$ ($p \leq 0,05$) – 1000 мг/л.

На 11-й день хранения в контрольной и опытной группах с концентрацией борной кислоты 125 мг/л подвижных сперматозоидов обнаружено не было. В остальных опытных группах процент сперматозоидов категории А составил: $(20,20 \pm 20,20) \%$ ($p \leq 0,05$) – 250 мг/л, $(37,96 \pm 20,10) \%$ ($p \leq 0,05$) – 500 мг/л, $(40,00 \pm 19,53) \%$ ($p \leq 0,05$) – 1000 мг/л.

На 12-й день хранения в контрольной и опытной группах с концентрацией борной кислоты 125 мг/л подвижных сперматозоидов обнаружено не было. В остальных опытных группах процент сперматозоидов категории А составил: $(13,33 \pm 13,33) \%$ ($p \leq 0,05$) – 250 мг/л, $(34,85 \pm 17,47) \%$ ($p \leq 0,05$) – 500 мг/л, $(22,22 \pm 22,22) \%$ ($p \leq 0,05$) – 1000 мг/л.

На 13-й день хранения в контрольной и опытных группах с концентрацией борной кислоты 125 и 250 мг/л подвижных сперматозоидов обнаружено не было. В остальных опытных группах процент сперматозоидов категории А составил: $(29,49 \pm 15,12) \%$ ($p \leq 0,05$) – 500 мг/л, $(20,00 \pm 11,55) \%$ ($p \leq 0,05$) – 1000 мг/л.

На 14-й день хранения в контрольной и опытных группах подвижных сперматозоидов обнаружено не было. Визуализация полученных результатов представлена на рис. 13.

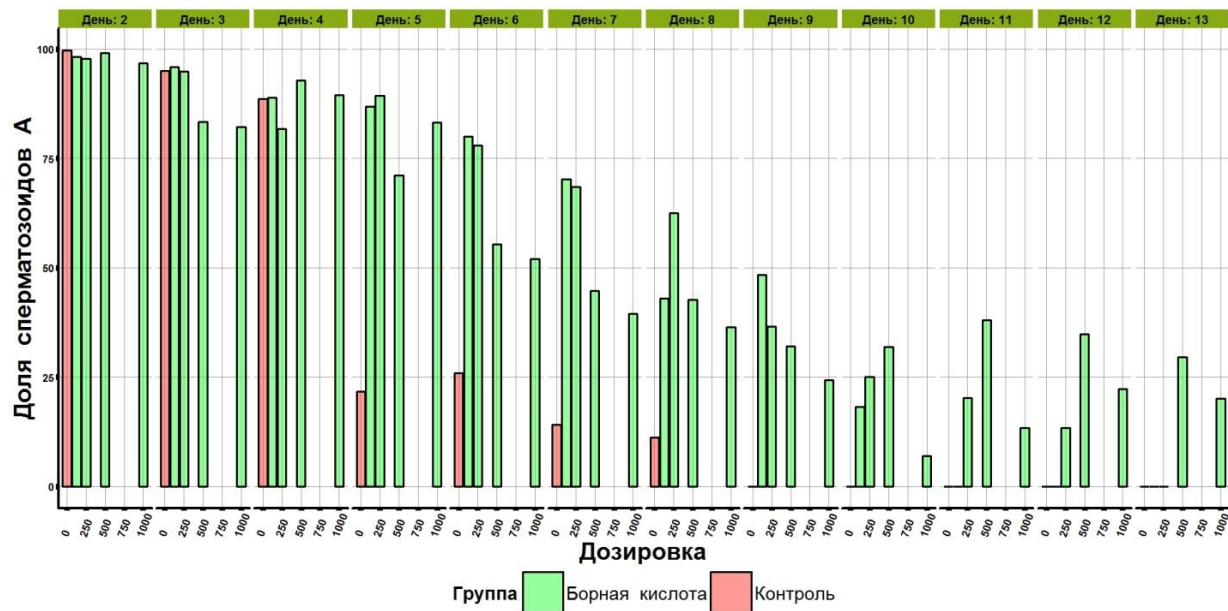
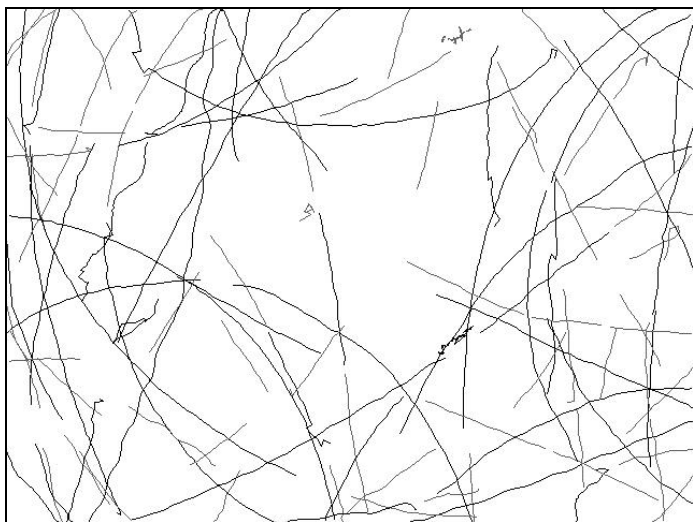
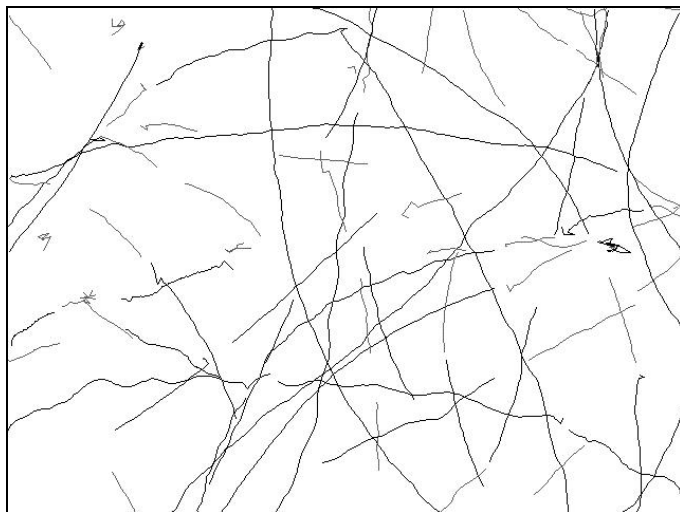


Рис. 13. Диаграмма изменения доли сперматозоидов категории А в средней общей подвижности сперматозоидов сибирского осетра (%) под влиянием борной кислоты в период краткосрочного хранения

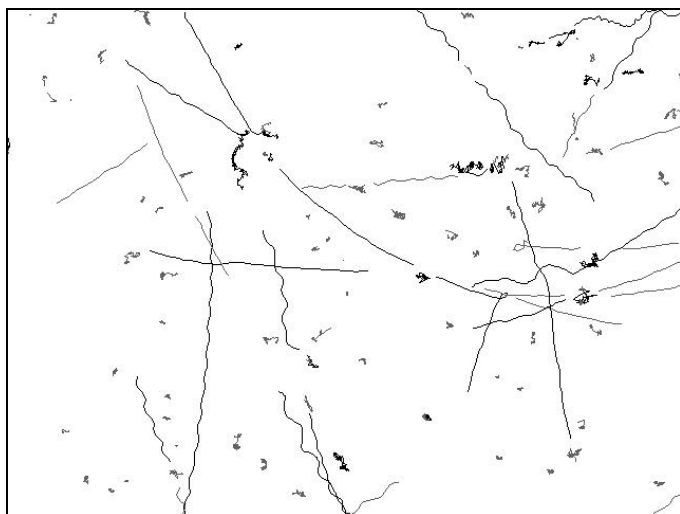
При оценке спермы под микроскопом такое влияние визуально проявлялось в изменении скорости подвижности, траектории движения, процента подвижных сперматозоидов. Так, если на 2-й день хранения сперматозоидов траектории их движения значительно не отличались между исследуемыми группами (рис. 14, *а–б*), то на 8-й день в контрольной группе визуально увеличивалось количество сперматозоидов, совершавших зигзагообразные и колебательные движения, при этом количество и скорость сперматозоидов,двигающихся по линейной траектории было значительно ниже, чем в опытной группе с концентрацией борной кислоты в сыворотке спермы 500 мг/л (рис. 14, *в–г*). На 13-й день хранения в опытной группе сохранялись подвижные сперматозоиды,двигающиеся по линейной траектории и способные к оплодотворению (рис. 14, *д*), тогда как в контрольной группе сперматозоиды полностью потеряли подвижность на 9-й день хранения.



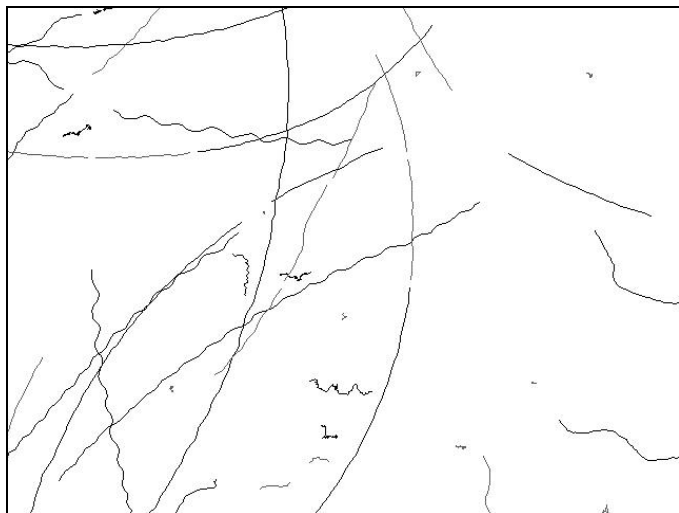
а



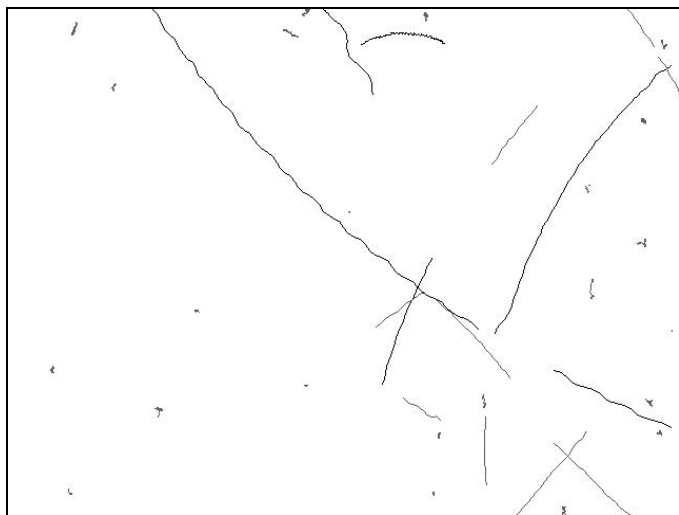
6



6



2



д

Рис. 14. Траектории движения сперматозоидов сибирского осетра в контрольной (а, в) и опытной (500 мг/л борной кислоты) (б, з, д) группах

Следует обратить внимание на тот факт, что в первые дни хранения спермы под влиянием борной кислоты в концентрациях 500 и 1000 мг/л происходило достоверное снижение средней криволинейной скорости сперматозоидов (общей и сперматозоидов категории А) относительно контрольной группы вплоть до 4-го дня хранения. Этот эффект можно объяснить тем, что под влиянием борной кислоты в концентрациях 500 и 1000 мг/л происходило замедление метаболизма относительно контрольной группы, что позволило сохранить на более длительный период необходимый уровень АТФ, требуемый для биения жгутиков. Кроме данного эффекта увеличение периода краткосрочного хранения спермы под влиянием борной кислоты можно объяснить ее антимикробным действием, поскольку длительные условия хранения спермы значительно затрагивают качество спермы, так как мощные микробные загрязнения уменьшают подвижность спермы и ее жизнеспособность.

Таким образом, проведенные исследования на примере сибирского осетра установили, что борная кислота способна влиять на качественные и количественные показатели спермы осетровых рыб, увеличивая общий срок краткосрочного хранения без использования криоконсервации (до 13 сут). При этом рекомендуемая дозировка борной кислоты при добавлении в сыворотку спермы составляет 500 мг/л.

Влияние винной кислоты. Результаты влияния винной кислоты на качественные и количественные показатели сперматозоидов сибирского осетра в период краткосрочного хранения спермы представлены на рис. 15–20 и табл. 5.

Влияние цинка. Результаты влияния цинка на качественные и количественные показатели сперматозоидов сибирского осетра в период краткосрочного хранения спермы представлены на рис. 21–26 и табл. 6.

Влияние спирта. Результаты влияния спирта на качественные и количественные показатели сперматозоидов сибирского осетра в период краткосрочного хранения спермы представлены на рис. 27–32 и табл. 7.

Влияние сахара. Результаты влияния сахара на качественные и количественные показатели сперматозоидов сибирского осетра в период краткосрочного хранения спермы представлены на рис. 33–38 и табл. 8.

Влияние H_2SO_4 (0,1 Н). Результаты влияния H_2SO_4 (0,1 Н) на качественные и количественные показатели сперматозоидов сибирского осетра в период краткосрочного хранения спермы представлены на рис. 39–44 и табл. 9.

Влияние лимонной кислоты. Результаты влияния лимонной кислоты на качественные и количественные показатели сперматозоидов сибирского осетра в период краткосрочного хранения спермы представлены на рис. 45–50 и табл. 10.

Была проведена племенная оценка самцов-производителей осетровых рыб в экстракорпоральном оплодотворении при содержании в установках замкнутого водоснабжения.

В ходе исследований была собрана сперма и проанализирована подвижность сперматозоидов от 5 видов и гибридов осетровых рыб, таких как русский осетр, сибирский осетр, стерлядь, гибрид бестер, гибрид РО×ЛО. Качественные и количественные показатели сперматозоидов бестера после активации водой представлены на рис. 51–56 и табл. 11. Сравнительная характеристика параметров подвижности сперматозоидов русского осетра и сибирского осетра и их гибрида РО×ЛО представлены на рис. 57–60 и табл. 12.

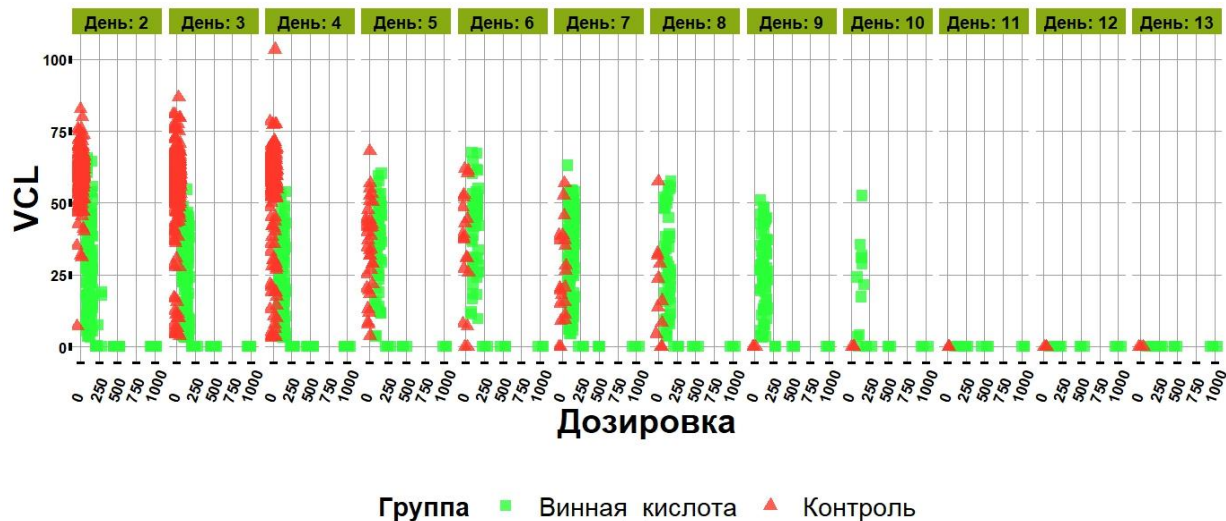


Рис. 15. Диаграмма одномерного рассеяния и размахов изменения общей средней криволинейной скорости (VCL, мкм/с) сперматозоидов ленского осетра под влиянием винной кислоты в период краткосрочного хранения

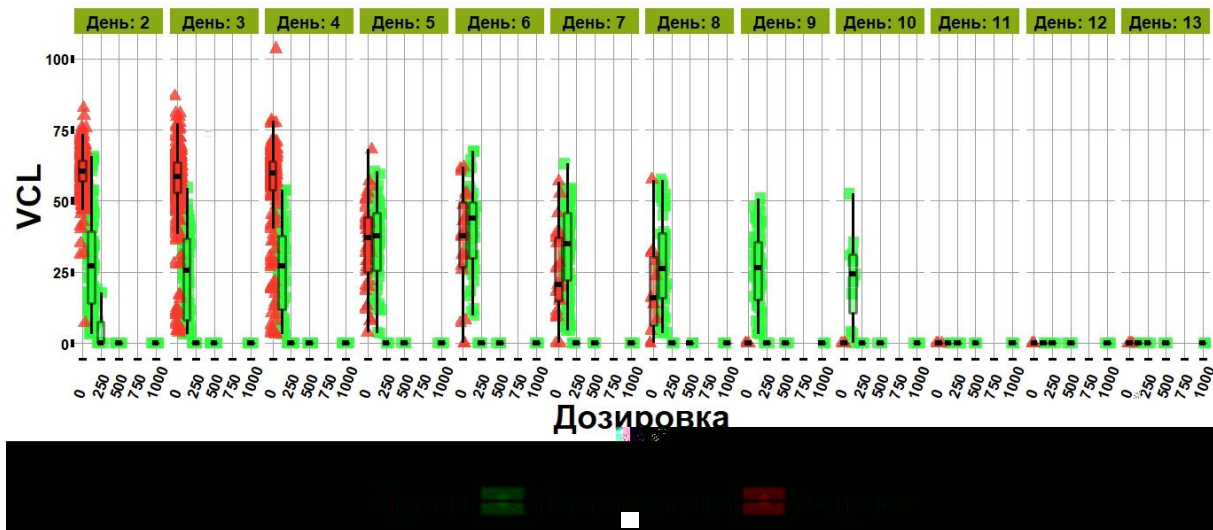


Рис. 16. Совмещенная диаграмма одномерного рассеяния и размахов изменения общей средней криволинейной скорости (VCL, мкм/с) сперматозоидов ленского осетра под влиянием винной кислоты в период краткосрочного хранения

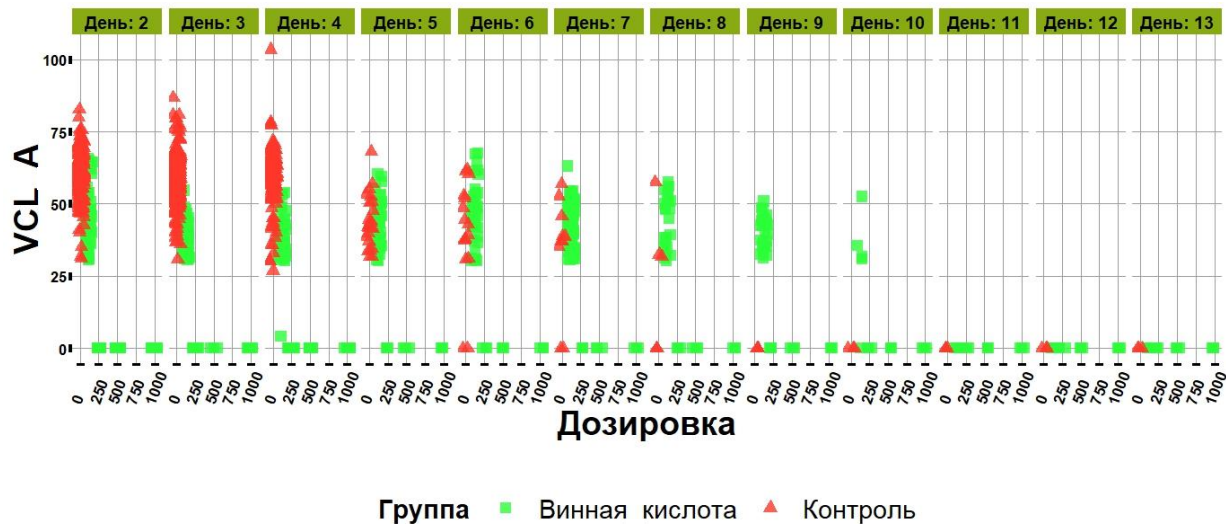


Рис. 17. Диаграмма одномерного рассеяния и размахов изменения средней криволинейной скорости (VCL, мкм/с) сперматозоидов категории А ленивого осетра под влиянием винной кислоты в период краткосрочного хранения

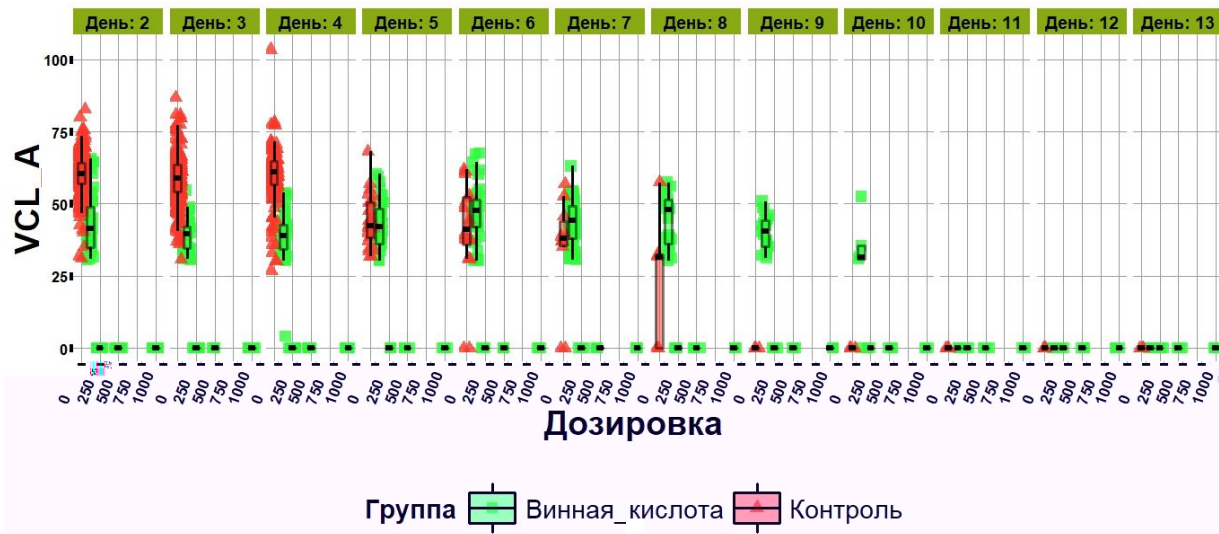


Рис. 18. Совмещенная диаграмма одномерного рассеяния и размахов изменения средней криволинейной скорости (VCL, $\mu\text{m/s}$) сперматозоидов категории А ленского осетра под влиянием винной кислоты в период краткосрочного хранения

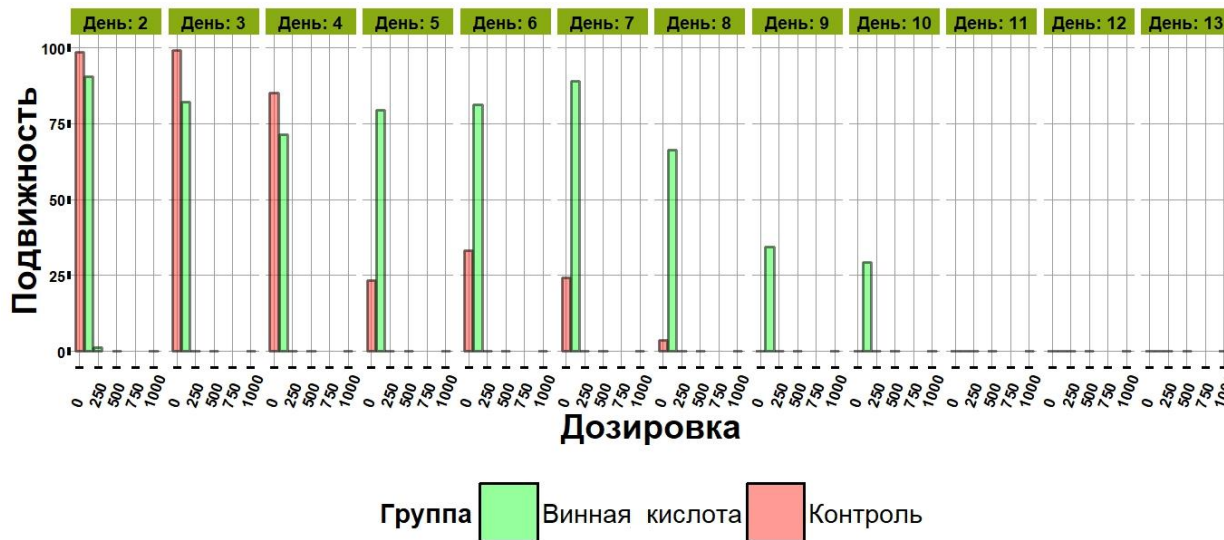


Рис. 19. Диаграмма изменения средней общей подвижности (%) сперматозоидов ленского осетра под влиянием винной кислоты в период краткосрочного хранения

Доля сперматозоидов А

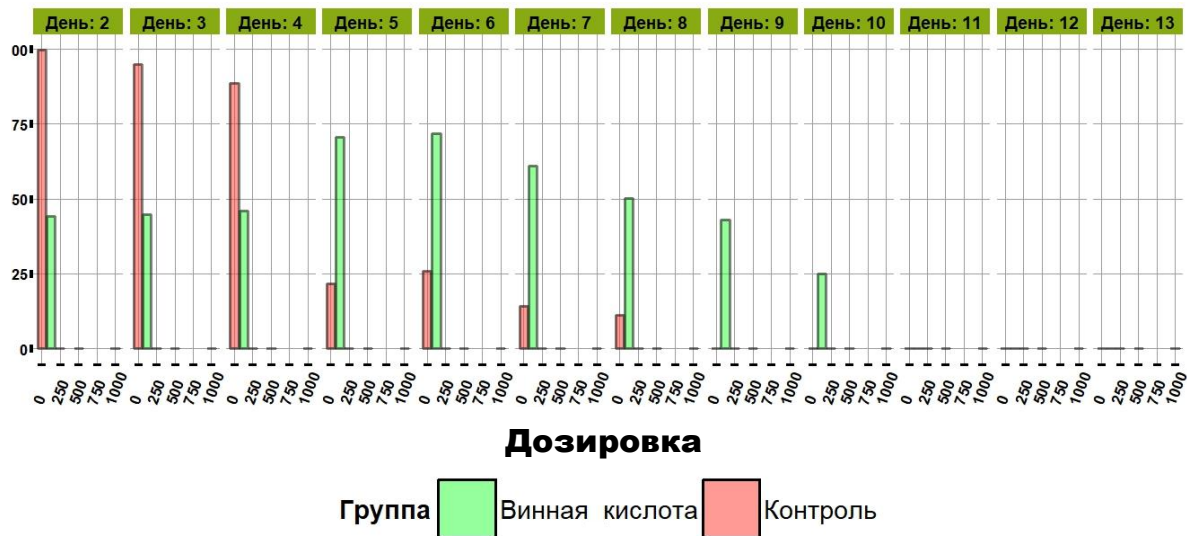


Рис. 20. Диаграмма изменения доли сперматозоидов категории А в средней общей подвижности (%) сперматозоидов ленского осетра под влиянием винной кислоты в период краткосрочного хранения

Таблица 5. Влияние винной кислоты на параметры подвижности сперматозоидов ленского осетра в период краткосрочного хранения в условиях *in vitro*

Группа	Дозировка винной кислоты, мг/л	VCL, мкм/с			VCL (A), мкм/с			Подвижность, %			Доля сперматозоидов (A), %		
		Mean ± SE	C _v , %	n	Mean ± SE	C _v , %	n	Mean ± SE	C _v , %	n	Mean ± SE	C _v , %	n
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
2-й день													
Контрольная	0	59,90 ± 0,52***	0,13	238	60,13 ± 0,47	0,12	237	98,44 ± 1,15	0,02	3	99,71 ± 0,29	0,01	3
Опытная	125	27,89 ± 1,46***	0,58	123	43,78 ± 1,42***	0,23	52	90,46 ± 5,47	0,10	3	44,33 ± 9,67	0,38	3
Опытная	250	5,03 ± 2,66***	1,59	9	0,00 ± 0,00	—	9	1,41 ± 1,41	1,73	3	0,00 ± 0,00	—	3
Опытная	500	0,00 ± 0,00***	—	9	0,00 ± 0,00	—	9	0,00 ± 0,00	—	3	0,00 ± 0,00	—	3
Опытная	1000	0,00 ± 0,00***	—	9	0,00 ± 0,00	—	9	0,00 ± 0,00	—	3	0,00 ± 0,00	—	3
3-й день													
Контрольная	0	56,11 ± 0,75***	0,24	323	58,86 ± 0,45	0,13	304	99,15 ± 0,85	0,01	3	95,00 ± 1,82	0,03	3
Опытная	125	23,56 ± 1,28***	0,63	133	39,04 ± 0,74***	0,14	53	82,09 ± 2,43	0,05	3	44,75 ± 14,76	0,57	3
Опытная	250	0,00 ± 0,00	—	9	0,00 ± 0,00	—	9	0,00 ± 0,00	—	3	0,00 ± 0,00	—	3
Опытная	500	0,00 ± 0,00	—	9	0,00 ± 0,00	—	9	0,00 ± 0,00	—	3	0,00 ± 0,00	—	3
Опытная	1000	0,00 ± 0,00	—	9	0,00 ± 0,00	—	9	0,00 ± 0,00	—	3	0,00 ± 0,00	—	3
4-й день													
Контрольная	0	54,50 ± 1,22***	0,31	199	59,83 ± 0,68	0,15	176	85,06 ± 9,97	0,20	3	88,64 ± 1,45	0,03	3
Опытная	125	25,28 ± 1,26***	0,58	135	38,72 ± 0,95***	0,19	61	71,42 ± 7,88	0,19	3	45,85 ± 3,42	0,13	3
Опытная	250	0,00 ± 0,00	—	9	0,00 ± 0,00	—	9	0,00 ± 0,00	—	3	0,00 ± 0,00	—	3
Опытная	500	0,00 ± 0,00	—	9	0,00 ± 0,00	—	9	0,00 ± 0,00	—	3	0,00 ± 0,00	—	3
Опытная	1000	0,00 ± 0,00	—	9	0,00 ± 0,00	—	9	0,00 ± 0,00	—	3	0,00 ± 0,00	—	3
5-й день													
Контрольная	0	34,91 ± 2,51	0,43	37	44,06 ± 1,83	0,20	24	23,27 ± 23,27	1,73	3	21,62 ± 21,62	1,73	3
Опытная	125	35,50 ± 1,82	0,4	61	43,17 ± 1,19	0,18	43	79,56 ± 3,68	0,08	3	70,60 ± 9,63	0,24	3
Опытная	250	0,00 ± 0,00	—	3	0,00 ± 0,00	—	3	0,00 ± 0,00	—	3	0,00 ± 0,00	—	3
Опытная	500	0,00 ± 0,00	—	3	0,00 ± 0,00	—	3	0,00 ± 0,00	—	3	0,00 ± 0,00	—	3
Опытная	1000	0,00 ± 0,00	—	3	0,00 ± 0,00	—	3	0,00 ± 0,00	—	3	0,00 ± 0,00	—	3

Продолжение табл. 5

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
6-й день													
Контрольная	0	35,31 ± 4,34	0,55	20	39,89 ± 4,63	0,46	16	33,33 ± 33,33	1,73	3	25,93 ± 25,93	1,73	3
Опытная	125	40,44 ± 1,94	0,36	56	46,99 ± 1,51	0,21	42	81,11 ± 18,89	0,40	3	71,89 ± 9,04	0,22	3
Опытная	250	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3
Опытная	500	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3
Опытная	1000	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3
7-й день													
Контрольная	0	25,45 ± 3,52	0,63	21	34,15 ± 6,13	0,57	10	24,36 ± 24,36	1,73	3	14,04 ± 14,04	1,73	3
Опытная	125	33,40 ± 1,24	0,44	139	43,48 ± 0,77	0,16	85	89,00 ± 3,12	0,07	3	60,98 ± 7,17	0,20	3
Опытная	250	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3
Опытная	500	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3
Опытная	1000	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3
8-й день													
Контрольная	0	19,69 ± 5,23	0,88	11	24,30 ± 10,95	1,01	5	3,75 ± 3,75	1,73	3	11,11 ± 11,11	1,73	3
Опытная	125	28,33 ± 2,18	0,57	55	44,35 ± 1,88	0,20	23	66,39 ± 16,97	0,44	3	50,33 ± 14,85	0,51	3
Опытная	250	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3
Опытная	500	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3
Опытная	1000	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3
9-й день													
Контрольная	0	00,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3
Опытная	125	26,06 ± 1,60*	0,51	68	40,08 ± 1,13*	0,14	25	34,35 ± 11,04	0,56	3	43,10 ± 12,90	0,52	3
Опытная	250	00,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3
Опытная	500	00,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3
Опытная	1000	00,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3
10-й день													
Контрольная	0	00,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3
Опытная	125	22,71 ± 4,77	0,7	11	30,11 ± 8,49	0,63	5	29,27 ± 23,16	1,37	3	25,00 ± 14,43	1,0	3
Опытная	250	00,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3
Опытная	500	00,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3
Опытная	1000	00,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3

11-й день													
Контрольная	0	00,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 00,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3
Опытная	125	00,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3
Опытная	250	00,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3
Опытная	500	00,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3
Опытная	1000	00,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3
12-й день													
Контрольная	0	00,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 00,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3
Опытная	125	00,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3
Опытная	250	00,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3
Опытная	500	00,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3
Опытная	1000	00,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3
13-й день													
Контрольная	0	00,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 00,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3
Опытная	125	00,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3
Опытная	250	00,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3
Опытная	500	00,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3
Опытная	1000	00,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3

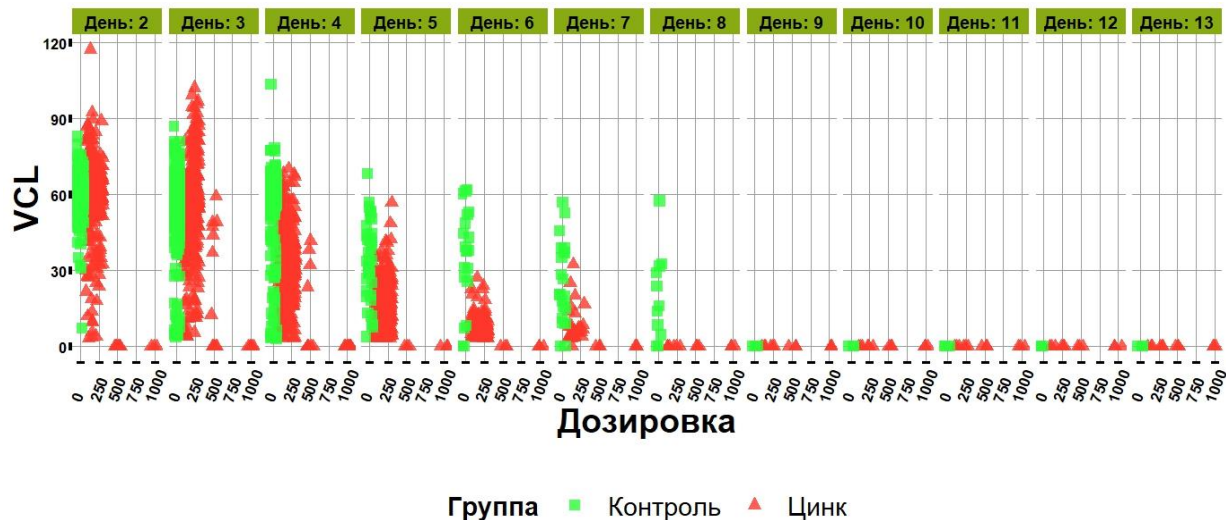


Рис. 21. Диаграмма одномерного рассеяния и размахов изменения общей средней криволинейной скорости (VCL, мкм/с) сперматозоидов ленского осетра под влиянием цинка в период краткосрочного хранения

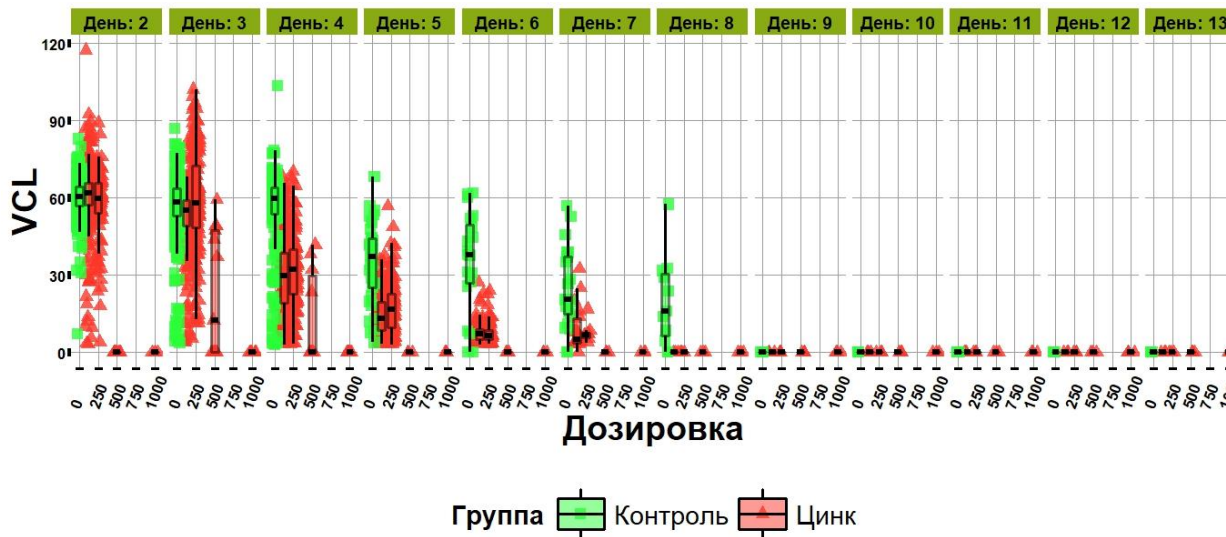


Рис. 22. Совмещенная диаграмма одномерного рассеяния и размахов изменения общей средней криволинейной скорости (VCL, $\mu\text{м/с}$) сперматозоидов ленского осетра под влиянием цинка в период краткосрочного хранения

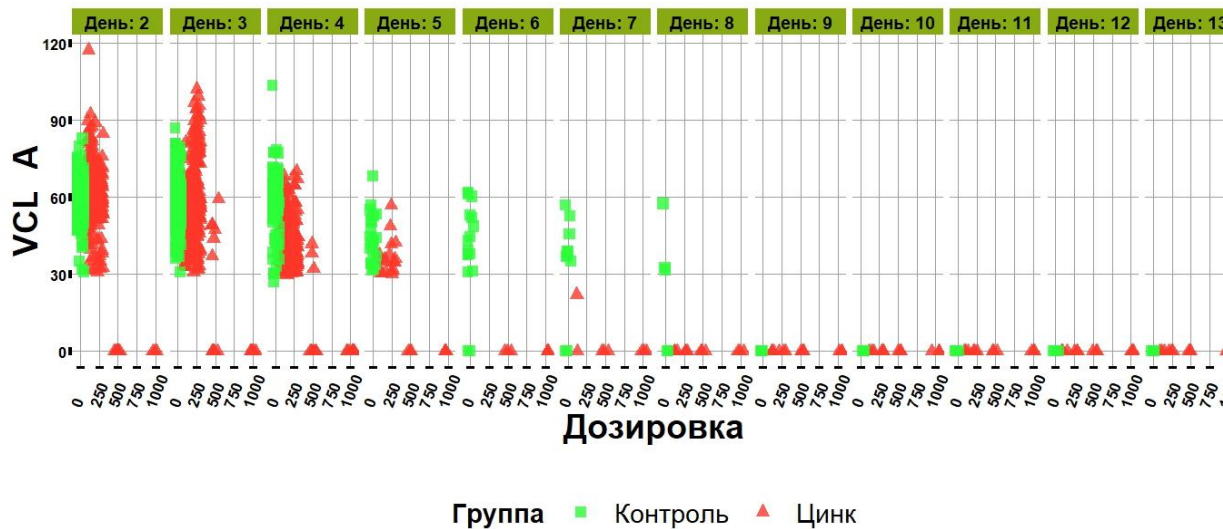


Рис. 23. Диаграмма одномерного рассеяния и размахов изменения средней криволинейной скорости (VCL, $\mu\text{m/s}$) сперматозоидов категории А ленского осетра под влиянием цинка в период краткосрочного хранения

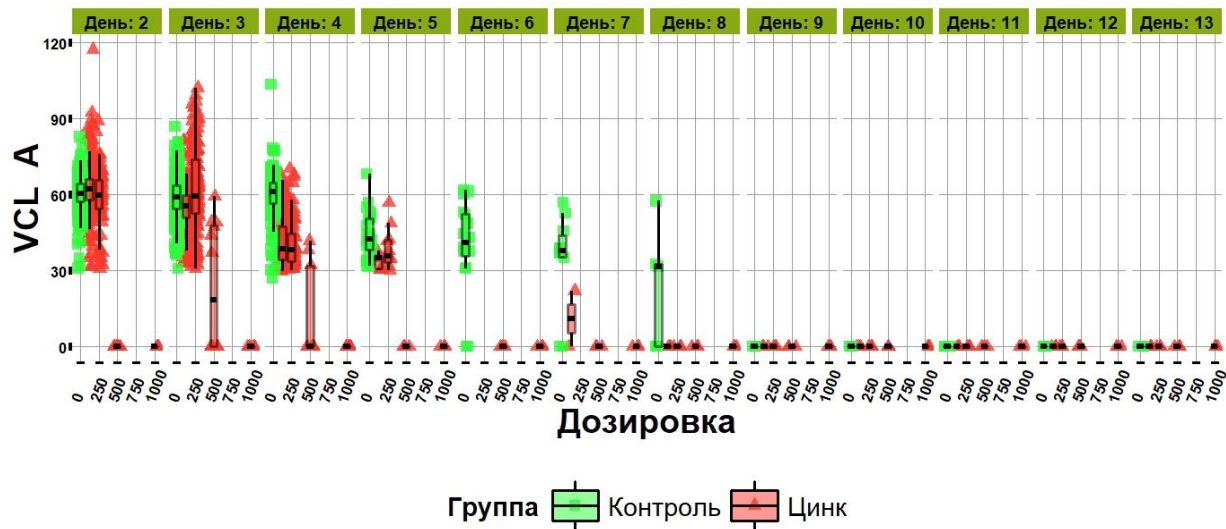


Рис. 24. Совмещенная диаграмма одномерного рассеяния и размахов изменения средней криволинейной скорости (VCL, мкм/с) сперматозоидов категории А ленского осетра под влиянием цинка в период краткосрочного хранения

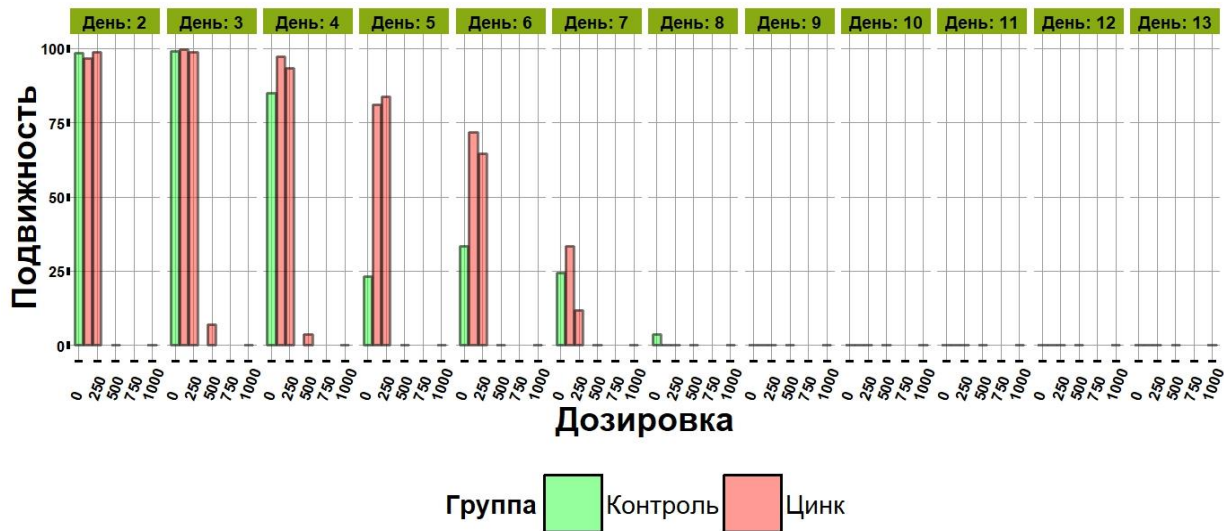


Рис. 25. Диаграмма изменения средней общей подвижности (%) сперматозоидов ленского осетра под влиянием цинка в период краткосрочного хранения

Доля сперматозоидов А

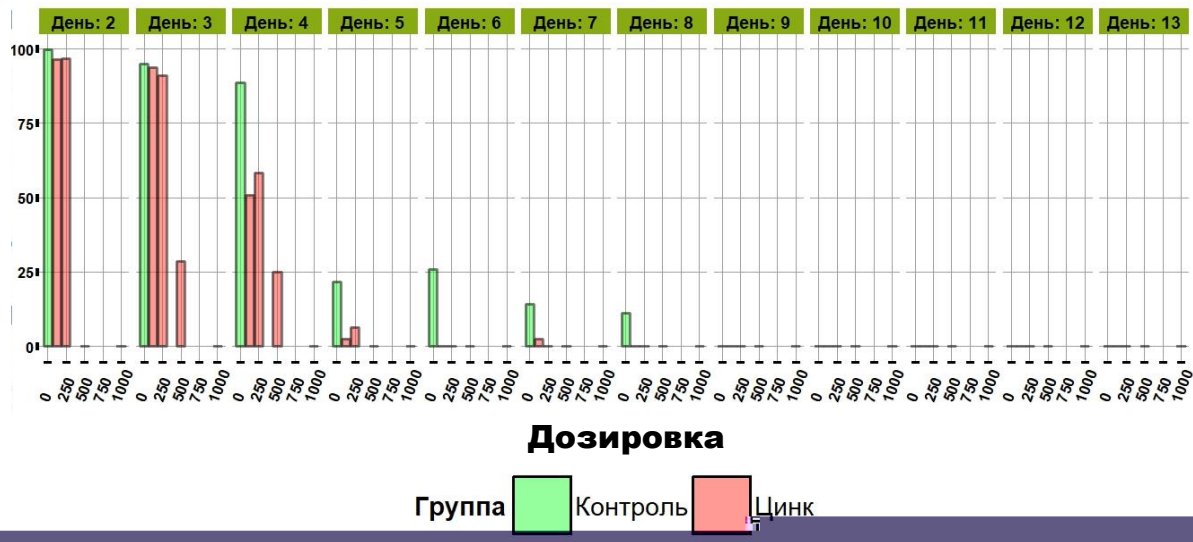


Рис. 26. Диаграмма изменения доли сперматозоидов категории А в средней общей подвижности (%) сперматозоидов ленского осетра под влиянием цинка в период краткосрочного хранения

Таблица 6. Влияние цинка на параметры подвижности сперматозоидов ленского осетра в период краткосрочного хранения в условиях *in vitro*

Группа	Дозировка цинка, мг/л	VCL, мкм/с			VCL (A), мкм/с			Подвижность, %			Доля сперматозоидов (A), %		
		Mean ± SE	C _v , %	n	Mean ± SE	C _v , %	n	Mean ± SE	C _v , %	n	Mean ± SE	C _v , %	n
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
2-й день													
Контрольная	0	59,90 ± 0,52	0,13	238	60,13 ± 0,47	0,12	237	98,44 ± 1,15	0,02	3	99,71 ± 0,29	0,01	3
Опытная	125	60,68 ± 0,65	0,21	374	62,38 ± 0,48	0,14	360	96,81 ± 1,65	0,03	3	96,43 ± 1,06	0,02	3
Опытная	250	57,6 ± 1,11	0,22	132	59,09 ± 0,92	0,17	127	98,65 ± 0,77	0,01	3	96,67 ± 1,12	0,02	3
Опытная	500	0,00 ± 0,00	—	9	0,00 ± 0,00	—	9	0,00 ± 0,00	—	3	0,00 ± 0,00	—	3
Опытная	1000	0,00 ± 0,00	—	3	0,00 ± 0,00	—	3	0,00 ± 0,00	—	3	0,00 ± 0,00	—	3
3-й день													
Контрольная	0	56,11 ± 0,75	0,24	323	58,86 ± 0,45	0,13	304	99,15 ± 0,85	0,01	3	95,00 ± 1,82	0,03	3
Опытная	125	52,11 ± 0,76***	0,24	272	54,68 ± 0,49***	0,14	254	99,69 ± 0,31	0,01	3	93,63 ± 3,12	0,06	3
Опытная	250	58,40 ± 1,40	0,34	195	62,02 ± 1,19	0,26	179	98,87 ± 1,13	0,02	3	91,05 ± 3,23	0,06	3
Опытная	500	22,94 ± 6,79***	1,07	13	23,81 ± 7,32***	1,06	12	6,86 ± 6,86	1,73	3	28,57 ± 28,57	1,73	3
Опытная	1000	0,00 ± 0,00	—	6	0,00 ± 0,00	—	6	0,00 ± 0,00	—	3	0,00 ± 0,00	—	3
4-й день													
Контрольная	0	54,50 ± 1,22	0,31	199	59,83 ± 0,68	0,15	176	85,06 ± 9,97	0,20	3	88,64 ± 1,45	0,03	3
Опытная	125	30,07 ± 0,88***	0,47	254	41,65 ± 0,82***	0,22	126	97,15 ± 1,59	0,03	3	50,72 ± 10,13	0,35	3
Опытная	250	31,87 ± 1,11***	0,43	155	40,79 ± 1,01***	0,24	90	93,32 ± 2,23	0,04	3	58,36 ± 5,55	0,16	3
Опытная	500	13,52 ± 5,71***	1,34	10	12,43 ± 6,27***	1,51	9	3,70 ± 3,70	1,73	3	25,00 ± 25,00	1,73	3
Опытная	1000	0,00 ± 0,00	—	9	0,00 ± 0,00	—	9	0,00 ± 0,00	—	3	0,00 ± 0,00	—	3
5-й день													
Контрольная	0	34,91 ± 2,51	0,43	37	44,06 ± 1,83	0,20	24	23,27 ± 23,27	1,73	3	21,62 ± 21,62	1,73	3
Опытная	125	14,56 ± 0,50***	0,52	226	33,64 ± 1,17	0,09	7	81,03 ± 4,59	0,1	3	2,33 ± 1,55	1,15	3
Опытная	250	17,22 ± 0,74***	0,56	169	38,64 ± 2,48	0,21	11	83,70 ± 3,11	0,06	3	6,50 ± 0,42	0,11	3
Опытная	500	0,00 ± 0,00	—	3	0,00 ± 0,00	—	3	0,00 ± 0,00	—	3	0,00 ± 0,00	—	3
Опытная	1000	0,00 ± 0,00	—	3	0,00 ± 0,00	—	3	0,00 ± 0,00	—	3	0,00 ± 0,00	—	3

6-й день													
Контрольная	0	35,31 ± 4,34	0,55	20	39,89 ± 4,63	0,46	16	33,33 ± 33,33	1,73	3	25,93 ± 25,93	1,73	3
Опытная	125	7,96 ± 0,53***	0,56	72	0,00 ± 0,00	–	3	71,64 ± 10,88	0,26	3	0,00 ± 0,00	–	3
Опытная	250	7,41 ± 0,44***	0,53	81	0,00 ± 0,00	–	3	64,45 ± 6,52	0,18	3	0,00 ± 0,00	–	3
Опытная	500	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3
Опытная	1000	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3
7-й день													
Контрольная	0	25,45 ± 3,52	0,63	21	34,15 ± 6,13	0,57	10	24,36 ± 24,36	1,73	3	14,04 ± 14,04	1,73	3
Опытная	125	8,97 ± 1,81**	0,92	21	7,33 ± 7,33	1,73	3	33,42 ± 17,49	0,91	3	2,56 ± 2,56	1,73	3
Опытная	250	7,54 ± 1,23	0,49	9	0,00 ± 0,00	–	3	11,89 ± 5,29	0,77	3	0,00 ± 0,00	–	3
Опытная	500	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–		0,00 ± 0,00	–	3
Опытная	1000	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–		0,00 ± 0,00	–	3
8-й день													
Контрольная	0	19,69 ± 5,23	0,88	11	24,30 ± 10,95	1,01	5	3,75 ± 3,75	1,73	3	11,11 ± 11,11	1,73	3
Опытная	125	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3
Опытная	250	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3
Опытная	500	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3
Опытная	1000	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3
9-й день													
Контрольная	0	00,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3
Опытная	125	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3
Опытная	250	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3
Опытная	500	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3
Опытная	1000	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3
10-й день													
Контрольная	0	00,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3
Опытная	125	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3
Опытная	250	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3
Опытная	500	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3
Опытная	1000	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3	0,00 ± 0,00	–	3

Окончание табл. 6

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
11-й день													
Контрольная	0	00,00 ± 0,00	—	3	0,00 ± 0,00	—	3	0,00 ± 00,00	—	3	0,00 ± 0,00	—	3
Опытная	125	0,00 ± 0,00	—	3	0,00 ± 0,00	—	3	0,00 ± 0,00	—	3	0,00 ± 0,00	—	3
Опытная	250	0,00 ± 0,00	—	3	0,00 ± 0,00	—	3	0,00 ± 0,00	—	3	0,00 ± 0,00	—	3
Опытная	500	0,00 ± 0,00	—	3	0,00 ± 0,00	—	3	0,00 ± 0,00	—	3	0,00 ± 0,00	—	3
Опытная	1000	0,00 ± 0,00	—	3	0,00 ± 0,00	—	3	0,00 ± 0,00	—	3	0,00 ± 0,00	—	3
12-й день													
Контрольная	0	00,00 ± 0,00	—	3	0,00 ± 0,00	—	3	0,00 ± 00,00	—	3	0,00 ± 0,00	—	3
Опытная	125	0,00 ± 0,00	—	3	0,00 ± 0,00	—	3	0,00 ± 0,00	—	3	0,00 ± 0,00	—	3
Опытная	250	0,00 ± 0,00	—	3	0,00 ± 0,00	—	3	0,00 ± 0,00	—	3	0,00 ± 0,00	—	3
Опытная	500	0,00 ± 0,00	—	3	0,00 ± 0,00	—	3	0,00 ± 0,00	—	3	0,00 ± 0,00	—	3
Опытная	1000	0,00 ± 0,00	—	3	0,00 ± 0,00	—	3	0,00 ± 0,00	—	3	0,00 ± 0,00	—	3
13-й день													
Контрольная	0	00,00 ± 0,00	—	3	0,00 ± 0,00	—	3	0,00 ± 00,00	—	3	0,00 ± 0,00	—	3
Опытная	125	0,00 ± 0,00	—	3	0,00 ± 0,00	—	3	0,00 ± 0,00	—	3	0,00 ± 0,00	—	3
Опытная	250	0,00 ± 0,00	—	3	0,00 ± 0,00	—	3	0,00 ± 0,00	—	3	0,00 ± 0,00	—	3
Опытная	500	0,00 ± 0,00	—	3	0,00 ± 0,00	—	3	0,00 ± 0,00	—	3	0,00 ± 0,00	—	3
Опытная	1000	0,00 ± 0,00	—	3	0,00 ± 0,00	—	3	0,00 ± 0,00	—	3	0,00 ± 0,00	—	3

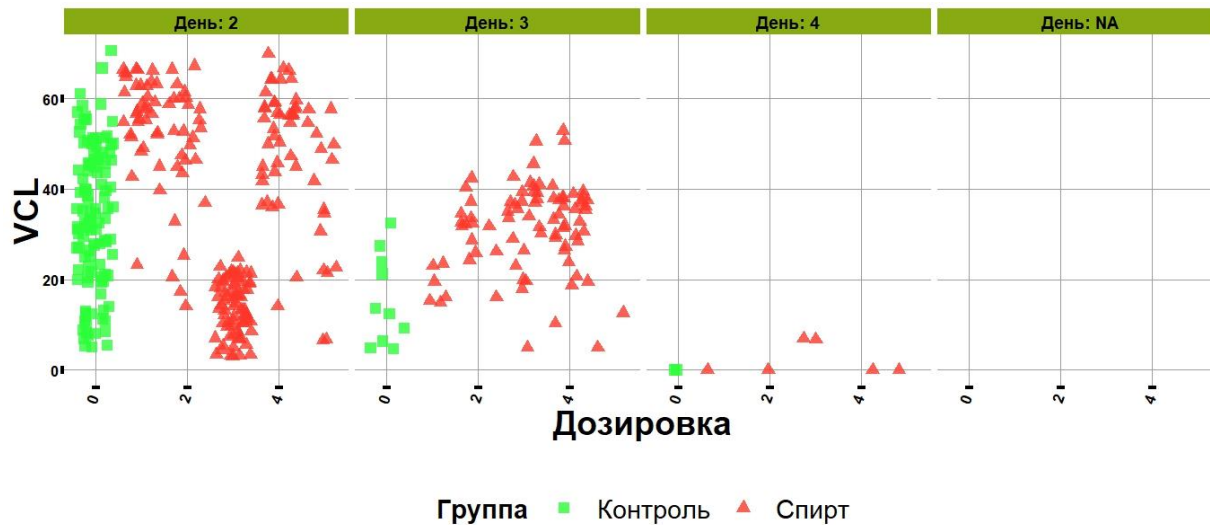


Рис. 27. Диаграмма одномерного рассеяния и размахов изменения общей средней криволинейной скорости (VCL, мкм/с) сперматозоидов ленского осетра под влиянием спирта в период краткосрочного хранения

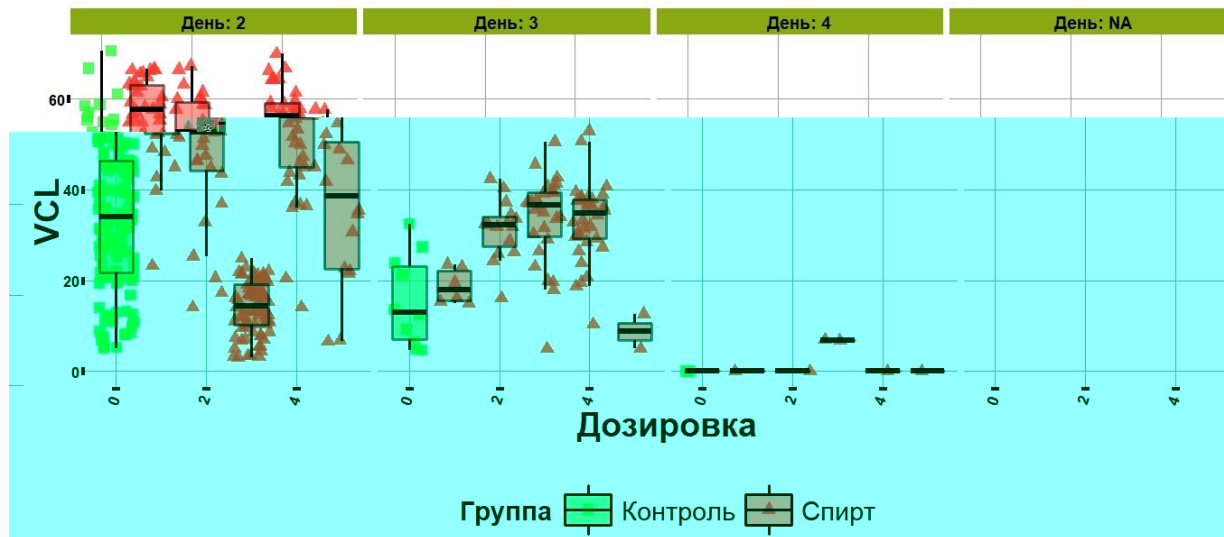


Рис. 28. Совмещенная диаграмма одномерного рассеяния и размахов изменения общей средней криволинейной скорости (VCL, мкм/с) сперматозоидов ленского осетра под влиянием спирта в период краткосрочного хранения

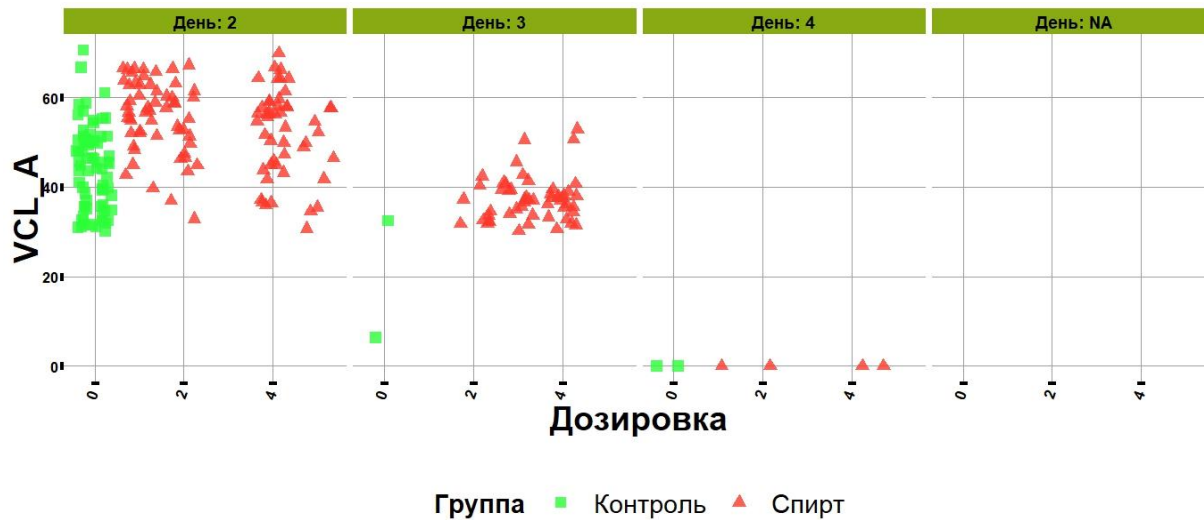


Рис. 29. Диаграмма одномерного рассеяния и размахов изменения средней криволинейной скорости (VCL, мкм/с) сперматозоидов категории А ленского осетра под влиянием спирта в период краткосрочного хранения

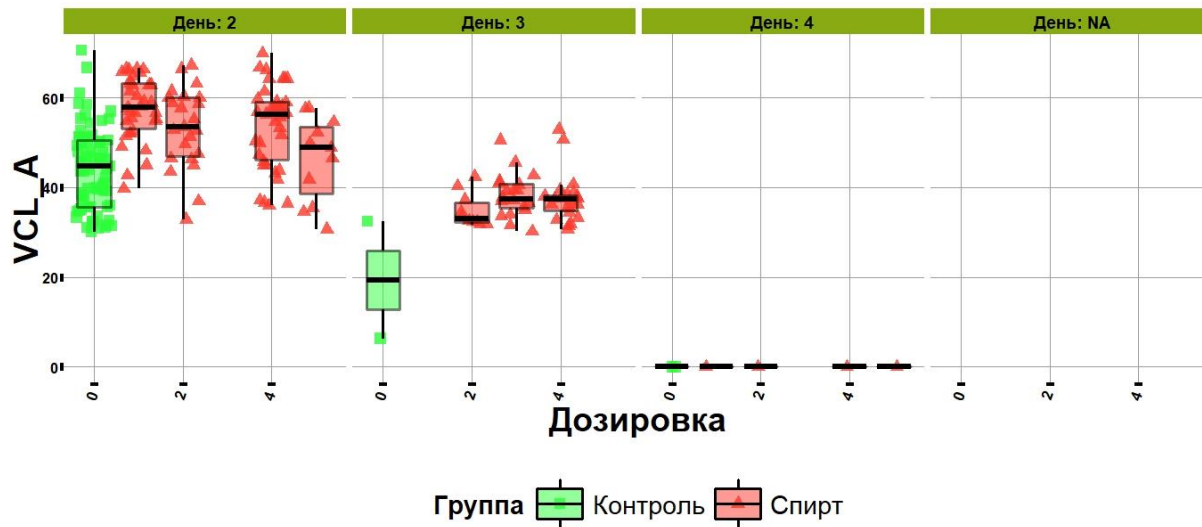


Рис. 30. Совмещенная диаграмма одномерного рассеяния и размахов изменения средней криволинейной скорости (VCL, мкм/с) сперматозоидов категории А ленокского осетра под влиянием спирта в период краткосрочного хранения



Рис. 31. Диаграмма изменения средней общей подвижности (%) сперматозоидов ленского осетра под влиянием спирта в период краткосрочного хранения

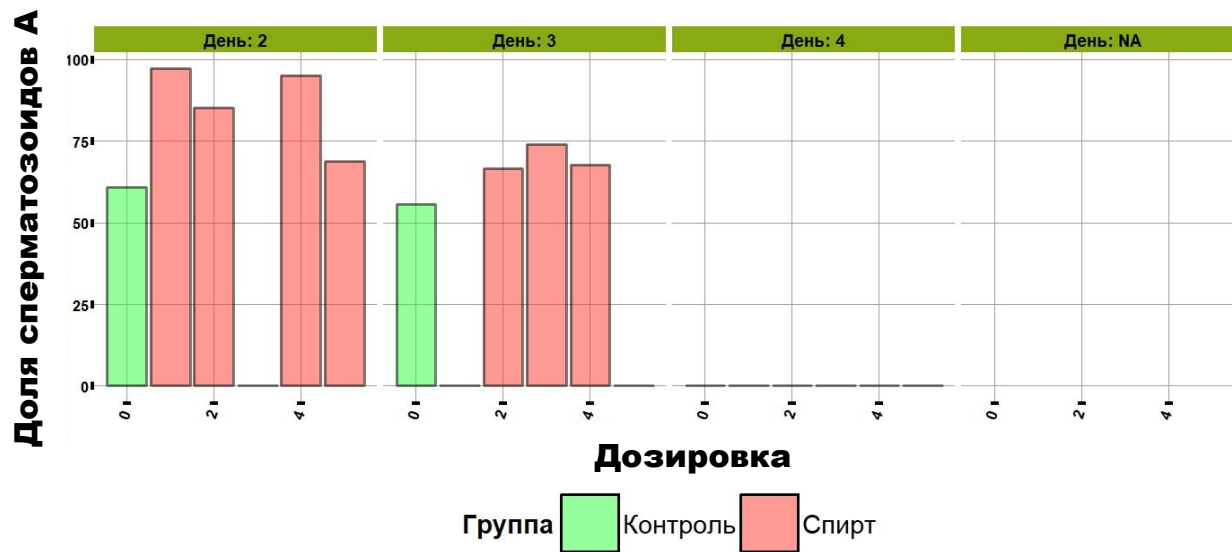


Рис. 32. Диаграмма изменения доли сперматозоидов категории А в средней общей подвижности (%) сперматозоидов ленского осетра под влиянием спирта в период краткосрочного хранения

Таблица 7. Влияние спирта на параметры подвижности сперматозоидов ленского осетра в период краткосрочного хранения в условиях *in vitro*

Группа	Дозировка спирта, %	VCL, мкм/с			VCL (A), мкм/с			Подвижность, %			Доля сперматозоидов (A), %		
		Mean ± SE	C _v , %	n	Mean ± SE	C _v , %	n	Mean ± SE	C _v , %	n	Mean ± SE	C _v , %	n
2-й день													
Контрольная	0	33,85 ± 1,46	0,46	114	44,25 ± 1,12	0,21	69	97,22 ± 1,31	0,02	2	60,70 ± 1,00	0,02	2
Опытная	1	56,52 ± 1,54***	0,16	35	57,50 ± 1,22***	0,12	34	94,59 ± 0,00	–	1	97,14 ± 0,00	–	1
Опытная	2	48,28 ± 2,86**	0,31	27	53,31 ± 1,858**	0,167	23	100,00 ± 0,00	–	1	85,19 ± 0,00	–	1
Опытная	3	14,04 ± 0,66***	0,41	77	0,00 ± 0,00	–	0	86,52 ± 0,00	–	1	0,00 ± 0,00	–	1
Опытная	4	51,89 ± 1,91***	0,23	40	53,71 ± 1,489***	0,17	38	97,56 ± 0,00	–	1	95,00 ± 0,00	–	1
Опытная	5	36,81 ± 4,27	0,46	16	46,33 ± 2,859	0,20	11	69,57 ± 0,00	–	1	68,75 ± 0,00	–	1
3-й день													
Контрольная	0	15,58 ± 3,15	0,64	10	19,34 ± 13,03	0,95	2	32,14 ± 17,86	0,79	2	55,56 ± 44,44	1,13	2
Опытная	1	18,75 ± 1,57	0,21	6	0,00 ± 0,00	–	0	20,00 ± 0,00	–	1	0,00 ± 0,00	–	1
Опытная	2	31,31 ± 1,69*	0,21	15	34,85 ± 1,21	0,11	10	93,75 ± 0,00	–	1	66,67 ± 0,00	–	1
Опытная	3	33,57 ± 1,88***	0,29	27	38,26 ± 1,06	0,12	20	84,38 ± 0,00	–	1	74,07 ± 0,00	–	1
Опытная	4	33,11 ± 1,44**	0,25	34	37,467 ± 1,09	0,14	23	97,14 ± 0,00	–	1	67,65 ± 0,00	–	1
Опытная	5	8,79 ± 3,83	0,62	2	0,00 ± 0,00	–	0	6,45 ± 0,00	–	1	0,00 ± 0,00	–	1
4-й день													
Контрольная	0	0,00 ± 0,00	–	2	0,00 ± 0,00	–	2	0,00 ± 0,00	–	2	0,00 ± 0,00	–	2
Опытная	1	0,00 ± 0,00	–	1	0,00 ± 0,00	–	1	0,00 ± 0,00	–	1	0,00 ± 0,00	–	1
Опытная	2	0,00 ± 0,00	–	1	0,00 ± 0,00	–	1	0,00 ± 0,00	–	1	0,00 ± 0,00	–	1
Опытная	3	6,82 ± 0,13	0,03	2	0,00 ± 0,00	–	0	28,57 ± 0,00	–	1	0,00 ± 0,00	–	1
Опытная	4	0,00 ± 0,00	–	1	0,00 ± 0,00	–	1	0,00 ± 0,00	–	1	0,00 ± 0,00	–	1
Опытная	5	0,00 ± 0,00	–	1	0,00 ± 0,00	–	1	0,00 ± 0,00	–	1	0,00 ± 0,00	–	1

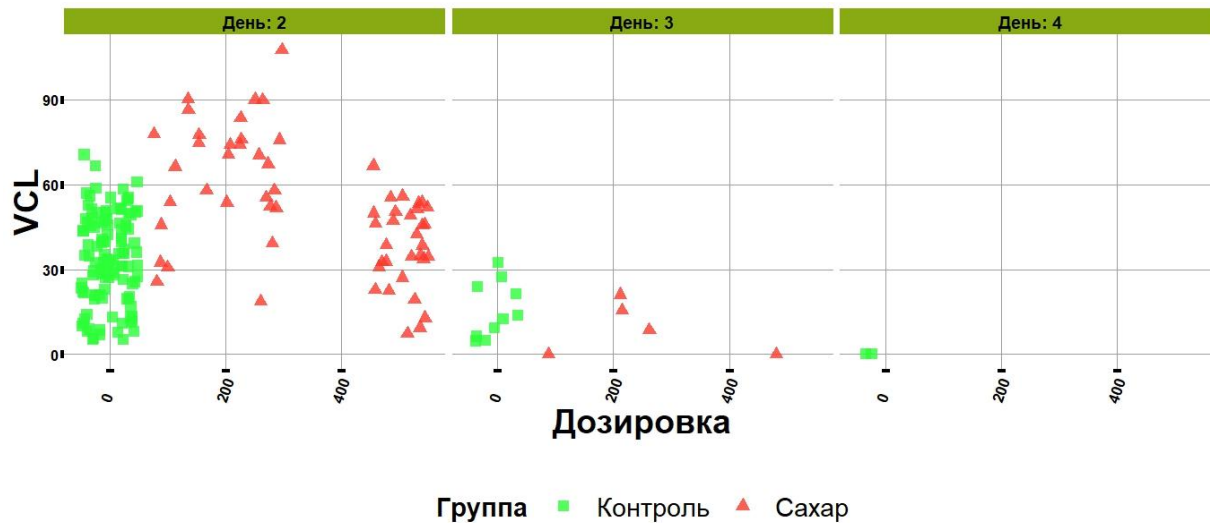


Рис. 33. Диаграмма одномерного рассеяния и размахов изменения общей средней криволинейной скорости (VCL, мкм/с) сперматозоидов ленского осетра под влиянием сахара в период краткосрочного хранения

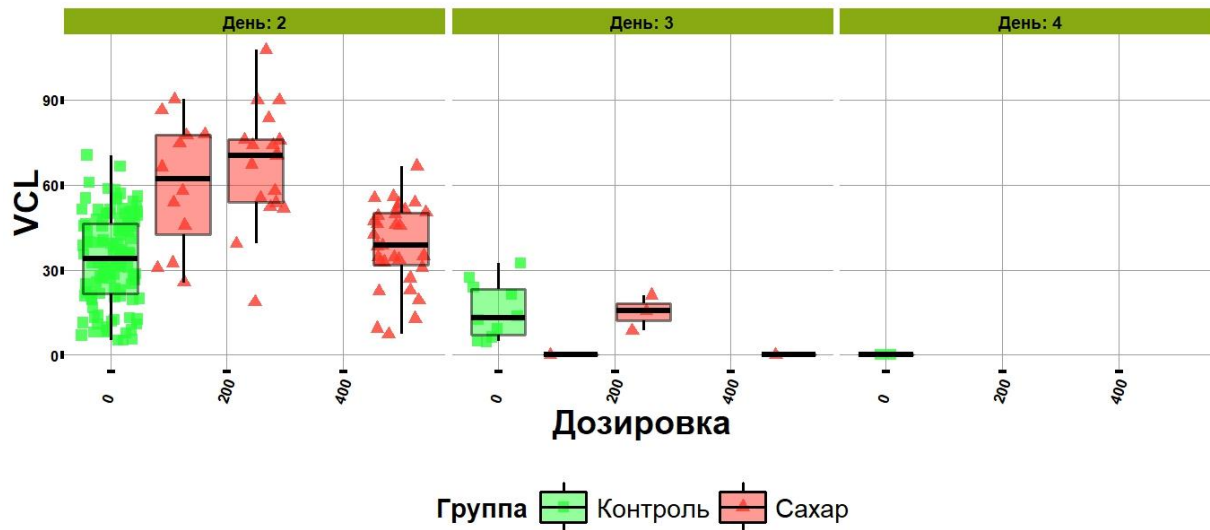


Рис. 34. Совмещенная диаграмма одномерного рассеяния и размахов изменения общей средней криволинейной скорости (VCL, мкм/с) сперматозоидов ленского осетра под влиянием сахара в период краткосрочного хранения

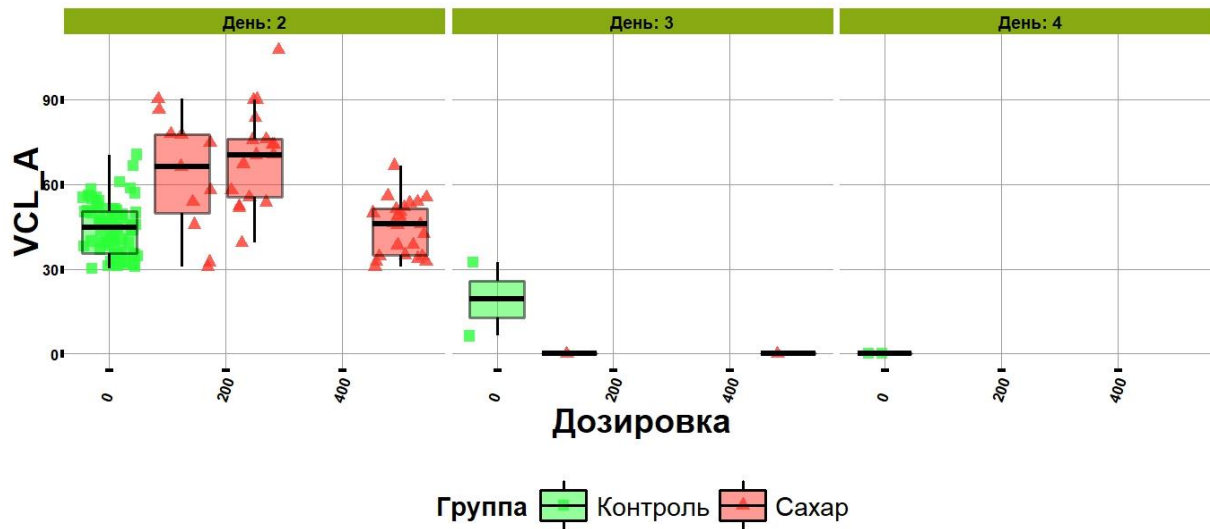


Рис. 35. Диаграмма одномерного рассеяния и размахов изменения средней криволинейной скорости (VCL, мкм/с) сперматозоидов категории А ленского осетра под влиянием сахара в период краткосрочного хранения

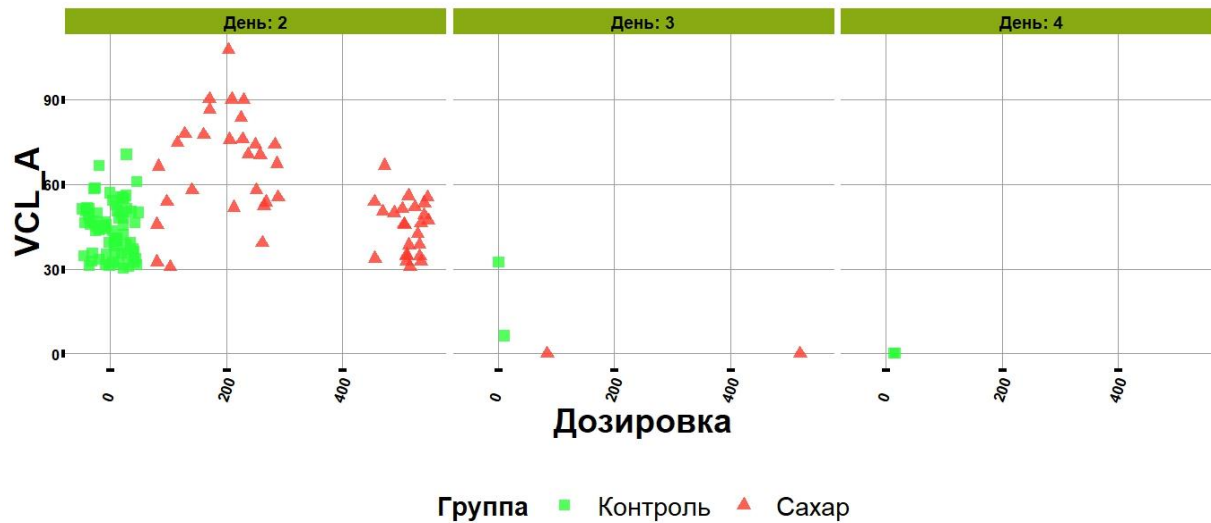


Рис. 36. Совмещенная диаграмма одномерного рассеяния и размахов изменения средней криволинейной скорости (VCL, $\mu\text{m/s}$) сперматозоидов категории А ленокского осетра под влиянием сахара в период краткосрочного хранения

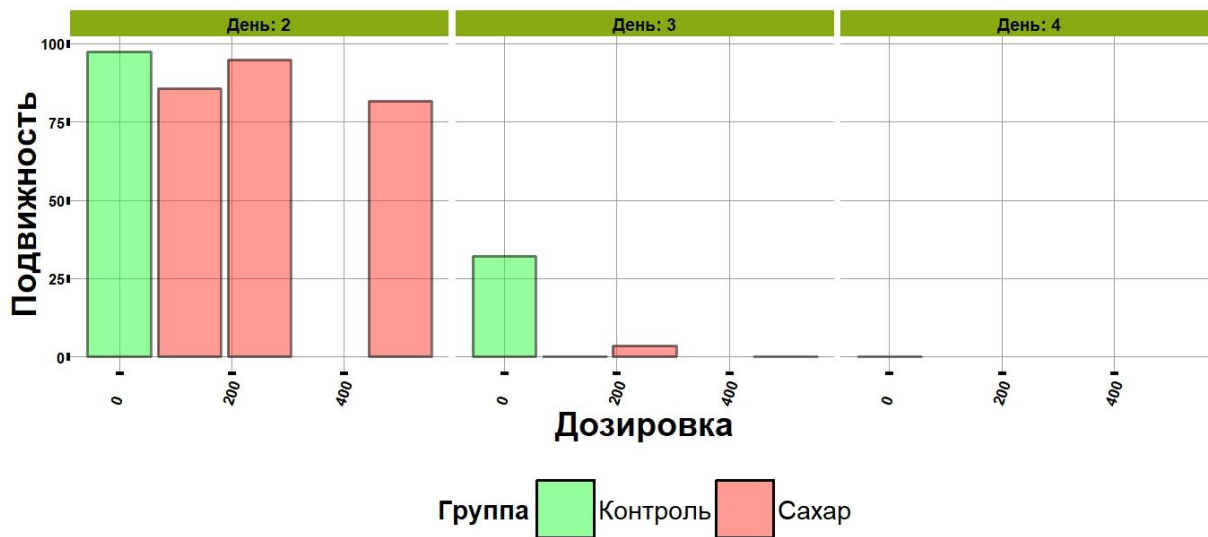


Рис. 37. Диаграмма изменения средней общей подвижности (%) сперматозоидов ленского осетра под влиянием сахара в период краткосрочного хранения

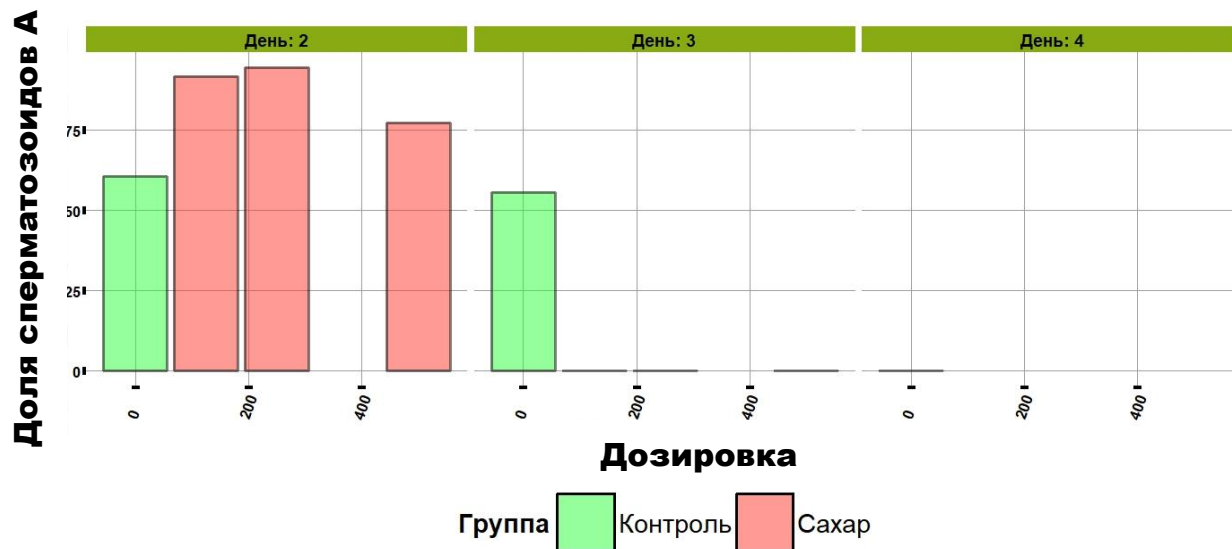


Рис. 38. Диаграмма изменения доли сперматозоидов категории А в средней общей подвижности (%) сперматозоидов ленского осетра под влиянием сахара в период краткосрочного хранения

Таблица 8. Влияние сахара на параметры подвижности сперматозоидов ленского осетра в период краткосрочного хранения в условиях *in vitro*

Группа	Дозировка сахара, мг/л	VCL, мкм/с			VCL (A), мкм/с			Подвижность, %			Доля сперматозоидов (A), %		
		Mean ± SE	C _v , %	n	Mean ± SE	C _v , %	n	Mean ± SE	C _v , %	n	Mean ± SE	C _v , %	n
2-й день													
Контрольная	0	33,85 ± 1,46	0,46	114	44,25 ± 1,12	0,21	69	97,22 ± 1,31	0,02	2	60,70 ± 1,0	0,02	2
Опытная	125	59,92 ± 6,48**	0,37	12	63,05 ± 6,22*	0,33	11	85,71 ± 0,00	–	1	91,67 ± 0,00	–	1
Опытная	250	67,09 ± 4,86***	0,31	18	69,94 ± 4,17***	0,25	17	94,74 ± 0,00	–	1	94,44 ± 0,00	–	1
Опытная	500	38,58 ± 2,64	0,38	31	44,80 ± 1,92	0,21	24	81,58 ± 0,00	–	1	77,42 ± 0,00	–	1
3-й день													
Контрольная	0	15,58 ± 3,15	0,64	10	19,34 ± 13,03	0,95	2	32,14 ± 17,86	0,79	2	55,56 ± 44,44	1,13	2
Опытная	125	0,00 ± 0,00	–	1	0,00 ± 0,00	–	1	0,00 ± 0,00	–	1	0,00 ± 0,00	–	1
Опытная	250	15,01 ± 3,62	0,42	3	0,00 ± 0,00	–	0	3,44 ± 0,00	–	1	0,00 ± 0,00	–	1
Опытная	500	0,00 ± 0,00	–	1	0,00 ± 0,00	–	1	0,00 ± 0,00	–	1	0,00 ± 0,00	–	1
4-й день													
Контрольная	0	0,00 ± 0,00	–	–	0,00 ± 0,00	–	–	0,00 ± 0,00	–	–	0,00 ± 0,00	–	–
Опытная	125	0,00 ± 0,00	–	–	0,00 ± 0,00	–	–	0,00 ± 0,00	–	–	0,00 ± 0,00	–	–
Опытная	250	0,00 ± 0,00	–	–	0,00 ± 0,00	–	–	0,00 ± 0,00	–	–	0,00 ± 0,00	–	–
Опытная	500	0,00 ± 0,00	–	–	0,00 ± 0,00	–	–	0,00 ± 0,00	–	–	0,00 ± 0,00	–	–

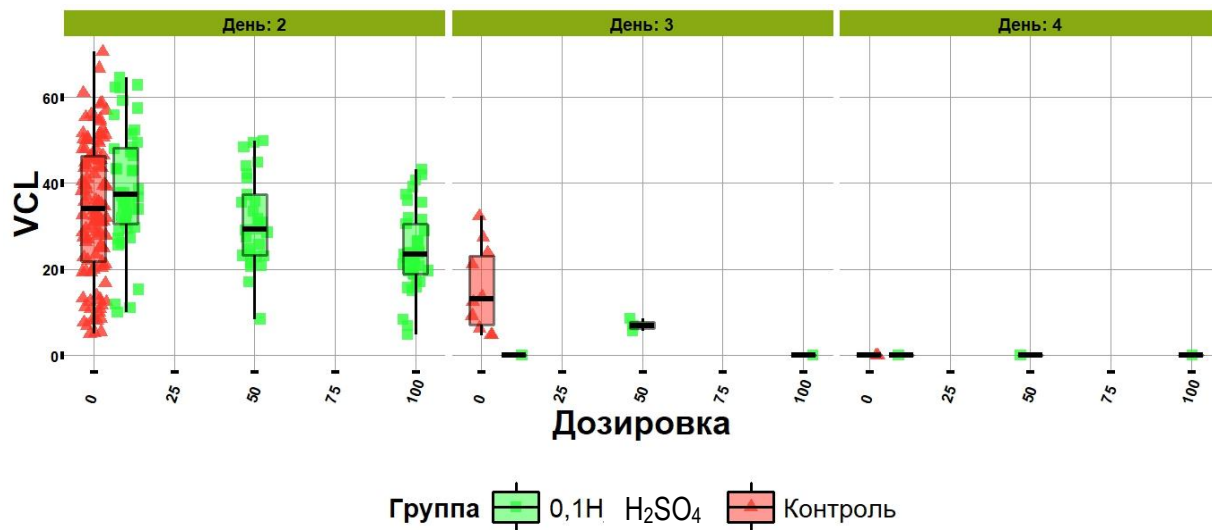


Рис. 39. Совмещенная диаграмма одномерного рассеяния и размахов изменения общей средней криволинейной скорости (VCL, мкм/с) сперматозоидов ленского осетра под влиянием H_2SO_4 (0,1 N) в период краткосрочного хранения

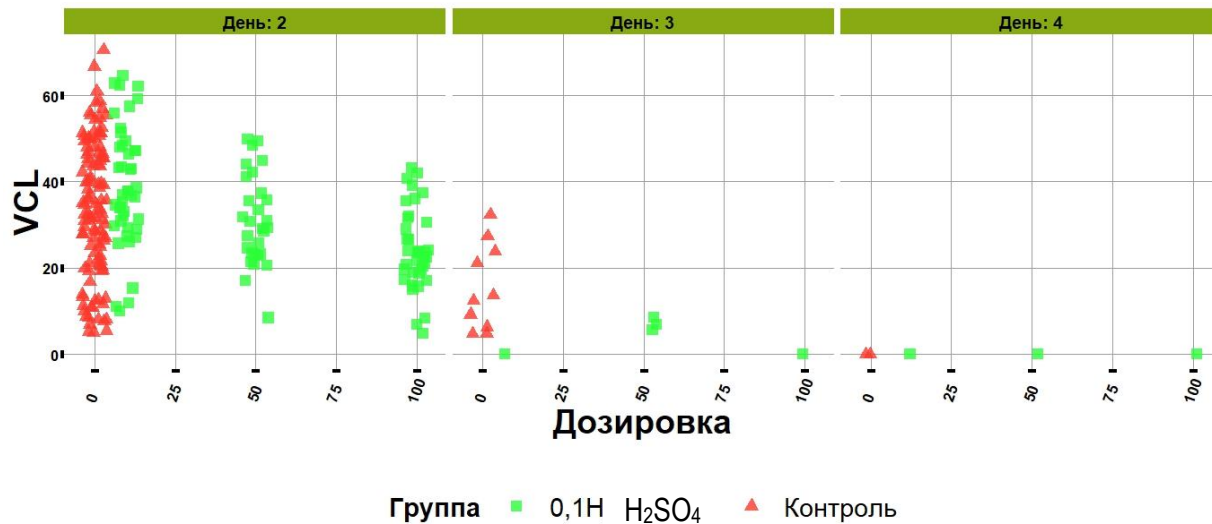


Рис. 40. Диаграмма одномерного рассеяния и размахов изменения общей средней криволинейной скорости (VCL, мкм/с) сперматозоидов ленского осетра под влиянием H₂SO₄ (0,1 N) в период краткосрочного хранения

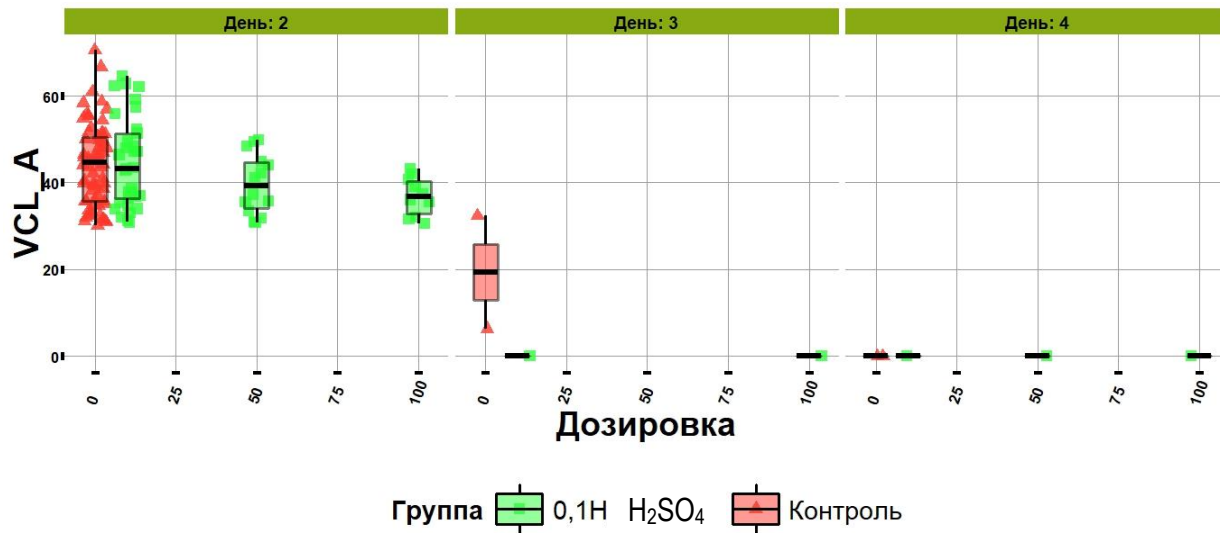


Рис. 41. Совмещенная диаграмма одномерного рассеяния и размахов изменения средней криволинейной скорости (VCL, мкм/с) сперматозоидов категории А ленского осетра под влиянием H₂SO₄ (0,1 Н) в период краткосрочного хранения

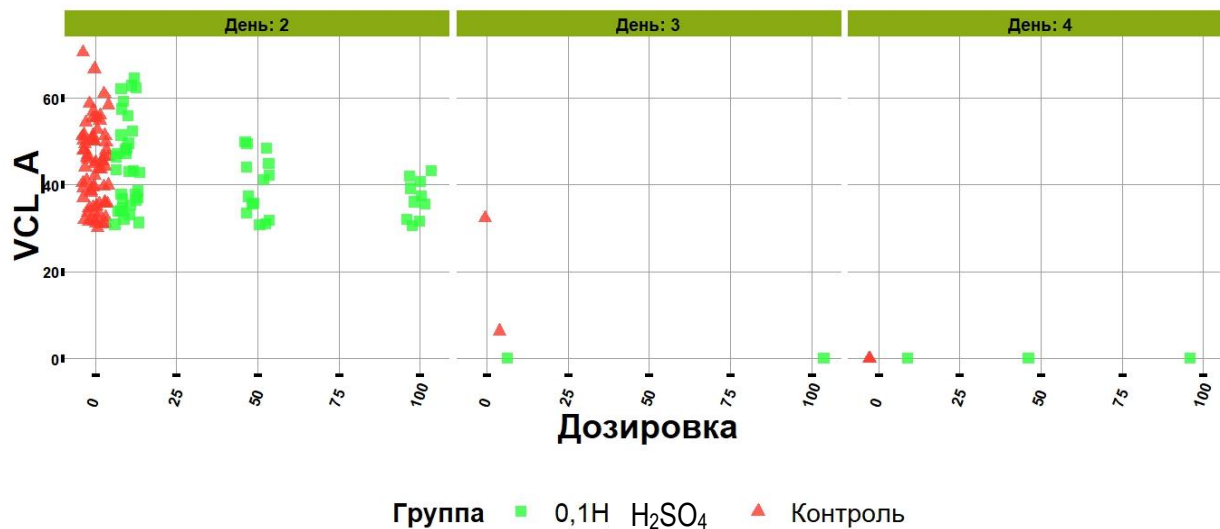


Рис. 42. Диаграмма одномерного рассеяния и размахов изменения средней криволинейной скорости (VCL, мкм/с) сперматозоидов категории А ленокского осетра под влиянием H₂SO₄ (0,1 Н) в период краткосрочного хранения

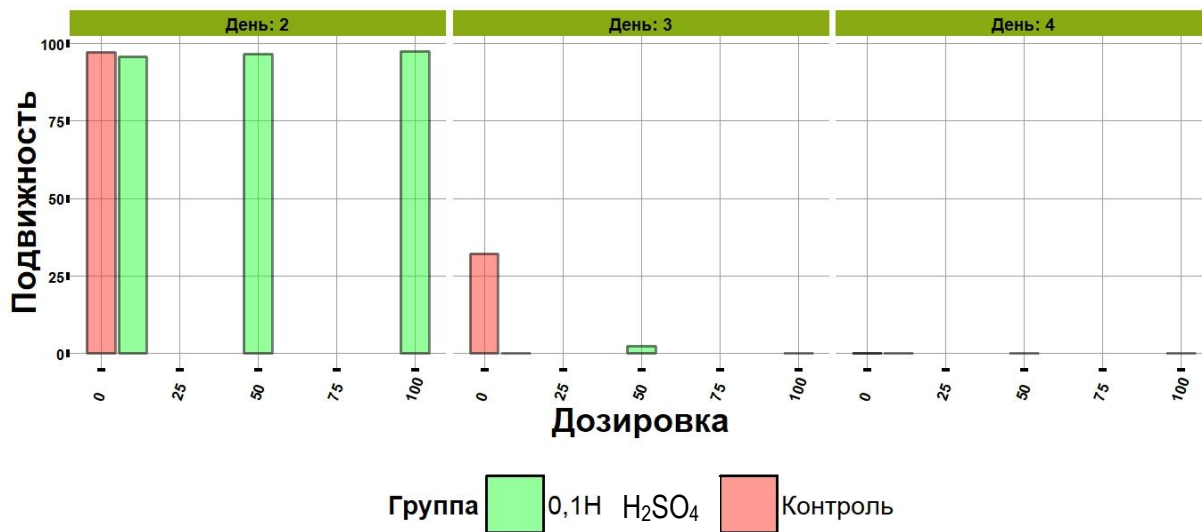


Рис. 43. Диаграмма изменения средней общей подвижности (%) сперматозоидов ленского осетра под влиянием H₂SO₄ (0,1 N) в период краткосрочного хранения

Доля сперматозоидов А

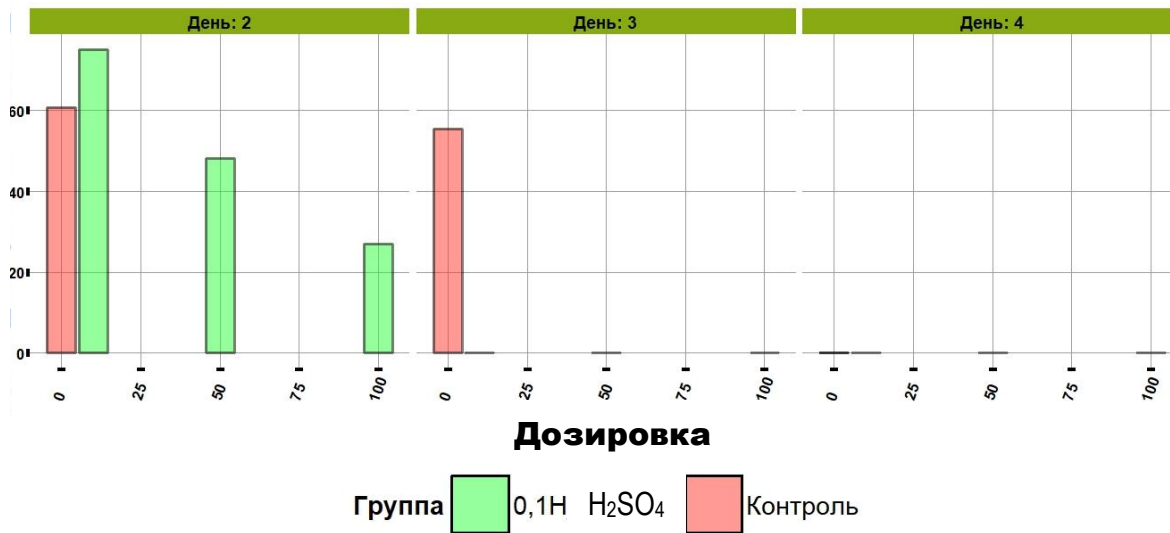


Рис. 44. Диаграмма изменения доли сперматозоидов категории А в средней общей подвижности (%) сперматозоидов ленского осетра под влиянием H₂SO₄ (0,1 Н) в период краткосрочного хранения

Таблица 9. Влияние H₂SO₄ (0,1 Н) на параметры подвижности сперматозоидов ленского осетра в период краткосрочного хранения в условиях *in vitro*

Группа	Дозировка H ₂ SO ₄ (0,1 Н), мг/л	VCL, мкм/с			VCL (A), мкм/с			Подвижность, %			Доля сперматозоидов (A), %		
		Mean ± SE	C _v , %	n	Mean ± SE	C _v , %	n	Mean ± SE	C _v , %	n	Mean ± SE	C _v , %	n
2-й день													
Контрольная	0	33,85 ± 1,46	0,46	114	44,25 ± 1,12	0,21	69	97,22 ± 1,31	0,02	2	60,70 ± 1,0	0,02	2
Опытная	10	39,07 ± 2,1	0,36	44	44,75 ± 1,80	0,23	33	95,65 ± 0,00	–	1	75,00 ± 0,00	–	1
Опытная	50	31,09 ± 1,93	0,33	29	39,69 ± 1,85	0,17	14	96,67 ± 0,00	–	1	48,28 ± 0,00	–	1
Опытная	100	24,33 ± 1,55***	0,39	37	36,80 ± 1,41	0,12	10	97,37 ± 0,00	–	1	27,03 ± 0,00	–	1
3-й день													
Контрольная	0	15,58 ± 3,15	0,64	10	19,34 ± 13,03	0,95	2	32,14 ± 17,86	0,79	2	55,56 ± 44,44	1,13	2
Опытная	10	0,00 ± 0,00	–	1	0,00 ± 0,00	–	1	0,00 ± 0,00	–	1	0,00 ± 0,00	–	1
Опытная	50	7,06 ± 0,84	0,21	3	0,00 ± 0,00	–	0	2,46 ± 0,00	–	1	0,00 ± 0,00	–	1
Опытная	100	0,00 ± 0,00	–	1	0,00 ± 0,00	–	1	0,00 ± 0,00	–	1	0,00 ± 0,00	–	1
4-й день													
Контрольная	0	0,00 ± 0,00	–	2	0,00 ± 0,00	–	2	0,00 ± 0,00	–	2	0,00 ± 0,00	–	2
Опытная	10	0,00 ± 0,00	–	1	0,00 ± 0,00	–	1	0,00 ± 0,00	–	1	0,00 ± 0,00	–	1
Опытная	50	0,00 ± 0,00	–	1	0,00 ± 0,00	–	1	0,00 ± 0,00	–	1	0,00 ± 0,00	–	1
Опытная	100	0,00 ± 0,00	–	1	0,00 ± 0,00	–	1	0,00 ± 0,00	–	1	0,00 ± 0,00	–	1

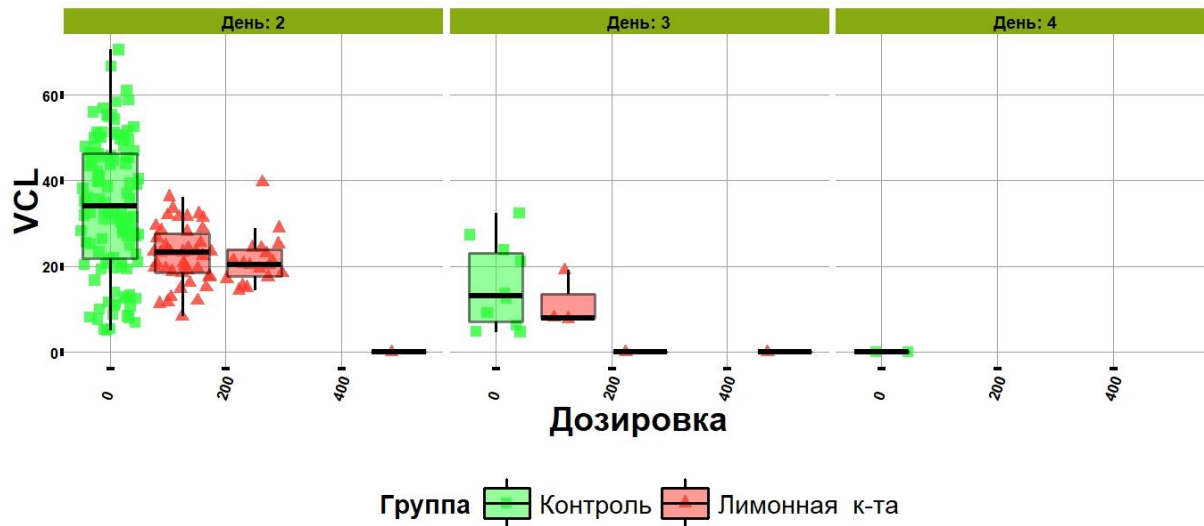


Рис. 45. Совмещенная диаграмма одномерного рассеяния и размахов изменения общей средней криволинейной скорости (VCL, мкм/с) сперматозоидов ленского осетра под влиянием лимонной кислоты в период краткосрочного хранения

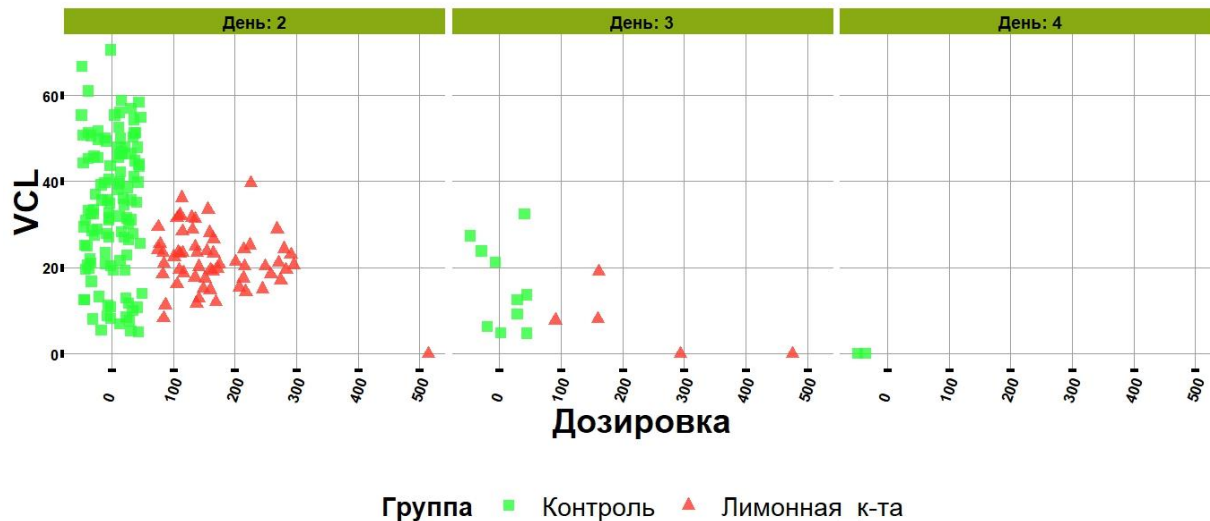


Рис. 46. Диаграмма одномерного рассеяния и размахов изменения общей средней криволинейной скорости (VCL, мкм/с) сперматозоидов ленского осетра под влиянием лимонной кислоты в период краткосрочного хранения

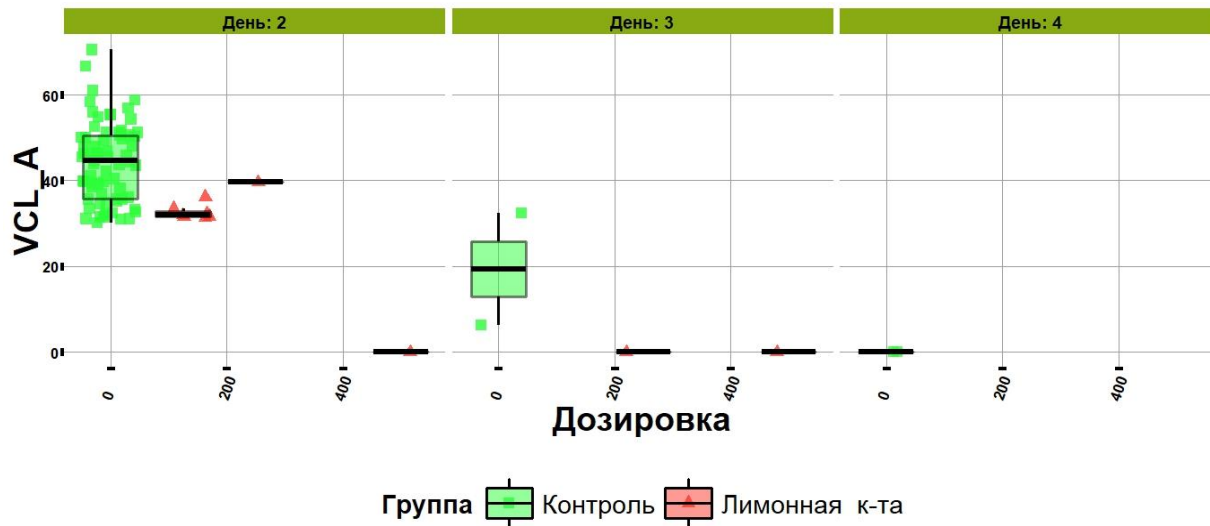


Рис. 47. Совмещенная диаграмма одномерного рассеяния и размахов изменения средней криволинейной скорости (VCL, мкм/с) сперматозоидов категории А ленского осетра под влиянием лимонной кислоты в период краткосрочного хранения

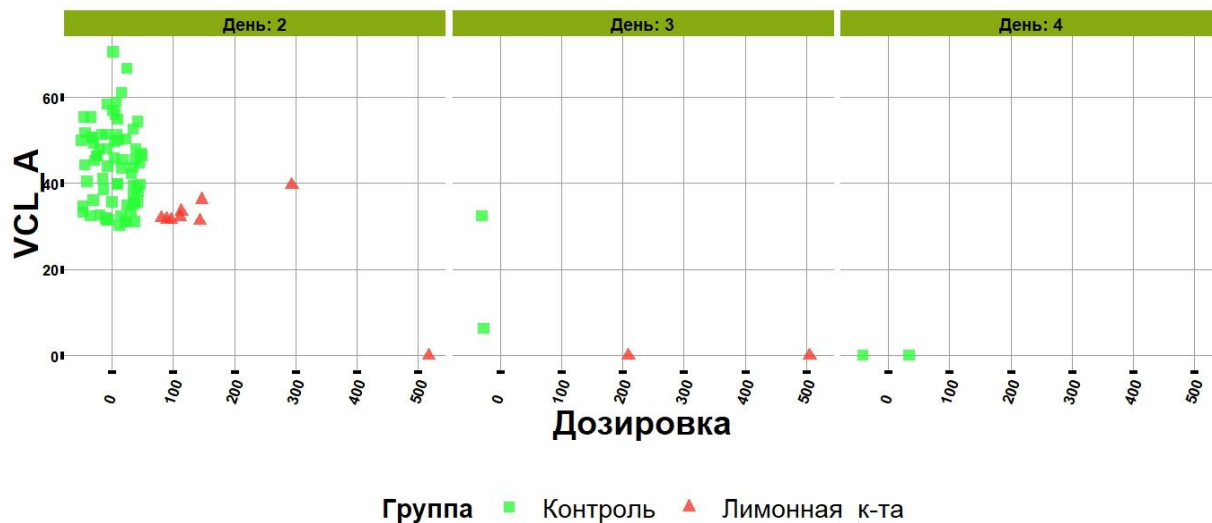


Рис. 48. Диаграмма одномерного рассеяния и размахов изменения средней криволинейной скорости (VCL, $\mu\text{m/s}$) сперматозоидов категории А ленского осетра под влиянием лимонной кислоты в период краткосрочного хранения

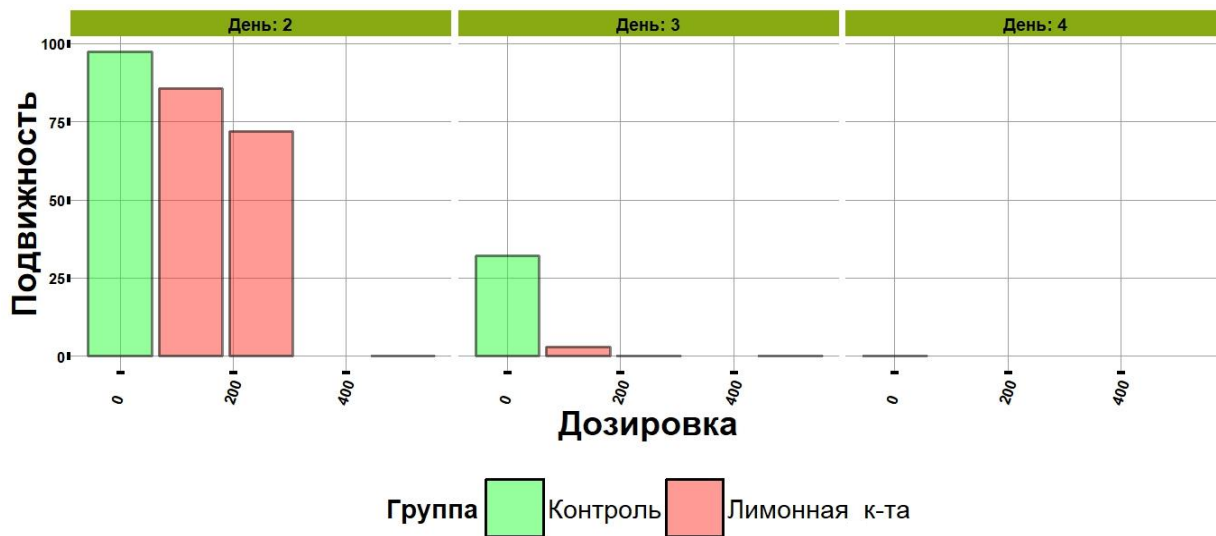


Рис. 49. Диаграмма изменения средней общей подвижности (%) сперматозоидов ленского осетра под влиянием винной кислоты в период краткосрочного хранения

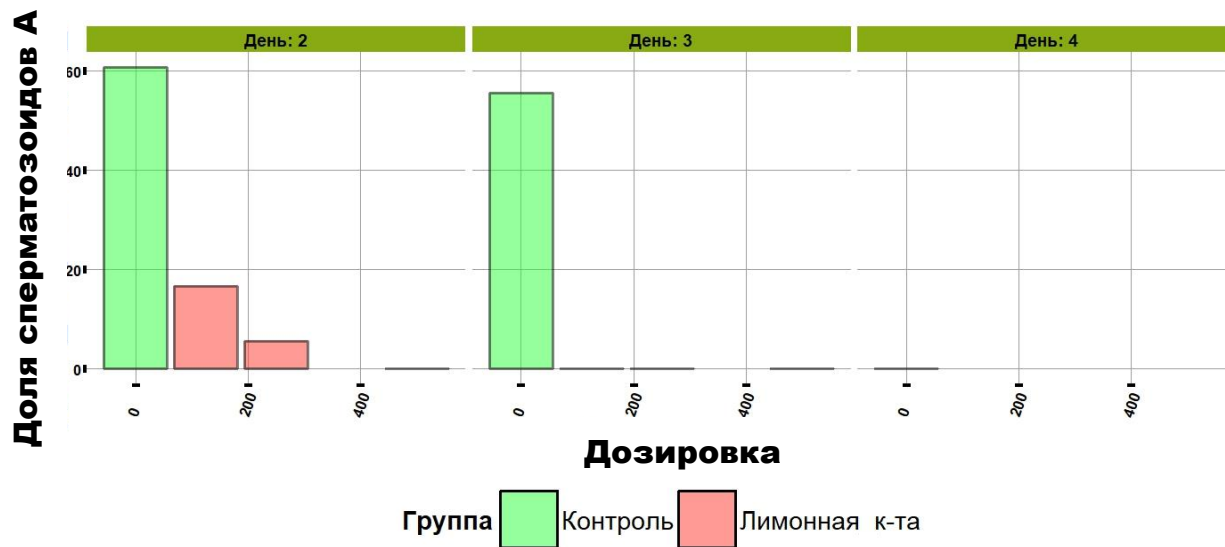


Рис. 50. Диаграмма изменения доли сперматозоидов категории А в средней общей подвижности (%) сперматозоидов ленского осетра под влиянием винной кислоты в период краткосрочного хранения

Таблица 10. Влияние лимонной кислоты на параметры подвижности сперматозоидов ленского осетра в период краткосрочного хранения в условиях *in vitro*

Группа	Дозировка лимонной к- ты, мг/л	VCL, мкм/с			VCL (A), мкм/с			Подвижность, %			Доля сперматозоидов (A), %		
		Mean ± SE	C _v , %	n	Mean ± SE	C _v , %	n	Mean ± SE	C _v , %	n	Mean ± SE	C _v , %	n
2-й день													
Контрольная	0	33,85 ± 1,46	0,46	114	44,25 ± 1,12	0,21	69	97,22 ± 1,31	0,02	2	60,70 ± 1,0	0,02	2
Опытная	125	22,51 ± 1,04***	0,30	42	32,60 ± 0,66**	0,05	7	85,71 ± 0,00	—	1	16,67 ± 0,00	—	1
Опытная	250	21,45 ± 1,40**	0,28	18	39,60 ± 0,00	—	1	72,00 ± 0,00	—	1	5,56 ± 0,00	—	1
Опытная	500	0,00 ± 0,00	—	1	0,00 ± 0,00	—	1	0,00 ± 0,00	—	1	0,00 ± 0,00	—	1
3-й день													
Контрольная	0	15,58 ± 3,15	0,64	10	19,34 ± 13,03	0,95	2	32,14 ± 17,86	0,79	2	55,56 ± 44,44	1,13	2
Опытная	125	11,63 ± 3,72	0,55	3	0,00 ± 0,00	—	0	2,91 ± 0,00	—	1	0,00 ± 0,00	—	1
Опытная	250	0,00 ± 0,00	—	1	0,00 ± 0,00	—	1	0,00 ± 0,00	—	1	0,00 ± 0,00	—	1
Опытная	500	0,00 ± 0,00	—	1	0,00 ± 0,00	—	1	0,00 ± 0,00	—	1	0,00 ± 0,00	—	1
4-й день													
Контрольная	0	0,00 ± 0,00	—	—	0,00 ± 0,00	—	—	0,00 ± 0,00	—	—	0,00 ± 0,00	—	—
Опытная	125	0,00 ± 0,00	—	—	0,00 ± 0,00	—	—	0,00 ± 0,00	—	—	0,00 ± 0,00	—	—
Опытная	250	0,00 ± 0,00	—	—	0,00 ± 0,00	—	—	0,00 ± 0,00	—	—	0,00 ± 0,00	—	—
Опытная	500	0,00 ± 0,00	—	—	0,00 ± 0,00	—	—	0,00 ± 0,00	—	—	0,00 ± 0,00	—	—

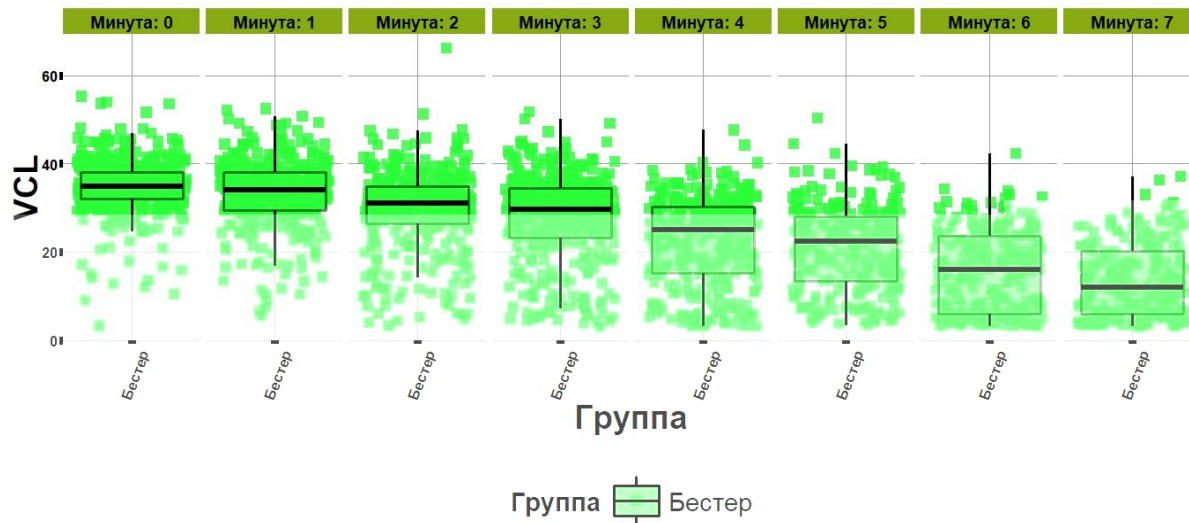


Рис. 51. Совмещенная диаграмма одномерного рассеяния и размахов изменения общей средней криволинейной скорости (VCL, мкм/с) сперматозондов бестера после активации водой

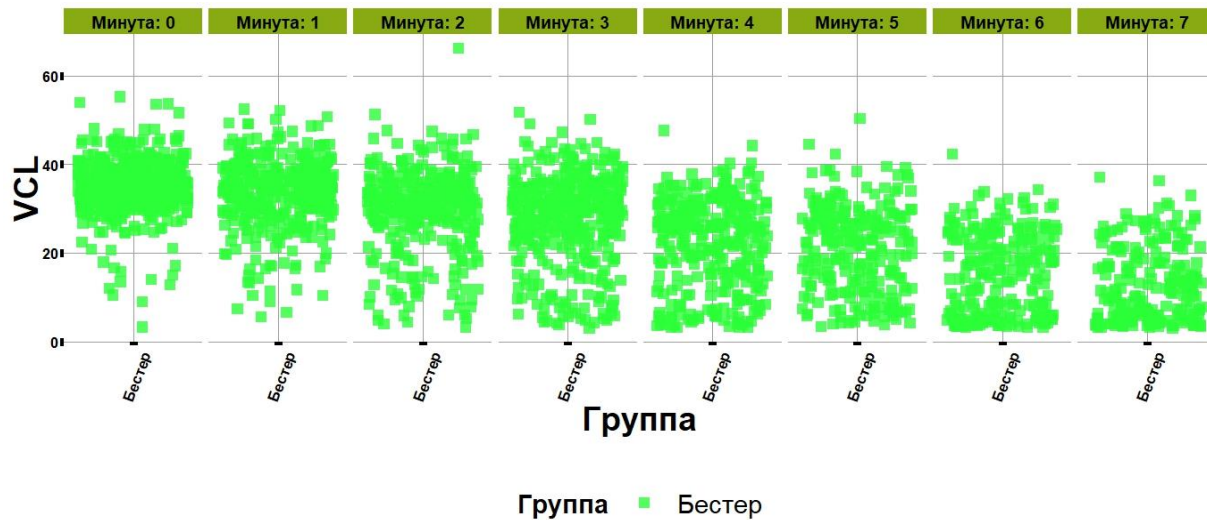


Рис. 52. Диаграмма одномерного рассеяния и размахов изменения общей средней криволинейной скорости (VCL, мкм/с) сперматозоидов бестера после активации водой

Рис. 53. Совмещенная диаграмма одномерного рассеяния и размахов изменения средней криволинейной скорости (VCL, мкм/с) сперматозоидов категории А бестера после активации водой

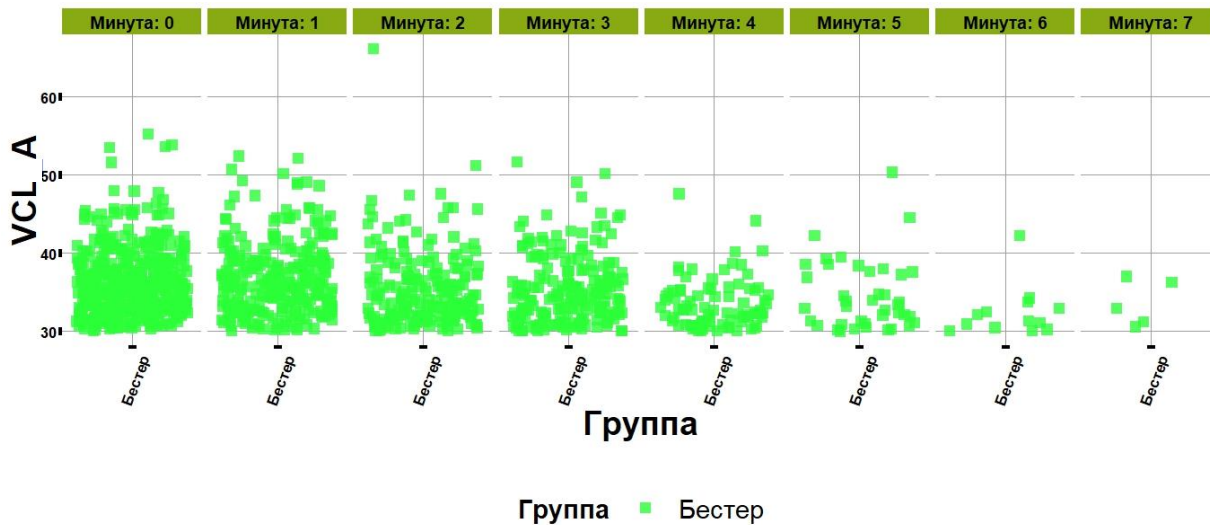


Рис. 54. Диаграмма одномерного рассеяния и размахов изменения средней криволинейной скорости (VCL, мкм/с) сперматозоидов категории А бестера после активации водой

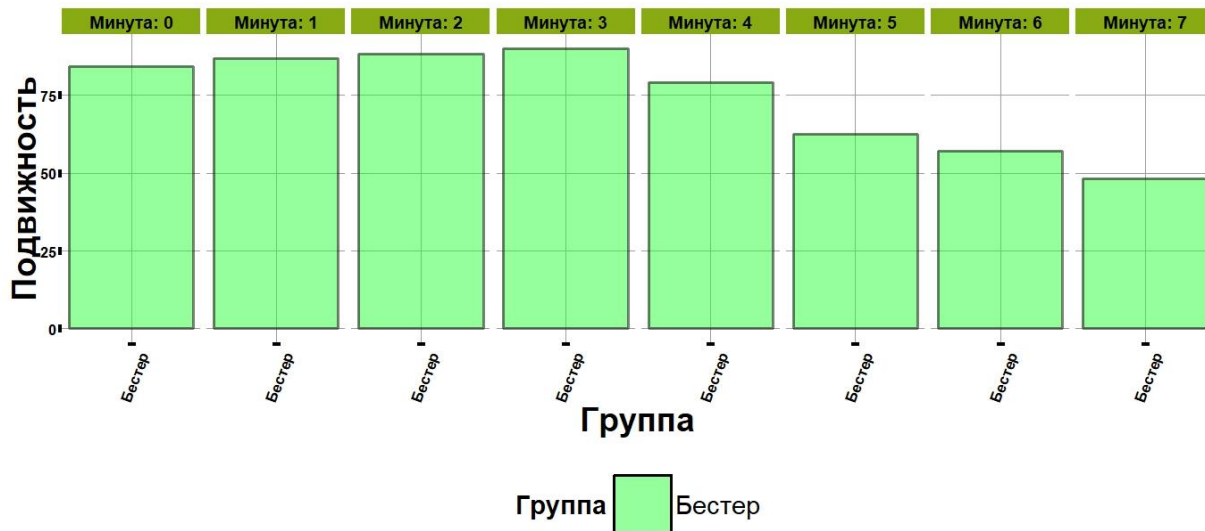


Рис. 55. Диаграмма изменения средней общей подвижности (%) сперматозоидов бестера после активации водой

Доля сперматозоидов А

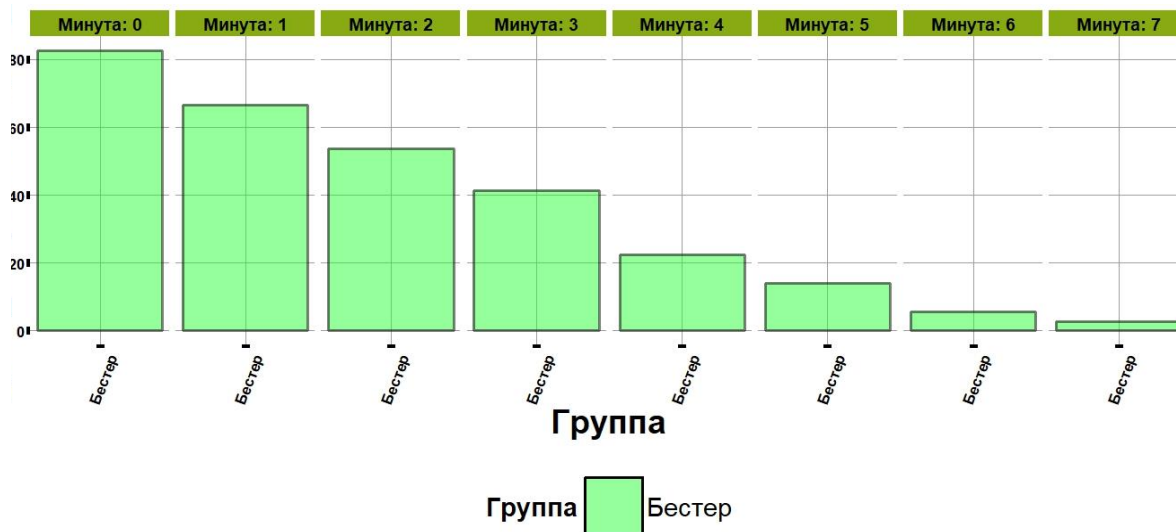


Рис. 56. Диаграмма изменения доли сперматозоидов категории А в средней общей подвижности (%) сперматозоидов бестера после активации водой

Таблица 11. Изменение параметров подвижности сперматозоидов бестера с момента активации водой в условиях *in vitro*

Время с момента активации водой, мин	VCL, мкм/с			VCL (A), мкм/с			Подвижность, %			Доля сперматозоидов (A), %		
	<i>Mean</i> ± <i>SE</i>	<i>C_v</i> , %	<i>n</i>	<i>Mean</i> ± <i>SE</i>	<i>C_v</i> , %	<i>n</i>	<i>Mean</i> ± <i>SE</i>	<i>C_v</i> , %	<i>n</i>	<i>Mean</i> ± <i>SE</i>	<i>C_v</i> , %	<i>n</i>
0	34,78 ± 0,27	0,17	491	36,42 ± 0,21	0,12	420	84,31 ± 12,99	0,27	3	82,56 ± 4,07	0,09	3
1	33,28 ± 0,40	0,23	374	36,89 ± 0,28	0,13	272	86,90 ± 10,12	0,20	3	66,67 ± 11,24	0,29	3
2	29,44 ± 0,50	0,31	349	35,44 ± 0,34	0,14	197	88,41 ± 4,71	0,09	3	53,67 ± 8,07	0,26	3
3	27,72 ± 0,49	0,36	396	35,44 ± 0,32	0,12	190	89,97 ± 4,92	0,09	3	41,34 ± 9,89	0,41	3
4	22,39 ± 0,55	0,44	320	33,56 ± 0,35	0,10	84	79,15 ± 9,71	0,21	3	22,44 ± 6,25	0,48	3
5	20,96 ± 0,60	0,45	250	34,57 ± 0,70	0,12	40	62,54 ± 19,04	0,52	3	14,05 ± 3,52	0,43	3
6	15,51 ± 0,59	0,59	234	32,45 ± 0,90	0,10	13	57,03 ± 14,02	0,43	3	5,58 ± 0,64	0,20	3
7	13,33 ± 0,57	0,62	213	33,59 ± 1,31	0,09	5	48,32 ± 15,25	0,55	3	2,83 ± 1,53	0,94	3

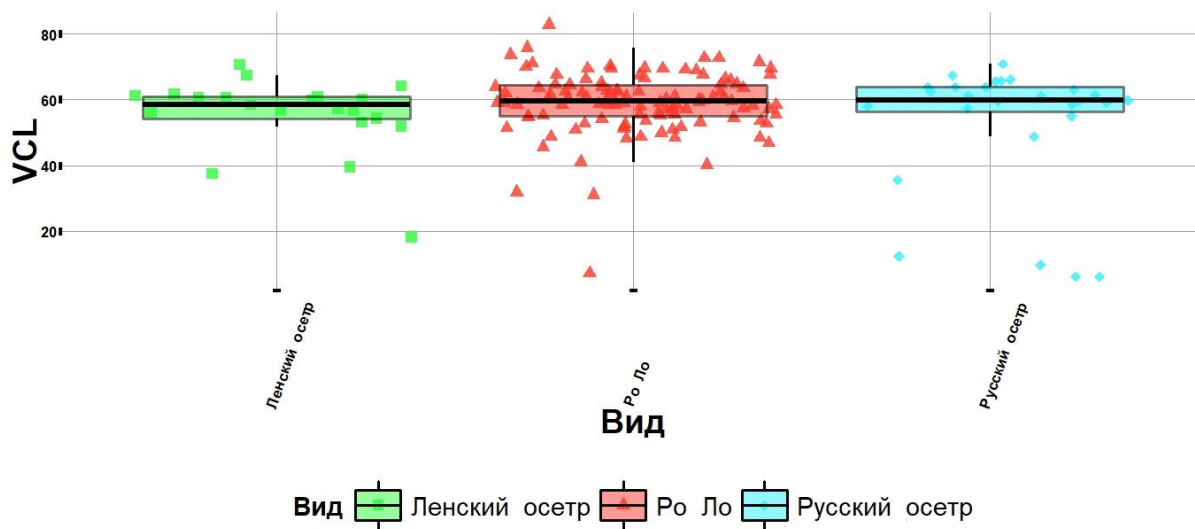


Рис. 57. Совмещенная диаграмма одномерного рассеяния и размахов изменения общей средней криволинейной скорости (VCL, мкм/с) сперматозоидов ленского осетра, гибрида Р_о×Л_о и русского осетра

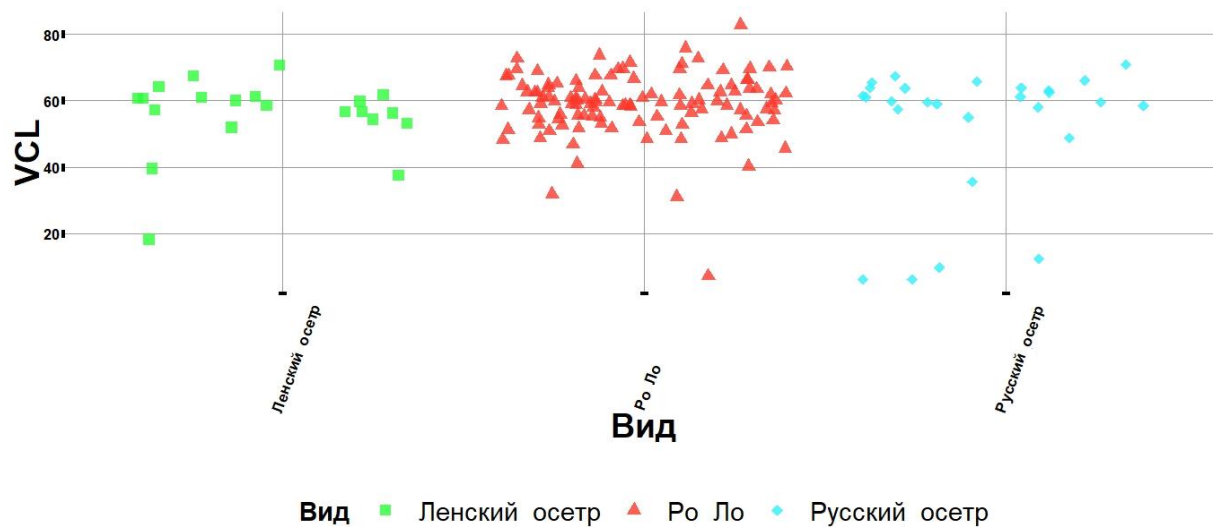


Рис. 58. Диаграмма одномерного рассеяния и размахов изменения общей средней криволинейной скорости (VCL, мкм/с) сперматозоидов ленского осетра, гибрида Po×Ло и русского осетра

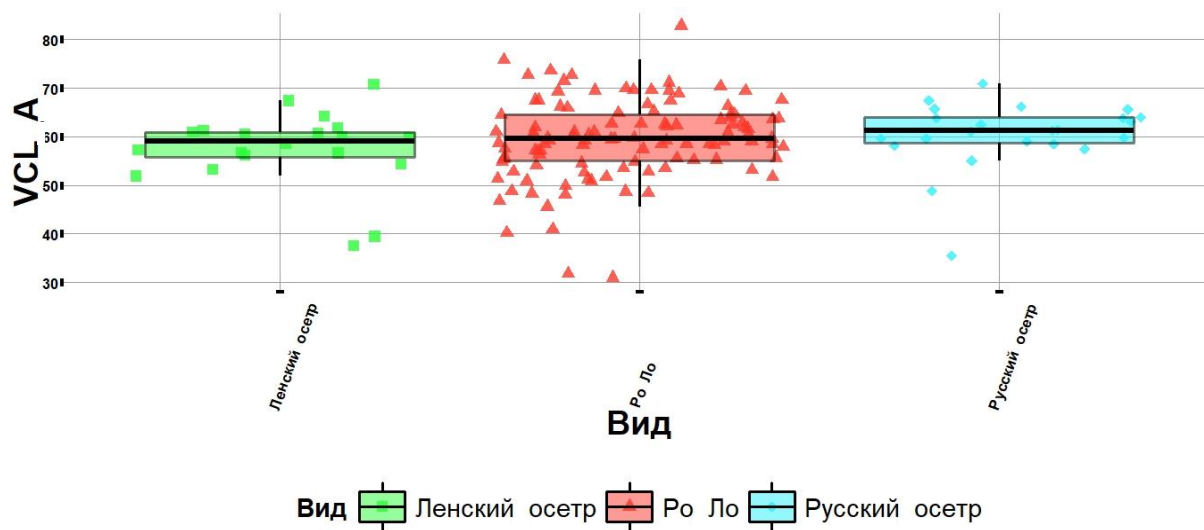


Рис. 59. Совмещенная диаграмма одномерного рассеяния и размахов изменения средней криволинейной скорости (VCL, $\mu\text{m/s}$) сперматозоидов категории А ленского осетра, гибрида Ро $\times$ Ло и русского осетра

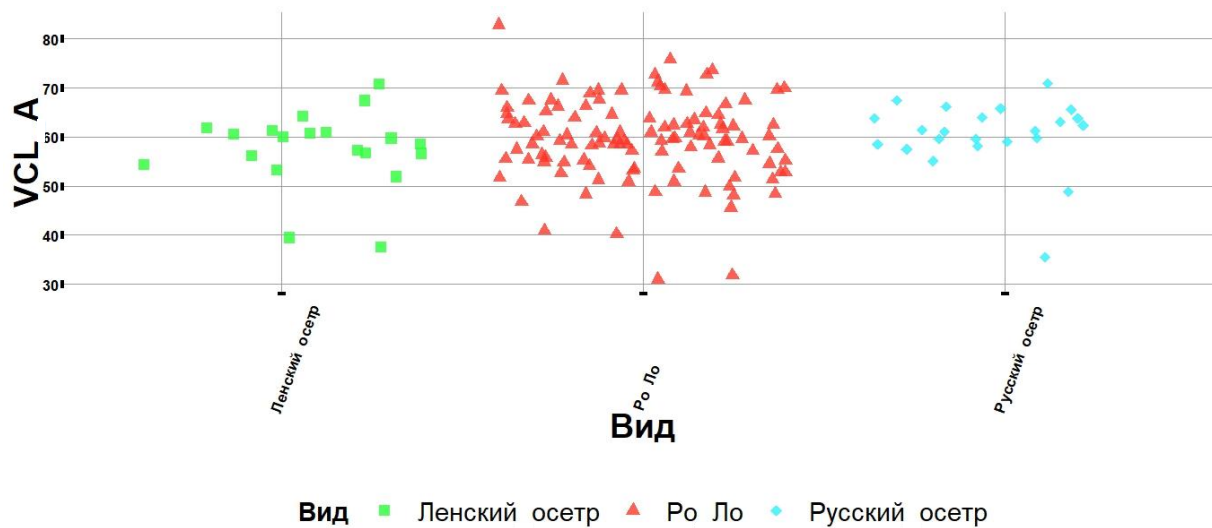


Рис. 60. Диаграмма одномерного рассеяния и размахов изменения средней криволинейной скорости (VCL, мкм/с) сперматозоидов категории А ленского осетра, гибрида Ро×Ло и русского осетра

Таблица 12. Сравнительные характеристики параметров подвижности сперматозоидов осетровых рыб в условиях *in vitro*

Вид	VCL, мкм/с			VCL (A), мкм/с			Подвижность, %			Доля сперматозоидов (A), %		
	$Mean \pm SE$	C_v , %	n	$Mean \pm SE$	C_v , %	n	$Mean \pm SE$	C_v , %	n	$Mean \pm SE$	C_v , %	n
Русский осетр	52,69 ± 3,82	0,38	27	60,35 ± 1,48	0,12	23	77,14 ± 0,00	–	1	85,19 ± 0,00	–	1
Ленский осетр	55,55 ± 2,51	0,21	21	57,42 ± 1,76	0,14	20	100,00 ± 0,00	–	1	95,24 ± 0,00	–	1
Гибрид Ро×Ло	58,95 ± 0,90	0,16	113	59,41 ± 0,78	0,14	112	99,12 ± 0,00	–	1	99,12 ± 0,00	–	1

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований было установлено, что основными факторами, влияющими на сроки хранения спермы являются: температура, концентрация сперматозоидов, доступность кислорода, активные формы кислорода, простейшие паразиты.

Хранение спермы рыб в холодильнике при температуре 2–4 °С может значительно увеличить срок сохранности подвижных сперматозоидов. Так, сперматозоиды в неразбавленной сперме при хранении в холодильнике сохраняли свою подвижность до 3 сут, тогда как сперматозоиды при хранении спермы при температуре 18–20 °С теряли свою подвижность в течение суток.

Регулирование концентрации способно влиять на срок сохранности подвижности сперматозоидов. При уменьшении концентрации срок сохранности сперматозоидов увеличивается. Нашими исследованиями установлено, что наиболее оптимальным является разбавление спермы в соотношении 1:10. Такое разбавление способно увеличить срок сохранности подвижных сперматозоидов до 6–8 сут.

Концентрация сперматозоидов является косвенным фактором влияния на срок хранения спермы, так как при уменьшении концентрации сперматозоидов уменьшается скорость расходования ими кислорода из семенной жидкости. В наших исследованиях установлено, что хранение спермы зависит от доступности проникновения воздуха (или кислорода) к сперматозоидам. Хранение спермы в емкостях со значительным запасом объема воздуха (в 10 раз превышающим объем спермы) увеличивало срок жизнеспособности сперматозоидов на 1–2 дня по сравнению с условиями, в которых сперма хранилась без воздушной подушки. Максимальное увеличение срока сохранности сперматозоидов наблюдалось при хранении спермы в пакетах, заправленных чистым кислородом. При этом срок хранения увеличивался на 3–4 дня по сравнению с условиями, в которых сперма хранилась без воздушной подушки.

При увеличении сроков хранения спермы, используя регулирование температуры, концентрации и пассивной аэрации (или оксигенации), мы столкнулись с тем, что уже после 4–5-суточного хранения в сперме увеличивалась концентрация активных форм кислорода (что выражалось в снижении антиоксидантной активности), а также происходило увеличение концентрации простейших паразитов в семенной

жидкости (например, одноклеточных микроорганизмов рода трихомонад), что приводило к снижению качества сперматозоидов.

Для повышения антиоксидантной активности мы использовали препараты, обладающие такими свойствами: винная кислота, лимонная кислота, аскорбиновая кислота, борная кислота, цинк и некоторые другие. При сравнении влияния этих веществ на сохранность сперматозоидов наиболее максимальный эффект оказывали винная кислота, борная кислота и цинк. Благодаря добавлению этих веществ в сывортку спермы удалось продлить срок хранения сперматозоидов до 20–30 суток, однако только добавление борной кислоты (в концентрации 250–1000 мг/л) оказывало влияние на концентрацию простейших паразитов, снижая ее до 100 раз по сравнению с винной кислотой и цинком и в 1000 раз по сравнению с контрольной группой, что способствовало повышению процента и скорости подвижных сперматозоидов.

Таким образом, в результате проведенных исследований был разработан способ увеличения периода краткосрочного хранения спермы осетровых в технологии искусственного оплодотворения, заключающийся в соблюдении температурного режима, регулировании концентрации, пассивной оксигенации и добавлении консервирующих веществ (винной и борной кислот), повышающий антиоксидантную активность и снижающий концентрацию простейших паразитов.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Алтухов, Ю. П. Генетические последствия селективного рыболовства и рыбоводства / Ю. П. Алтухов // Вопросы рыбоводства. – 2000. – Т. 2, № 4. – С. 562–603.
2. Ананьев, В. И. Концепция сохранения и устойчивого использования биоразнообразия с применением методов криоконсервации геномов гидробионтов / В. И. Ананьев // Рыб. хоз-во. Сер. Аквакультура. – 1997. – № 1. – С. 1–36.
3. Ананьев, В. И. Опыт криоконсервации спермы белорыбицы и белуги / В. И. Ананьев [и др.] // Рыб. хоз-во. Сер. Аквакультура. – 1998. – Вып. 1. – С. 25–32.
4. Аскорбиновая кислота и лизин подавляют генотоксический эффект глубокой заморозки спермы русского осетра / А. В. Мирзоян [и др.] // Цитология. – 2004. – Т. 46, № 9. – С. 821–822.
5. Бурцев, И. А. Первый опыт глубокого замораживания спермы осетровых рыб / И. А. Бурцев, Е. В. Серебрякова // Труды молодых ученых ВНИРО. – Москва : ВНИРО, 1969. – Вып. 1. – С. 94–100.
6. Варнавальская, Н. В. Генетическая дифференциация популяций тихоокеанских лососей / Н. В. Варнавальская. – Петропавловск-Камчатский : Изд-во «КамчатНИРО», 2006. – 488 с.
7. Вепринцев, Б. Н. Сохранить генофонд рыб и водных беспозвоночных / Б. Н. Вепринцев, С. А. Пилюев // Избранные труды ВНИИПРХ : в 4 т. – Дмитров, 2002. – Кн. 1, Т. 1–2. – С. 366–369.
8. Влияние рыбоводства на генотипические и фенотипические характеристики волжской поздней яровой севрюги / Г. Д. Рябова [и др.] // Аквакультура осетровых рыб: достижения и перспективы развития. – Москва : ВНИРО, 2006. – С. 213–216.
9. Вплив осмотичності криозахисного середовища, форми та об'єму контейнерів на виживання криоконсервованих сперматозоїдів короїв *Cyprinus carpio* / Є. Ф. Копейка [та ін.] // Рибе господарство. – 2009. – Вип. 66. – С. 89–93.
10. Гинзбург, А. С. Оплодотворение у рыб и проблема полиспермии / А. С. Гинзбург. – Москва : Наука, 1968. – 358 с.
11. Гинзбург, А. С. Ультраструктура спермия и акросомная реакция у севрюги / А. С. Гинзбург // Проблемы экспериментальной биологии : сб. ст. / Ин-т биологии развития им. Н. К. Кольцова; под общ. ред. Д. К. Беляева. – Москва, 1977. – С. 246–256.
12. Диспермный андрогенез у осетровых рыб с использованием криоконсервированной спермы: получение андрогенетического потомства сибирского осетра и андрогенетических гибридов между сибирским и русским осетрами / А. С. Грунина, [и др.] // Онтогенез. – 2011. – Т. 42, № 2. – С. 133–145.
13. Земков, Г. В. Цитоморфологические и функциональные изменения спермиев русского осетра (*Acipenser güldenstädti* В.) после криоконсервации / Г. В. Земков, Т. И. Акимочкина // Цитология. – 2009. – Т. 51, № 11. – С. 945–952.
14. Исследование проницаемости мембран сперматозоидов карпа для молекул воды / А. Ю. Пуговкин [и др.] // Биофизика. – 2014. – Т. 59, Вып. 3. – С. 481–487.
15. Каранова, М. В. Биохимическая стратегия выживания пресноводного моллюска *Lymnaea stagnalis* при околонулевых температурах / М. В. Каранова, Э. Н. Гахова // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 2007. – Т. 43, № 3. – С. 258–264.
16. Копейка Е. Ф. Экологическая ниша как фактор, определяющий криорезистентность сперматозоидов рыб / Е. Ф. Копейка // Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2014. – Т. 24, № 4. – С. 302–311.
17. Криоконсервация спермы осетровых рыб – объектов аквакультуры / Л. И. Цветкова [и др.] // Аквакультура осетровых рыб: достижения и перспективы развития : мате-

риалы III Междунар. науч.-практ. конф., Астрахань, 22–25 мая 2004 г. – Астрахань, 2004. – С. 213–214.

18. Люк, Э. Консерванты в пищевой промышленности / Э. Люк, Я. Мартин. – 3-е изд. – Санкт-Петербург : ГИОРД, 1998. – 256 с.

19. Низкотемпературная консервация спермы осетровых / Н. С. Пушкарь [и др.] // Осетровое хозяйство внутренних водоемов СССР : 2 Всесоюз. совещ., 26 февр. – 2 марта 1979 г. : тез. и реф. / М-во рыб. хоз-ва СССР, Центр. НИИ осетр. хоз-ва; редкол.: В. И. Лукьяненко (гл. ред.) [и др.]. – Астрахань, 1979. – С. 220.

20. О возможном влиянии рыбоводства на генетические и биологические характеристики севрюги / Г. Д. Рябова [и др.] // Состояние и перспективы научно-практических разработок в области марикультуры России. – Москва : ВНИРО, 1996. – С. 269–274.

21. Оптимизация процесса криоконсервации спермы осетровых рыб при использовании различных сред / Е. Н. Пономарева [и др.] // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2009. – Т. 11, № 1(2). – С. 132–134.

22. Першин, Г. Н. Влияние химиотерапевтических веществ на бактериальные ферменты / Г. Н. Першин. – Москва : Медгиз, 1952. – 230 с.

23. Повышение эффективности криоконсервации половых клеток севрюги с помощью электростимуляции / Е. Н. Пономарева [и др.] // Вестник АГТУ. Сер. Рыбное хозяйство. – 2009. – № 1. – С. 100–103.

24. Пономарева Е. Н. Использование криоконсервированного генетического материала для воспроизводства осетровых рыб / Е. Н. Пономарева, М. М. Богатырева, А. М. Тихомиров // Тез. докл. междунар. конф., Санкт-Петербург, 20–22 апр. 2010 г. / ФГНУ ГосНИОРХ. – Санкт-Петербург : Нестор-История, 2010. – С. 172–173.

25. Пономарева, Е. Н. Использование криоконсервированной спермы при искусственном воспроизводстве осетровых рыб в установках замкнутого водообеспечения / Е. Н. Пономарева, М. М. Богатырева, А. М. Тихомиров // Актуальные проблемы обеспечения продовольственной безопасности Юга России: инновационные технологии для сохранения биоресурсов, плодородия почв, мелиорации и водообеспечения : материалы междунар. науч. конф., Ростов-на-Дону, 27–30 сент. 2011 г. / Рос. акад. наук, Южн. науч. центр, Ин-т аридных зон. – Ростов-на-Дону : ЮНЦ РАН, 2011. – С. 100–101.

26. Применение плазмы крови серебряного карася (*Carassius auratus gibelio*) при криоконсервации спермы аборигенных видов рыб / В. А. Черепнин [и др.] // Животный мир Казахстана и сопредельных территорий : материалы междунар. науч. конф., Алматы, 22–23 нояб. 2012 г. / Ин-т зоологии КН МОН РК. – Алматы, 2012. – С. 331.

27. Применение химических консерваторов, антиокислителей, стабилизаторов и ионообменных смол в мясной промышленности / Ю. Н. Ляскова [и др.] – Москва : Пищевая пром-сть, 1967. – 183 с.

28. Природные антиоксиданты. Содержание в пищевых продуктах и влияние их на здоровье и старение человека / Я. И. Яшин [и др.]. – Москва : ТрансЛит, 2009. – 212 с.

29. Проблема сохранения геномов лососевых и осетровых рыб / В. И. Ананьев [и др.] // Аналитическая информация. Сер. Аквакультура. – Москва : ЭКИНАС, 1998. – Вып. 1. – С. 2–24.

30. Пуговкин, А. Ю. Проницаемость мембран сперматозоидов стерляди (*Acipenser ruthenus* L., 1758) для молекул воды / А. Ю. Пуговкин [и др.]. // Рыбохозяйственная наука Украины. – 2016. – № 1(35). – С. 70–77.

31. Пуговкін, А. Ю. Проникність плазматичних мембран сперматозоїдів коропа (*Cyprinus carpio*, L., 1758) для молекул води та кріопротекторів на різних етапах кріоконсервування / А. Ю. Пуговкін, Є. Ф. Копейка // Проблеми кріобіології та кріомедицини. – 2016. – Т. 26, № 4. – С. 340–348.

32. Рябова, Г. Д. Генетическая изменчивость в природных популяциях и одомашнированных стадах осетровых рыб России. Атлас аллозимов / Г. Д. Рябова, В. О. Климонов, Е. И. Шишанова. – Москва : Россельхозакадемия, 2008. – 94 с.

33. Савушкина С. И. Выращивание рыбопосадочного материала, полученного с использованием криоконсервированной спермы / С. И. Савушкина // Рациональное использование пресноводных экосистем – перспективное направление реализации национального проекта «Развитие АПК» : материалы науч.-практ. конф., Москва, 17–19 дек. 2007 г. / ГНУ ВНИИР. – Москва : Россельхозакадемия, 2007. – С. 303–305.

34. Савушкина С. И. Использование реконсервированной спермы при воспроизводстве рыб и ее влияние на рыбоводно-биологические качества потомства / С. И. Савушкина, Л. И. Цветкова, Н. Д. Пронина // Тез. докл. I конгресса ихтиологов России, Астрахань, сентябрь 1997 г. – Москва : ВНИРО, 1997. – С. 299.

35. Середовище для криоконсервирования спермы коропы : пат. 49236 Украина / С. І. Дрокин, Є. Ф. Копейка ; дата публ.: 26.04.2010.

36. Тренклер, И. В. Оценка жизнеспособности эмбрионов и личинок русского осетра при использовании дефростированной спермы / И. В. Тренклер, Г. Е. Лунев // Современное состояние водных биоресурсов : материалы II Междунар. конф., Новосибирск, 7–9 окт. 2010 г. / Новосиб. гос. аграр. ун-т. – Новосибирск : Изд-во ИИЦ ГНУ СибНХСХБ Россельхозакадемии, п. Краснообск, 2010. – С. 171–173.

37. Тюрина, Л. Е. Пищевые добавки : учеб. пособие / Л. Е. Тюрина, Н. А. Табаков – Красноярск : КрасГАУ, 2008. – 92 с.

38. Химическая энциклопедия : в 5 т. / Редкол.: И. Л. Кнунянц (гл. ред.) [и др.]. – Москва : Сов. энцикл., 1988. – Т. 1 : Абл–Дар. – 623 с.

39. Химическая энциклопедия : в 5 т. / Редкол.: И. Л. Кнунянц (гл. ред.) [и др.]. – Москва : Сов. энцикл., 1990. – Т. 2 : Даффа–Меди. – 671 с.

40. Хочачка, П. Биохимическая адаптация / П. Хочачка, Дж. Сомеро – Москва : Мир, 1988. – 568 с.

41. Цветкова, Л. И. Методическое пособие по криоконсервации спермы карпа, лососевых и осетровых видов рыб / Л. И. Цветкова, С. И. Савушкина. – Москва : ВНИИПРХ, 1997. – 11 с.

42. Черепнин, В. А. Оценка эффекта криоселекции при использовании оптимизированных криозащитных сред для замораживания спермы карповых рыб / В. А. Черепнин, А. Л. Безусый, Д. А. Сыроватка // Известия высших учебных заведений. Уральский регион. – 2014. – № 1. – С. 112–117.

43. Шишанова, Е. И. Влияние криоконсервации на выживаемость и генетический полиморфизм личинок русского осетра / Е. И. Шишанова, И. В. Тренклер, А. С. Мамонова // Вестник АГТУ. Сер. Рыбное хозяйство. – 2012. – № 2. – С. 105–111.

44. 1H-NMR and 31P-NMR analysis of energy metabolism of quiescent and motile turbot (*Psetta maxima*) spermatozoa / C. Dreanno [et al.] // J. Exp. Zool. – 2000. – Vol. 286, iss. 5. – P. 513–522.

45. A novel neuronal calcium sensor family protein, calaxin, is a potential Ca²⁺-dependent regulator for the outer arm dynein of metazoan cilia and flagella / K. Mizuno // Biol. Cell. – 2009. – Vol. 101, iss. 2. – P. 91–103.

46. A single, mild, transient scrotal heat stress causes DNA damage, subfertility and impairs formation of blastocysts in mice / C. Paul [et al.] // Reproduction. – 2008. – Vol. 136. – P. 73–84.

47. Acrosome staining and motility characteristics of sterlet spermatozoa after cryopreservation with use of methanol and DMSO / M. Psenicka [et al.] // Cryobiol. – 2008. – Vol. 56, iss. 3. – P. 251–253.

48. Adenosine Triphosphate Concentration and b-D-Glucuronidase Activity as Indicators of Sea Bass Semen Quality / L. Zilli [et al.] // Biol. Reprod. – 2004. – Vol. 70, iss. 6 – P. 1679–1684.
49. Agnese, J. F. Effects of domestication on genetic variability, fertility, survival and growth rate in a tropical siluriform: *Heterobranchius longifilis Valenciennes* 1840 / J. F. Agnese, Z. J. Oteme, S. Gilles // Aquaculture. – 1995. – Vol. 131, iss. 3–4. – P. 197–204.
50. Air contact influences the pH of extended porcine semen / P. Vyt [et al.] // Reprod. Dom. Anim. – 2007. – Vol. 42. – P. 218–220.
51. Alavi, S. M. H. Semen characteristics in *Acipenser persicus* in relation to sequential stripping / S. M. H. Alavi, J. Cosson, R. Kazemi // J. Appl. Ichthyol. – 2006. – Vol. 22, iss. 1. – P. 400–405.
52. Alavi, S. M. H. Sperm motility and fertilizing ability in the Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) / S. M. H. Alavi, J. Cosson // Aqua. Res. – 2005. – Vol. 36, iss. 9. – P. 841–850.
53. Alavi, S. M. H. Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality : a review / S. M. H. Alavi, J. Cosson // Cell Biol. Int. – 2006. – Vol. 30, iss. 1. – P. 1–14.
54. Alavi, S. M. H. Sperm motility in fishes. I. Effects of temperature and pH : a review / S. M. H. Alavi, J. Cosson // Cell Biol. Int. – 2005. – Vol. 29, iss. 2. – P. 101–110.
55. Amann, R. P. Spermatozoal function / R. P. Amann, J. K. Graham // Equine Reproduction / ed.: D. DiRienzi. – Philadelphia : Lea and Febiger, 1993. – P. 715–745.
56. Analysis of motility parameters from Paddlefish (*Polyodon spathula*) and Shovelnose sturgeon (*Scaphirhynchus platyrhynchus*) spermatozoa / J. Cosson [et al.] // J. Fish Biol. – 2000. – Vol. 56, iss. 6. – P. 1348–1367.
57. Analysis of motility parameters from paddlefish and shovelnose sturgeon spermatozoa / J. Cosson [et al.] // J. Fish Biol. – 1995. – Vol. 56. – P. 1348–1367.
58. Atkinson, D. E. Energy charge of adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers / D. E. Atkinson // Biochemistry. – 1968. – Vol. 7, iss. 11. – P. 4030–4034.
59. Baghfalaki, M. The relationships between some spermatological and biochemical parameters of Beluga (*Huso huso* L.) semen in the southeastern of Caspian Sea / M. Baghfalaki, F. Shalouei, M. R. Imanpour // Iranian J. Biol. – 2009. – Vol. 22. – P. 312–320.
60. Benau, D. Initiation, prolongation and reactivation of the motility of salmonid spermatozoa / D. Benau, C. Ternier // Gamete Research. – 1980. – Vol. 3, iss. 3. – P. 247–257.
61. Billard, R. Motility of fresh and aged halibut sperm / R. Billard, J. Cosson, L. W. Crim // Aquatic Living Resources. – 1993. – Vol. 6, iss. 1. – P. 67–75.
62. Billard, R. Changes in structure and fertilising ability of marine and freshwater fish spermatozoa diluted in media of various salinities / R. Billard // Aquaculture. – 1978. – Vol. 14, iss. 3. – P. 187–198.
63. Billard, R. Changes in the flagellum morphology of intact and frozen thawed Siberian sturgeon *Acipenser baerii* (Brandt) sperm during motility / R. Billard, J. Cosson, O. Linhart // Aqua. Res. – 2000. – Vol. 31. – P. 283–287.
64. Billard, R. Effects of coelomic and seminal fluids and various saline diluents on the fertilizing ability of spermatozoa in the Rainbow trout (*Salmo gairdneri*) / R. Billard // Journal of Reproduction and Infertility. – 1983. – Vol. 68, iss. 1. – P. 77–84.
65. Billard, R. Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish / R. Billard, M. P. Cosson // J. Exp. Zool. – 1992. – Vol. 261, iss. 2. – P. 122–131.
66. Billard, R. Sperm motility in rainbow trout, *Parasalmo gairdneri*; effects of pH and temperature / R. Billard, M. P. Cosson // Reproduction in Fish. Basic and Applied Aspects in Endocrinology and Genetics / ed.: B. Breton, Y. Zohar. – Paris : INRA, 1998. – P. 161–167.

67. Billard, R. Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species / R. Billard // Reproduction Nutrition Développement. – 1986. – Vol. 26. – P. 877–920.
68. Billard, R. Techniques of genetic resource banking in fish / R. Billard, T. Zhang // Cryobanking the genetic resource: wildlife conservation for the future? – London : Taylor and Francis, 2001 – P. 156–170.
69. Billard, R. The energetics of fish sperm motility / R. Billard, M. P. Cosson // Controls of Sperm Motility Biological and Clinical Aspects / ed.: C. Gagnon. – Boca Raton : CRC Press, 1990. – P. 153–173.
70. Biochemical characterization of Siberian sturgeon *Acipenser baerii* and starlet, *Acipenser ruthenus*, milt plasma and spermatozoa / B. Piros [et al.] // Fish Physiol. Biochem. – 2002. – Vol. 26, iss. 3. – P. 289–295.
71. Biology of sperm and artificial reproduction in caip / R. Billard [et al.] // Aquaculture. – 1995. – Vol. 129. – P. 95–112.
72. Bobe, J. Egg and sperm quality in fish / J. Bobe, C. Labbe // Gen. Comp. Endocrinol. – 2010. – Vol. 165, iss. 3. – P. 535–548.
73. Boitano, S. Membrane hyperpolarization activates trout sperm without an increase in intracellular pH / S. Boitano, C. K. Omoto // J. Cell. Sci. – 1991. – Vol. 98. – P. 343–349.
74. Boitano, S. Trout sperm swimming patterns and role of intracellular Ca^{2+} / S. Boitano, C. K. Omoto // Cell. Motil. Cytoskel. – 1992. – Vol. 21. – P. 74–82.
75. Borg, K. E. Semen characteristics, testicular size, and reproductive hormone concentrations in matura Duroc, Meishan, Fengjing and Minzhu boars / K. E. Borg, D. D. Lunstra, R. K. Christenson // Biology of Reproduction. – 1993. – Vol. 49, iss. 3. – P. 515–521.
76. Brouwers, J. F. In situ detection and localization of lipid peroxidation in individual bovine sperm cells / J. F. Brouwers, B. M. Gadella // Free Radical Biology and Medicine. – 2003. – Vol. 35, iss. 11. – P. 1382–1391.
77. Brown, G. G. Storage, transportation, and fertility of undiluted and diluted paddlefish milt / G. G. Brown, S. D. Mims // Prog. Fish-Cultu. – 1995. – Vol. 57. – P. 64–69.
78. Butskiy, K. Obtaining high quality sterlet (*Acipenser ruthenus*) sperm after freezing and influence of hormonal stimulations / K. Butskiy // SLTB Conference, London, October, 08–10, 2014 : book of abstracts. – London, 2014. – P. 90.
79. Cabrera, E. Sperm quality assessment / E. Cabrera, V. Robles, P. Herraiz // Methods in reproductive aquaculture. Marine and freshwater species / ed.: E. Cabrera, V. Robles, P. Herraiz. – Boca Raton, 2009. – P. 93–147.
80. Carbon dioxide and pH affect sperm motility of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) / R. L. Ingermann [et al.] // J. Exp. Biol. – 2002. – Vol. 205. – P. 2885–2890.
81. Casady, R. B. The effect of exposure to high ambient temperature on spermatogenesis in the dairy bull / R. B. Casady, R. M. Myers, J. E. Legates // Journal of Dairy Science. – 1953. – Vol. 36, iss. 1. – P. 14–23.
82. Characteristics of captive seabass (*Dicentrarchus labrax*) sperm in relation to its fertilisation potential / C. Fauvel [et al.] // J. Fish Biol. – 1999. – Vol. 54, iss. 2. – P. 356–369.
83. Characterization of lower temperature storage limitations of fresh-extended porcine semen / G. C. Althouse [et al.] // Theriogenol. – 1998. – Vol. 50, iss. 4. – P. 535–543.
84. Chemical composition and osmolality of seminal fluid of *Acipenser persicus* their physiological relationship with sperm motility / S. M. H. Alavi [et al.] // Aqua. Res. – 2004. – Vol. 35, iss. 13. – P. 1238–1243.
85. Chemical composition of seminal and ovarian fluids of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and their effects on sperm motility traits / P. Rosengrave [et al.] // Comp. Biochem. Physiol. A. – 2009. – Vol. 152. – P. 123–129.

86. Cherr, G. N. An acrosome reactions in sperm from the white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) / G. N. Cherr, W. N. Clark // J. Exp. Zool. – 1984. – Vol. 232. – P. 129–139.
87. Christen, R. Trout sperm motility- the transient movement of trout sperm is related to changes in the concentration of ATP following the activation of the flagellar movement / R. Christen, J. L. Gatti, R. Billard // European J. Biochem. – 1987. – Vol. 166, iss. 3. – P. 667–671.
88. Ciereszko, A. Chemical composition of seminal plasma and its physiological relationship with sperm motility, fertilizing capacity and cryopreservation success in fish / A. Ciereszko // Fish Spermatology / ed.: S. M. H. Alavi [et al.]. – Oxford : Alpha Science, 2008. – P. 215–240.
89. Ciereszko, A. Estimation of sperm concentration of rainbow trout, Whitefish and yellow perch using a spectrophotometric technique / A. Ciereszko, K. Dabrowski // Aquaculture. – 1993. – Vol. 109, iss. 3–4. – P. 367–373.
90. Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model / E. Z. Drobnis [et al.] // J. Exp. Zool. – 1993. – Vol. 265. – P. 432–437.
91. Comparison of sperm velocity, motility and fertilizing ability between firstly and secondly activated spermatozoa of common carp (*Cyprinus carpio*) / O. Linhart [et al.] // J. Appl. Ichthyol. – 2008. – Vol. 24. – P. 386–392.
92. Computer assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish / D. E. Kime [et al.] // Comp. Biochem. Physiol. – 2001. – Vol. 130. – P. 425–433.
93. Cosson J. The ionic and osmotic factors controlling motility of fish spermatozoa / J. Cosson // Aqua. Intl. – 2004. – Vol. 12. – P. 69–85.
94. Cosson, J. Methods to analyse the movements of the spermatozoa and their flagella / J. Cosson // Fish spermatology. – Oxford : Alpha Science Ltd, 2008. – P. 63–102.
95. Cosson, J. Frenetic activation of fish spermatozoa flagella entails short-term motility, portending their precocious decadence / J. Cosson // J. Fish Biol. – 2010. – Vol. 76. – P. 240–279.
96. Cosson, J. Paddlefish (*Polyodon spathula*) spermatozoa: effects of potassium and pH on motility / J. Cosson, O. Linhart // Folia Zool. – 1996. – Vol. 45. – P. 361–370.
97. Cosson, M. P. Protease inhibitors and substrates block motility and microtubule sliding of sea urchin and carp spermatozoa / M. P. Cosson, C. Gagnon // Cell. Motil. Cytoskel. – 1988. – Vol. 10, iss. 4. – P. 518–527.
98. Cosson, M. P. Rise of internal Ca²⁺ accompanies the initiation of trout sperm motility / M. P. Cosson, R. Billard, L. Letellier // Cell. Motil. Cytoskel. – 1989. – Vol. 14, iss. 3. – P. 424–434.
99. Cryopreservation alters the levels of the bull sperm surface protein P25b / C. Lessard [et al.] // J. Androl. – 2000. – Vol. 21. – P. 700–707.
100. Cryopreservation and short-term storage of sturgeon sperm, a review / R. Billard [et al.] // Aquaculture. – 2004. – Vol. 236. – P. 1–9.
101. Cryopreservation of Atlantic cod (*Gadus morhua*) sperm in large-volume straws: applications for commercial production and gene banking / I. A. E. Butts [et al.] // Aqua. Res. – 2011. – Vol. 42. – P. 1714–1722.
102. Cryopreservation of Atlantic cod *Gadus morhua* L. spermatozoa: effects of extender composition and freezing rate on sperm motility, velocity and morphology / I. A. E. Butts [et al.] // Cryobiol. – 2010. – Vol. 61. – P. 174–181.
103. Cryopreservation of carp sperm / H. Kurokura [et al.] // Aquaculture. – 1984. – Vol. 37, iss. 3. – P. 267–273.

104. Cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio*) sperm in 1,2 and 5 ml straws and occurrence of haploids among larvae produced with cryopreserved sperm / A. Horvath [et al.] // Cryobiol. – 2007. – Vol. 54, iss. 3. – P. 251–257.
105. Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives / E. Cabrita [et al.] // J. Appl. Ichthyol. – 2010. – Vol. 26, iss. 5. – P. 623–635.
106. Cryopreservation of sperm in marine fish / M. Suquet [et al.] // Aqua. Res. – 2000. – Vol. 31, iss. 3. – P. 231–243.
107. Cryopreservation of sperm of sturgeon and paddlefish / S. D. Mims [et al.] // Cryoconservation in aquatic species: advances in world aquaculture society / ed.: T. R. Tiersh, P. M. Mazik. – Louisiana : Baton Rouge, 2000. – Vol. 7. – P. 123–129.
108. Cryopreservation of sterlet (*Acipenser ruthenus*) spermatozoa using different cryoprotectants / S. Boryshpolets [et al.] // J. Appl. Ichthyol. – 2011. – Vol. 27, iss. 5. – P. 1147–1149.
109. Cryopreservation of turbot (*Scophthalmus maximus*) spermatozoa / C. Dreanno [et al.] // Theriogenol. – 1997. – Vol. 48, iss. 4. – P. 589–603.
110. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? / C. M. Medeiros [et al.] // Theriogenol. – 2002. – Vol. 57. – P. 327–344.
111. De Leeuw, F. The role membrane damage plays in cold shock and freezing injury / F. De Leeuw, B. Colenbrander, A. Verkleij // Reprod. Dom. Anim. – 1990. – Vol. 1. – P. 95–104.
112. Debus, L. Structure of micropyle surface on oocytes and caviar grains in sturgeons / L. Debus, M. Winkler, R. Billard // Int. Rev. Hydrobiol. – 2002. – Vol. 87, iss. 5–6. – P. 585–603.
113. Debus, L. Ultrastructure of the oocyte envelopes of some Eurasian acipenserids / L. Debus, M. Winkler, R. Billard // J. Appl. Ichthyol. – 2008. – Vol. 24, iss. 1. – P. 57–64.
114. Degradation of the quality of carp sperm by urinecontamination during stripping (abstract) / G. Perchee [et al.] // Aquaculture. – 1995. – Vol. 129. – P. 135–136.
115. Description of hake (*Merluccius merluccius*) spermatozoa: flagellar wave characteristics and motility parameters in various situations / J. Cosson [et al.] // J. Appl. Ichthyol. – 2010. – Vol. 26. – P. 644–652.
116. Determination of semen quality of the rainbow trout by sperm motility, seminal plasma parameters and spermatozoal metabolism / F. Lahnsteiner [et al.] // Aquaculture. – 1998. – Vol. 163. – P. 163–181.
117. Dettlaff, T. A. Sturgeon fishes: developmental biology and aquaculture / T. A. Dettlaff, A. S. Ginzburg, O. I. Schmalhausen. – Berlin : Springer, 1993. – 299 p.
118. DiLauro, M. N. Sperm-cell ultrastructure of North American sturgeons. I. The Atlantic sturgeon (*Acipenser oxyrinchus*) / M. N. DiLauro, W. Kaboord, R. A. Walsh // Can. J. Zool. – 1998. – Vol. 76. – P. 1822–1836.
119. DiLauro, M. N. Sperm-cell ultrastructure of North American sturgeons. II. The shortnose sturgeon (*Acipenser brevirostrum*, Lesueur, 1818) / M. N. DiLauro, W. S. Kaboord, R. A. Walsh // Can. J. Zool. – 1999. – Vol. 77. – P. 321–330.
120. DiLauro, M. N. Sperm-cell ultrastructure of North American sturgeon. III. The Lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*, Rafinesque, 1817) / M. N. DiLauro, W. S. Kaboord, R. A. Walsh // Can. J. Zool. – 2000. – Vol. 78. – P. 438–447.
121. DiLauro, M. N. Sperm-cell ultrastructure of North American sturgeons. IV. The pallid sturgeon (*Scaphirhynchus albus*, Forbes and Richardson, 1905) / M. N. DiLauro, R. A. Walsh, M. Peiffer // Can. J. Zool. – 2001. – Vol. 79. – P. 802–808.
122. Dynamics of ATP and movement in Eurasian perch (*Perca fluviatilis* L.) sperm in conditions of decreasing osmolality / S. Boryshpolets [et al.] // Theriogenol. – 2009. – Vol. 72, iss. 6. – P. 851–859.

123. Dzyuba, B. Successive activations of sturgeon sperm motility by osmolality and Ca²⁺ concentration / B. Dzyuba [et al.] // The third international workshop on the biology of fish gametes, Budapest, 7–9 September 2011 / Diamond Congress Ltd.; ed.: R. Hohol. – Budapest, 2011. – P. 138–139.
124. Effect of cryoprotectants and male on motility parameters and fertilization rate in paddlefish (*Polyodon spathula*) frozen-thawed spermatozoa. / O. Linhart [et al.] // J. Appl. Ichthyol. – 2006. – Vol. 22, iss. 1. – P. 389–394.
125. Effect of sperm cryopreservation on the European eel sperm viability and spermatozoa morphology / J. F. Asturiano [et al.] // Reprod. Dom. Anim. – 2007. – Vol. 42, iss. 2. – P. 162–166.
126. Effects of extenders and cryoprotectant combinations on motility and morphometry of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) spermatozoa / D. S. Penaranda [et al.] // J. Appl. Ichthyol. – 2008. – Vol. 24, iss. 4. – P. 450–455.
127. Effects of HCG as spermiation inducer on European eel semen quality / J. F. Asturiano [et al.] // Theriogenol. – 2006. – Vol. 66, iss. 4. – P. 1012–1020.
128. Effects of ions on the motility of fresh and demembrated paddlefish (*Polyodon spathula*) spermatozoa / O. Linhart [et al.] // Reproduction. – 2002. – Vol. 124, iss. 5. – P. 713–719.
129. Effects of osmolality on sperm morphology, motility and flagellar wave parameters in Northern pike (*Esox lucius* L.) / S. M. H. Alavi [et al.] // Theriogenol. – 2009. – Vol. 72. – P. 32–43.
130. Effects of the spermatozoa: oocyte ratio, water volume and water temperature on artificial fertilization and sperm activation of cascudo-preto / R. A. Bombardelli // Revista Brasileira de Zootecnia. – 2013. – Vol. 42, iss. 1. – P. 1–6.
131. Effects of varying dilutions, pH, temperature and cations on spermatozoa motility in fish *Larimichthys polyactis* / H. Le Minh [et al.] // Journal of Environmental Biology. – 2011. – Vol. 32. – P. 271–276.
132. Evaluation of DNA damage in *Dicentrarchus labrax* sperm following cryopreservation / L. Zilli [et al.] // Cryobiol. – 2003. – Vol. 47, iss. 3 – P. 227–235.
133. Evaluation of DNA damage in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) cryopreserved sperm / E. Cabrita [et al.] // Cryobiol. – 2005. – Vol. 50, iss. 2. – P. 144–153.
134. Evaluation of gilthead sea bream, *Sparus aurata*, sperm quality after cryopreservation in 5 ml macrotubes / E. Cabrita [et al.] // Cryobiol. – 2005. – Vol. 50, iss. 3. – P. 273–284.
135. Fertilization rate of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*, Brandt) milt cryopreserved with methanol / J. Glogowski [et al.] // Aquaculture. – 2002. – Vol. 211, iss. 1–4. – P. 367–373.
136. Fertilizing ability of cryopreserved spermatozoa in the Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) and stellate sturgeon (*A. stellatus*) / A. Alipour [et al.] // Iranian J. Fish. Sci. – 2009. – Vol. 8, iss. 1. – P. 1–12.
137. Fine structure and morphology of sterlet (*Acipenser ruthenus* L. 1758) spermatozoa and acrosin localization / M. Psenicka [et al.] // Anim. Reprod. Sci. – 2009. – Vol. 111, iss. 1. – P. 3–16.
138. Fish germinal cells. I. Comparative spermatology of seven cyprinid species / B. Baccetti // Gamete Research. – 1984. – Vol. 10, iss. 4. – P. 373–396.
139. Fish spermatology: implication for aquaculture management / S. M. H. Alavi [et al.] // Fish spermatology. – Oxford : Alpha Science Ltd, 2008. – P. 397–460.
140. Flow cytometric evaluation of mitochondrial activity and membrane integrity in fresh and cryopreserved rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa / B. Ogier De Baulny [et al.] // Cryobiol. – 1997. – Vol. 34, iss. 2. – P. 141–149.

141. Gadolinium, a mechano-sensitive channel blocker, inhibits osmosis-initiated motility of sea- and freshwater fish sperm, but does not affect human or ascidian sperm motility / Z. Krasznai [et al.] // *Cell Motil. Cytoskel.* – 2003. – Vol. 55, iss. 4. – P. 232–243.
142. Gage, M. J. G. Spermatozoal traits and sperm competition in Atlantic salmon: Relative sperm velocity is the primary determinant of fertilization success. / M. J. G. Gage, C. P. MacFarlane, S. Yeates // *Current Biology.* – 2004. – Vol. 14, iss. 1. – P. 44–47.
143. Gage, M. J. G. Relationships between sperm morphometry and sperm motility in the Atlantic salmon / M. J. G. Gage. [et al.] // *J. Fish Biol.* – 2002. – Vol. 61, iss. 6. – P. 1528–1539.
144. Gelman, A. The thermal properties of fish enzymes as a possible indicator of the temperature adaptation potential of the fish / A. Gelman, U. Cogan, S. Mokady // *Comp. Biochem. Physiol. B.* – 1992. – Vol. 101. – P. 205–208.
145. Gibbons, B. H. Flagellar movement and adenosine triphosphatase activity in sea urchin sperm extracted with Triton-X100 / B. H. Gibbons, I. R. Gibbons // *J. Cell. Biol.* – 1972. – Vol. 54. – P. 75–97.
146. Gibbons, I. R. Cilia and flagella of eukaryotes / I. R. Gibbons // *J. Cell. Biol.* – 1981. – Vol. 91. – P. 107–124.
147. Gibbons, I. R. The biochemistry of motility / I. R. Gibbons // *Ann. Rev. Biochem.* – 1968. – Vol. 37. – P. 521–546.
148. Ginzburg, A. S. Sperm-egg association and its relationship to the activation of the egg in salmonid fishes / A. S. Ginzburg // *J. Embryol. Exp. Morphol.* – 1963. – Vol. 11. – P. 13–33.
149. Goodall, J. A. Factors affecting the activation and duration of motility of the spermatozoa of the summer whiting (*Sillago ciliata*) / J. A. Goodall, A. W. Blackshaw, M. F. Capra // *Aquaculture.* – 1989. – Vol. 77. – P. 243–250.
150. Harvey, B. Cryopreservation of *Sarotherodon mossambicus* spermatozoa / B. Harvey // *Aquaculture.* – 1983. – Vol. 32, iss. 3–4. – P. 313–320.
151. Harvey, B. Cryopreservation of zebrafish spermatozoa using methanol / B. Harvey, N. R. Kelley, M. J. Ashwood-Smith // *Can. J. Zool.* – 1982. – Vol. 60, iss. 8. – P. 1867–1870.
152. Hatchery manual for the White Sturgeon *Acipenser transmontanus* with application to other North American *Acipenseridae* / F. S. Conte [et al.]. – Oakland : University of California, 1988. – 104 p.
153. Hochacka, P. W. Biochemical adaptation to the environment / P. W. Hochacka, G. N. Somero // *Fish Physiology* / ed. W. S. Hoar, D. J. Randall. – Vol. VI. – NY : Academic Press, 1971. – P. 100–156.
154. Horvath, A. Cryopreservation of common carp sperm / A. Horvath // *Aquatic Living Resources.* – 2003. – Vol. 16. – P. 457–460.
155. Hwang, P. C. A study of major cations, osmotic pressure, and pH in seminal components of Atlantic salmon / P. C. Hwang, D. R. Idler // *Journal of the Fisheries Research Board of Canada.* – 1969. – Vol. 26. – P. 413–419.
156. Hypotonic treatment prior to freezing improves cryoresistance of common carp (*Cyprinus carpio*) spermatozoa / B. Dzzyuba [et al.] // *Cryobiol.* – 2013. – Vol. 66. – P. 192–194.
157. Identification of trypsin-like activity in sturgeon spermatozoa / A. Ciereszko [et al.] // *J. Exp. Zool.* – 1994. – Vol. 268. – P. 486–491.
158. In vitro maturation of the potential for movement of carp spermatozoa / C. Redondo [et al.] // *Mol. Reprod. Dev.* – 1991. – Vol. 29, iss. 3. – P. 259–270.
159. Inaba, K. Molecular basis of sperm flagellar axonemes: structural and evolutionary aspects / K. Inaba // *Ann. NY Acad. Sci.* – 2007. – Vol. 1101, iss. 1. – P. 506–526.

160. Inaba, K. Molecular mechanism of the activation of flagellar motility in sperm / K. Inaba // *Fish spermatology* / ed.: S. M. H. Alavi [et al]. – Oxford : Alpha Science Ltd, 2008. – P. 281–316.
161. Ionic composition and osmolality of paddlefish (*Polyodon spathula*, *Acipenseriformes*) seminal fluid / O. Linhart [et al.] // *Aqua Int.* – 2003. – Vol. 11, iss. 4. – P. 357–368.
162. Ionic factors regulating the motility of fish sperm / J. Cosson [et al.] // *The male gamete: from basic to clinical applications.* – Vienna : Cache Rive Press, 1999. – P. 161–186.
163. Ishijima, S. Comparative studies on spermatozoan motility of Japanese fishes / S. Ishijima, M. Hara, M. Okiyama // *Bulletin of the Ocean Research Institute, University of Tokyo.* – 1998. – Vol. 33. – P. 139–152.
164. Islam, M. S. Tale of fish sperm and factors affecting sperm motility : a review / M. S. Islam, T. Akhter // *Advances in Life Sciences.* – 2011. – Vol. 1. – P. 11–19.
165. Johnston, I. A. Temperature acclimation and metabolism in ectotherms with particular reference to teleost fish / I. A. Johnston, J. Dunn // *Symp. Soc. Exp. Biol.* – 1987. – Vol. 41. – P. 67–93.
166. Kho, K. H. Membrane hyperpolarization increases cAMP to induce the initiation of sperm motility in salmonids fishes, rainbow trout and masu salmon / K. H. Kho, M. Morisawa, K. S. Choi // *J. Microbiol. Biotechnol.* – 2003. – Vol. 13, iss. 6. – P. 833–840.
167. Kopeika, E. F. Cryopreservation of fish sperm / E. F. Kopeika, J. Kopeika, T. Zhang // *Cryopreservation and freeze-drying protocols, methods in molecular biology* / ed.: J. G. Day, G. N. Stacey. – Amsterdam : Springer, 2007. – Vol. 368. – P. 203–217.
168. Kopeika, E. F. Variability of sperm quality after cryopreservation in fish / E. F. Kopeika, J. Kopeika // *Fish spermatology* / ed.: S. M. H. Alavi [et al]. – Oxford : Alpha Science Ltd., 2008. – P. 347–396.
169. Kurokura solution as immobilizing medium for spermatozoa of tench (*Tinca tinca* L.) / M. Rodina [et al.] // *Aqua Int.* – 2004. – Vol. 12, iss. 1. – P. 119–131.
170. Lahnsteiner, F. Energy resources of spermatozoa of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (*Pisces, Teleostei*) / F. Lahnsteiner, R. A. Patzner, T. Weismann // *Reproduction Nutrition Development.* – 1993. – Vol. 33. – P. 349–360.
171. Lahnsteiner, F. Monosaccharides as energy resources during motility of spermatozoa in *Leuciscus cephalus* (*Cyprinidae, Teleostei*) / F. Lahnsteiner, R. A. Patzner, T. Weismann // *Fish Physiol. Biochem.* – 1992. – Vol. 10, iss. 4. – P. 283–289.
172. Lahnsteiner, F. Sperm metabolism of the teleost fishes *Oncorhynchus mykiss* and *Chalcalburnus chalcoides* and its relation to motility and viability / F. Lahnsteiner, B. Berger, T. Weismann // *J. Exp. Zool.* – 1999. – Vol. 284. – P. 454–465.
173. Lahnsteiner, F. Sperm morphology and ultrastructure in fish / F. Lahnsteiner, R. A. Patzner // *Fish Spermatology* / ed.: S. M. H. Alavi [et al.]. – Oxford : Alpha Science, 2008. – P. 1–62.
174. Lahnsteiner, F. Spermatozoa of the teleost fish *Perca fluviatilis* (perch) have the ability to swim for more than two hours in saline solutions / F. Lahnsteiner // *Aquaculture.* – 2011. – Vol. 314. – P. 221–224.
175. Lahnsteiner, F. The effect of temperature on sperm motility and enzymatic activity in brown trout *Salmo trutta*, burbot *Lota lota* and grayling *Thymallus thymallus* / F. Lahnsteiner, N. Mansour // *J. Fish Biol.* – 2012. – Vol. 81. – P. 197–209.
176. Lee, D. C. The effects of temperature on biological membranes and their models / D. C. Lee, D. Chapman // *Symp. Soc. Exp. Biol.* – 1987. – Vol. 41. – P. 35–52.
177. Lemma, A. Effect of cryopreservation on sperm quality and fertility / A. Lemma // *Artificial Insemination in Farm Animals* / ed.: M. Manafi. – Chapter 12. – Rijeka : InTech, 2011. – P. 191–216.

178. Lin, J. J. Temperature-dependent changes in expression of thermostable and thermolabile isozymes of cytosolic malate dehydrogenase in the eurythermal goby fish *Gillichthys mirabilis* / J. J. Lin, G. N. Somero // *Physiol. Zool.* – 1995. – Vol. 68. – P. 114–128.
179. Linhart, O. Motility of spermatozoa from Shovelnose sturgeon and Paddlefish / O. Linhart, S. D. Mims, W. L. Shelton // *J. Fish Biol.* – 1995. – Vol. 47, iss. 5. – P. 902–909.
180. Linhart, O. Surface ultrastructure of paddlefish eggs before and after fertilization / O. Linhart, S. Kudo // *J. Fish Biol.* – 1997. – Vol. 51, iss. 3. – P. 573–582.
181. Lipid diffusion in the plasma membrane of mouse spermatozoa: changes during epididymal maturation, effects of pH, osmotic pressure, and knockout of the c-ros gene / Y. Christova [et al.] // *J. Androl.* – 2002. – Vol. 23 – P. 384–392.
182. Mann, T. Male reproductive function and semen / T. Mann, C. Lutwak-Mann. – Berlin : Springer-Verlag, 1981. – 495 p.
183. Mann, T. The biochemistry of semen and of the male reproductive tract / T. Mann. – London : Methuen, 1964. – 493 p.
184. Marine fish spermatozoa: racing ephemeral swimmers / J. Cosson [et al.] // *Reproduction.* – 2008. – Vol. 136, iss. 3. – P. 277–294.
185. McKemy, D. D. How cold is it? TRPM8 and TRPA1 in the molecular logic of cold sensation / D. D. McKemy // *Molecular. Pain.* – 2005. – Vol. 1 – P. 16.
186. McKemy, D. D. Temperature sensing across species, Pflugers / D. D. McKemy // *Architects.* – 2007. – Vol. 454. – P. 777–791.
187. Measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish / E. Rurangwa [et al.] // *Aquaculture.* – 2004. – Vol. 234, iss. 1–4. – P. 1–28.
188. Membrane hyperpolarization removes inactivation of Ca²⁺ channels leading to Ca²⁺ influx and initiation of sperm motility in the common carp / Z. Krasznai [et al.] // *PNAS.* – 2000. – Vol. 97, iss. 5. – P. 2052–2067.
189. Mims, S. D. Evaluation of activator solutions, motility duration, and short-term storage of paddlefish spermatozoa / S. D. Mims // *J. World Aqua Soc.* – 1991. – Vol. 22, iss. 4. – P. 224–229.
190. Morisawa, M. Adaptation and strategy for fertilization in the sperm of teleosts fish / M. Morisawa // *J. Appl. Ichthyol.* – 2008. – Vol. 24, iss. 4. – P. 362–370.
191. Morisawa, M. Cyclic-AMP induces maturation of trout sperm axoneme to initiate motility / M. Morisawa, M. Okuno // *Nature.* – 1982. – Vol. 295 – P. 703–704.
192. Morisawa, M. Effects of potassium and osmolality on spermatozoan motility of salmonid fishes / M. Morisawa, K. Suzuki, S. Morisawa // *J. Exp. Biol.* – 1983. – Vol. 107, iss. 1. – P. 105–113.
193. Morisawa, M. Osmolality and potassium ion: their role in initiation of sperm motility in teleosts / M. Morisawa, K. Suzuki // *Science.* – 1980. – Vol. 210, iss. 4474. – P. 1145–1147.
194. Morisawa, M. Role of Ca²⁺ and calmodulin on the initiation of sperm motility in salmonids fishes / M. Morisawa, K. H. Kho, K. S. Choi // *J. Microbiol. Biotechnol.* – 2004. – Vol. 14, iss. 3. – P. 456–465.
195. Morphological and kinetic changes of carp (*Cyprinus carpio*) spermatozoa after initiation of motility in distilled water / G. Perchec [et al.] // *Cell Motil. Cytoskel.* – 1996. – Vol. 35, iss. 2. – P. 113–120.
196. Morphology and fine structure of *Acipenser persicus* (Acipenseridae, Chondrostei) spermatozoon: inter-species comparison in Acipenseriformes / A. Hatef [et al.] // *Anim. Reprod. Sci.* – 2011. – Vol. 123, iss. 1–2. – P. 81–88.

197. Morphology and fine structure of the Russian sturgeon, *Acipenser gueldenstaedtii* (*Acipenseridae*, *Chondrostei*) spermatozoa / A. Hatef [et al.] // J. Appl. Ichthyol. – 2012. – Vol. 28, iss. 6. – P. 978–983.
198. Morphology and ultrastructure of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) spermatozoa using scanning and transmission electron microscopy / M. Psenicka [et al.] // Biol. Cell. – 2007. – Vol. 99, iss. 2. – P. 103–115.
199. Morphology, chemical contents and physiology of chondrosteian fish sperm: a comparative study between Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) and sterlet (*Acipenser ruthenus*). / M. Psenicka [et al.] // J. Appl. Ichthyol. – 2008. – Vol. 24, iss. 4. – P. 371–377.
200. Morphometric characterization of sharpsnout sea bream (*Diplodus puntazzo*) and gilt-head sea bream (*Sparus aurata*) spermatozoa using computer-assisted spermatozoa analysis (ASMA) / F. J. Marco-Jimenez [et al.] // J. Appl. Ichthyol. – 2008. – Vol. 24, iss. 4. – P. 382–385.
201. Motility analysis and energetics of the Siberian sturgeon *Acipenser baerii* spermatozoa / R. Billard [et al.] // J. Appl. Ichthyol. – 1999. – Vol. 15. – P. 199–203.
202. Motility and fertilizing capability of cryopreserved *Acipenser ruthenus* L. sperm / H. Jahnichen [et al.] // J. Appl. Ichthyol. – 1999. – Vol. 15, iss. 4–5. – P. 204–206.
203. Motility and fertilizing capacity of fresh and frozen-thawed spermatozoa in sturgeons *Acipenser baerii* and *A. ruthenus* / L. I. Tsvetkova [et al.] // J. Appl. Ichthyol. – 1996. – Vol. 12, iss. 2. – P. 107–112.
204. Motility of spermatozoa of *Alburnus alburnus* (*Cyprinidae*) and its relationship to seminal plasma composition and sperm metabolism / F. Lahnsteiner [et al.] // Fish Physiol. Biochem. – 1996. – Vol. 15, iss. 2. – P. 167–179.
205. Multivariate cluster analysis to study motility activation of *Solea senegalensis* spermatozoa: a model for marine teleosts / F. Martinez-Pastor [et al.] // Reproduction. – 2008. – Vol. 135, iss. 4. – P. 449–459.
206. Nucleotide content, oxydative phosphorylation, morphology, and fertilizing capacity of turbot (*Psetta maxima*) spermatozoa during the motility period / C. Dreanno [et al.] // Mol. Reprod. Dev. – 1999. – Vol. 53, iss. 2. – P. 230–243.
207. Nucleotides in bivalves: Extraction and analysis by high performance liquid chromatography (HPLC) / J. Moal [et al.] // Comp. Biochem. Physiol. B. – 1989. – Vol. 93, iss. 2. – P. 307–316.
208. Nynca, J. Measurement of concentration and viability of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) spermatozoa using computer-aided fluorescent microscopy / J. Nynca, A. Ciereszko // Aquaculture. – 2009. – Vol. 292, iss. 3–4. – P. 256–258.
209. Objective analysis of sperm motility in the Lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*): activation and inhibition conditions / G. P. Toth [et al.] // Aquaculture. – 1997. – Vol. 154, iss. 3–4. – P. 337–348.
210. Park, C. An extender solution for the shorttermstorage of sturgeon semen / C. Park, F. A. Chapman // Nor. Am. J. Aquacult. – 2005. – Vol. 67, iss. 1. – P. 52–57.
211. Parks, J. E. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion and rooster sperm membrane / J. E. Parks, D. V. Lynch // Cryobiol. – 1992. – Vol. 29. – P. 255–266.
212. Pérez-Crespo, M. Scrotal heat stress effects on sperm viability, sperm DNA integrity, and the offspring sex ratio in mice / M. Pérez-Crespo, B. Pintado, A. Gutiérrez-Adán // Mol. Reprod. Dev. – 2008. – Vol. 75. – P. 40–47.
213. Potassium channels regulate hypo-osmotic shock-induced motility of common carp (*Cyprinus carpio*) sperm / Z. Krasznai [et al.] // Aquaculture. – 1995. – Vol. 129, iss. 1–4. – P. 123–128.

214. Preparation and administration of Gonadotropin-Releasing Hormone Agonist (GnRHa) implants for the artificial control of reproductive maturation in captive-reared Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus thynnus*) // C. C. Mylonas [et al.] // Rev. Fish. Sci. – 2007. – Vol. 15, iss. 3. – P. 183–210.
215. Psenicka, M. Ultrastructural study on the fertilisation process in sturgeon (*Acipenser*), function of acrosome and prevention of polyspermy / M. Psenicka, M. Rodina, O. Linhart // Anim. Reprod. Sci. – 2010. – Vol. 117, iss. 1–2. – P. 147–154.
216. Quality assessment of wild Atlantic sturgeon semen under conditions of short-term storage / K. M. Dorsey [et al.] // Nor. Am. J. Aquacult. – 2011. – Vol. 73. – P. 418–425.
217. Quality control of refrigerated and cryopreserved semen using computer-assisted sperm analysis (CASA), viable staining and standardized fertilization in African catfish (*Clarias gariepinus*) / E. Rurangwa [et al.] // Theriogenol. – 2001. – Vol. 55, iss. 3. – P. 751–769.
218. Rapid and quantitative assessment of trout spermatozoa motility using stroboscopy / M. P. Cosson [et al.] // Aquaculture. – 1985. – Vol. 46. – P. 71–75.
219. Relationship between sperm ATP content and motility of carp spermatozoa / G. Perchec [et al.] // J. Cell Sci. – 1995. – Vol. 108, iss. 2. – P. 747–753.
220. Relationships between selected sperm characteristics and fertilization success in the beluga sturgeon (*Huso huso*, Linnaeus, 1758) / M. S. Aramli [et al.] // Veterinarni Medicina. – 2015. – Vol. 60, № 9. – P. 509–514.
221. Reproductive criteria of beef bulls during and after exposure to increased ambient temperature / D. C. Meyerhoffer [et al.] // Animal Science. – 1985. – Vol. 60. – P. 352–357.
222. Roles of extracellular Ca²⁺ and pH on motility and flagellar wave form parameters in sturgeon spermatozoa / S. M. H. Alavi [et al.] // Cybium. – 2008. – Vol. 32, suppl. 2. – P. 124–126.
223. Roles of osmolality, calcium-potassium antagonist and calcium in activation and flagellar beating partem of sturgeon sperm / S. M. H. Alavi [et al.] // Comp. Biochem. Physiol. – 2011. – Vol. 160A. – P. 166–174.
224. Safaa, H. M. Seasonal effects on semen quality in Black Baladi and white New Zealand rabbit bucks / H. M. Safaa, M. E. Emarah, N. F. A. Saleh // World Rabbit Science. – 2008. – Vol. 16. – P. 13–20.
225. Sanocka, D. Reactive oxygen species and sperm cells / D. Sanocka, M. Kurpisz // Reprod. Biol. Endocrinol. – 2004. – Vol. 23. – P. 2–12.
226. Schwantes, M. L. Adaptive features of ectothermic enzymes – I. Temperature effects on the malate dehydrogenase from a temperate fish *Leiostomus xanthurus* / M. L. Schwantes, A. R. Schwantes // Comp. Biochem. Physiol. – 1982. – Vol. 72. – P. 49–58.
227. Short-term cold storage of Atlantic sturgeon sperm / M. N. DiLauro [et al.] // Prog. Fish. Cult. – 1994. – Vol. 56. – P. 143–144.
228. Short-term preservation of carp (*Cyprinus carpio*) semen / A. Saad [et al.] // Aquaculture. – 1988. – Vol. 71, iss. 1–2. – P. 133–150.
229. Siberian sturgeon spermatozoa: effects of dilution, pH, osmotic pressure, sodium and potassium ions on motility / J. L. Gallis [et al.] // Acipenser: proceedings of the first International Sturgeon Symposium, Bordeaux, 3–6 October 1989 / Cemagref, ed.: P. Williot. – Bordeaux, 1991. – P. 143–151.
230. Some chemical and physical characteristics of the semen of *Cyprinus carpio* and *Oreochromis mossambicus* / J. C. Kruger [et al.] // J. Fish Biol. – 1984. – Vol. 24. – P. 263–272.
231. Sperm biological characteristics in European hake (*Merluccius merluccius*) / A. L. Groison [et al.] // Cybium. – 2008. – Vol. 32, suppl. 2. – P. 178.

232. Sperm biology and control of reproduction in sturgeon: (I) testicular development, sperm maturation and seminal plasma characteristics / S. M. H. Alavi [et al.] // Reviews in Fish Biology and Fisheries. – 2012. – Vol. 22, iss. 3. – P. 695–717.
233. Sperm morphology, ATP content and analysis of motility in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) / S. M. H. Alavi [et al.] // Can. J. Zool. – 2011. – Vol. 89. – P. 219–228.
234. Sperm motility and seminal fluid composition in the burbot, *Lota lota* / F. Lahnsteiner [et al.] // J. Appl. Ichthyol. – 1997. – Vol. 13. – P. 113–119.
235. Sperm motility of *Prochilodus lineatus* in relation to dilution rate and temperature of the activating medium / E. Romagosa [et al.] // J. Appl. Ichthyol. – 2010. – Vol. 26. – P. 678–681.
236. Sperm physiology and quality / R. Billard [et al.] // Broodstock Management and Egg and Larval Quality / ed.: N. Bromage, R. Roberts. – Oxford : Blackwell, 1995. – P. 25–52.
237. Spermatozoal motility in the Persian sturgeon (*Acipenser persicus*): Effects of pH, dilution rate, ions and osmolality / S. M. H. Alavi [et al.] // Reproduction. – 2004. – Vol. 128, iss. 6. – P. 819–828.
238. Spermatozoa motility of trout (*Oncorhynchus mykiss*) and carp (*Cyprinus carpio*) / G. Perchec [et al.] // Appl. Ichthyol. – 1993. – Vol. 9. – P. 129–149.
239. Spermatozoal competition in common carp (*Cyprinus carpio*): what is the primary determinant of competition success? / O. Linhart [et al.] // Reproduction. – 2005. – Vol. 130. – P. 705–711.
240. Spontaneous activation of spermatozoa motility by routine freeze-thawing in different fish species / B. Dzyuba [et al.] // J. Appl. Ichthyol. – 2010. – Vol. 26. – P. 720–725.
241. Stein, H. Cryopreservation of the sperm of some freshwater teleosts / H. Stein, H. Bayrle // Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys. – 1978. – Vol. 18, № 4. – P. 1073–1076.
242. Stoss, J. Cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) sperm. Effect of thawing solution, sperm density and interval between thawing and insemination / J. Stoss, W. Holtz // Aquaculture. – 1981. – Vol. 22. – P. 97–104.
243. Stoss, J. Cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) sperm. The effect of DMSO concentration and equilibration time on sperm survival, sucrose and KCL as extender components and the osmolality of the thawing solution / J. Stoss, W. Holtz // Aquaculture. – 1983. – Vol. 32. – P. 321–330.
244. Stoss, J. Fish gamete preservation and spermatozoan physiology / J. Stoss // Fish physiology / ed.: W. S. Hoar, D. J. Randall, E. M. Donaldson. – New York : Academic Press, 1983. – Vol. 9, part B. – P. 305–350.
245. Studies on the semen biology and sperm cryopreservation in the sterlet (*Acipenser ruthenus* L.) / F. Lahnsteiner [et al.] // Aqua Res. – 2004. – Vol. 35, iss. 6. – P. 519–528.
246. Studying sperm motility in marine fish: an overview on the state of the art / J. Cosson [et al.] // J. Appl. Ichthyol. – 2008. – Vol. 24, iss. 4. – P. 460–486.
247. Suquet, M. Assessment of sperm concentration and motility in turbot (*Scophthalmus maximus*) / M. Suquet [et al.] // Aquaculture. – 1992. – Vol. 101, iss. 1–2. – P. 177–185.
248. Takai, H. Change in intracellular K⁺ concentration caused by external osmolality change regulates sperm motility of marine and freshwater teleosts / H. Takai, M. Morisawa // J. Cell Sci. – 1995. – Vol. 108, iss. 3. – P. 1175–1181.
249. Temperature management during semen processing: impact on boar sperm quality under laboratory and field conditions / M. Schulze [et al.] // Theriogenol. – 2013. – Vol. 80. – P. 990–998.
250. Thamizhselvi, N. Effect of stripping frequency, temperature and dilution on the spermatozoa of cyprinid fish *Barbus conchoni* / N. Thamizhselvi // International Journal of Life Science and Pharma Research. – 2014. – Vol. 3. – P. 159–165.

251. The application of image cytometry to viability assessment in dual fluorescence-stained fish spermatozoa / M. Flajshans [et al.] // *Cell Biol. Intl.* – 2004. – Vol. 28, iss. 12. – P. 955–959.
252. The contribution of TRPM8 channels to cold sensing in mammalian neurons / E. De la Pena [et al.] // *J. Physiol.* – 2005. – Vol. 567. – P. 415–426.
253. The influence of semen cryopreservation on the release of some enzymes from Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) and sterlet (*Acipenser ruthenus*) spermatozoa / B. Sarosiek [et al.] // *Arch. Pol. Fish.* – 2004. – Vol. 12, fasc. 1. – P. 13–21.
254. The influence of various cryoprotectants on semen quality of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) before and after cryopreservation / F. Lahnsteiner [et al.] // *J. Appl. Ichthyol.* – 1996. – Vol. 12. – P. 99–106.
255. The mechanisms of action of mercury on sperm morphology, Adenosine triphosphate content and motility in *Perca fluviatilis* (Percidae, Teleostei) / A. Hatef [et al.] // *Environ. Toxicol. Chem.* – 2011. – Vol. 30, iss. 4. – P. 905–914.
256. The relationship of the cryoprotectants methanol and dimethyl sulfoxide and hyperosmotic extenders on sperm cryopreservation of two North-American sturgeon species / A. Horvath [et al.] // *Aquaculture.* – 2005. – Vol. 247, iss. 1–4. – P. 243–251.
257. The role of hormones in the acquisition of sperm motility in salmonid fish / T. Miura // *J. Exp. Zool.* – 1992. – Vol. 261, iss. 3. – P. 359–363.
258. The use of creatine-phosphate plus ADP as energy source for motility of membrane deprived trout spermatozoa / C. Saudrais [et al.] // *Cell Motil. Cytoskel.* – 1998. – Vol. 41, iss. 2. – P. 91–106.
259. Thermal reaction norms in sperm performance of Atlantic cod (*Gadus morhua*) / C. F. Purchase [et al.] // *Can. J. Fish. Aqua. Sci.* – 2010. – Vol. 67. – P. 498–510.
260. Thermosensitive ion channel TRPV1 is endogenously expressed in the sperm of a fresh water teleost fish (*Labeo rohita*) and regulates sperm motility / R. K. Majhi // *Channels* (Austin, Tex.) – 2013. – Vol. 7. – P. 1–10.
261. Transmembrane signal transduction for the regulation of sperm motility in fishes and ascidians / M. Morisawa [et al.] // *The male gamete: from basic to clinical applications* / ed.: C. Gagnon. – Vienna : Cache Rive Press, 1999. – P. 149–160.
262. Tuset, V. M. Sperm morphology and its influence on swimming speed in Atlantic cod / V. M. Tuset, E. A. Trippel, J. De Montserrat // *J. Appl. Ichthyol.* – 2008. – Vol. 24, iss. 4. – P. 398–405.
263. Ultrastructure and morphology of sperm in Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*, Gray 1835) using scanning and transmission electron microscopy / Q. Wei [et al.] // *Theriogenol.* – 2007. – Vol. 67, iss. 7. – P. 1269–1278.
264. Urbany, B. Successful hybridization of *Acipenser species* using cryopreserved sperm / B. Urbany, A. Horvath, B. Kovacs // *Aquaculture Intl.* – 2004. – Vol. 12. – P. 47–56.
265. Urinary bladder, ionic composition of seminal fluid and urine with characterization of sperm motility in tench (*Tinca tinca* L.) / O. Linhart [et al.] // *J. Appl. Ichthyol.* – 2003. – Vol. 19, iss. 3. – P. 177–181.
266. Van Look, K. J. W. Automated sperm morphology analysis in fishes: the effect of mercury on goldfish sperm / K. J. W. Van Look, D. E. Kime // *J. Fish Biol.* – 2003. – Vol. 63, iss. 4. – P. 1020–1033.
267. Viability and fertilizing capacity of cryopreserved sperm from three North American acipenseriform species : a retrospective study / A. Horvath [et al.] // *J. Appl. Ichthyol.* – 2008. – Vol. 24, iss. 4. – P. 443–449.

268. Vladoić, T. Sperm motility and fertilization time span in Atlantic salmon and brown trout – the effect of water temperature / T. Vladoić, T. Jarvi // J. Fish Biol. – 1997. – Vol. 50. – P. 1088–1093.
269. Vladoić, T. V. Sperm quality as reflected through morphology in salmon alternative life histories / T. V. Vladoić, B. A. Afzelius, G. E. Bronnikov // Biol. Reprod. – 2002. – Vol. 66. – P. 98–105.
270. Watson P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen / P. F. Watson // Anim. Reprod. Sci. – 2000. – Vol. 60–61. – P. 481–492.
271. Wayman, W. R. From gamete collection to database development: development of a model cryopreserved germplasm repository for aquatic species with emphasis on Sturgeon : Ph. D. Dissertation / W. R. Wayman; Louisiana State University. – Baton Rouge, 2003. – 286 p.
272. Why the WHO recommendations for eosin-nigrosin staining techniques for human sperm vitality assessment must change / L. Björndahl // J. Androl. – 2004. – Vol. 25, iss. 5. – P. 671–678.
273. Wildt, D. E. Genome resource banking: impact on biotic conservation and society / D. E. Wildt // Reproductive tissue banking / ed.: A. Karow, J. Critser. – New York : Academic Press, 1997. – P. 399–439.
274. Williot, P. Influence of testis state, temperature and delay in semen collection on spermatozoa motility in the cultured Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*, Brandt) / P. Williot, E. F. Kopeika, B. F. Goncharov // Aquaculture. – 2000. – Vol. 189. – P. 53–61.
275. Wilson-Leedy, J. G. Development of a novel CASA system based on open source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters / J. G. Wilson-Leedy, R. L. Ingermann // Theriogenol. – 2007. – Vol. 67, iss. 3 – P. 661–672.
276. Wilson-Leedy, J. G. Influence of osmolality and ions on the activation and characteristics of zebrafish sperm motility / J. G. Wilson-Leedy, M. K. Kanuga, R. L. Ingermann // Theriogenol. – 2009. – Vol. 71, iss. 7. – P. 1054–1062.
277. Wpływ kobamamidu w płynie kriochronnym zamrażanego nasienia na wyniki odchowu narybku karpia (*Cyprinus carpio*) / W. Czerepnin [et al.] // Wiadomości Zootekniczne. – 2012. – Vol. 274, № 3. – S. 61–64.
278. Wrobel, K. H. Morphology, development and comparative anatomical evaluation of the testicular excretory pathway in *Acipenser* / K. H. Wrobel, S. Jouma // Ann. Anat. – 2004. – Vol. 186, iss. 2. – P. 99–113.
279. Zarnescu, O. Ultrastructural study of spermatozoa of the paddlefish (*Polyodon spathula*) / O. Zarnescu // Zygote. – 2005. – Vol. 13, iss. 3. – P. 241–247.
280. Zohar, Y. New approaches for the manipulation of ovulation and spawning in farmed fish / Y. Zohar // Bull. Natl. Res. Inst. Aquac. – 1996. – Vol. 2. – P. 43–48.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
1. БИОЛОГИЯ СПЕРМЫ ОСЕТРОВЫХ РЫБ И ОЦЕНКА ЕЕ КАЧЕСТВА.....	5
1.1. Морфология сперматозоида.....	5
1.1.1. Головка сперматозоида.....	6
1.1.2. Средняя часть сперматозоида.....	6
1.1.3. Жгутик сперматозоида.....	7
1.2. Подвижность и энергетика сперматозоидов.....	8
1.2.1. Общая характеристика подвижности сперматозоидов и активности..	8
1.2.2. Влияние pH на продолжительность подвижности сперматозоидов...	9
1.2.3. Влияние K ⁺ на продолжительность подвижности сперматозоидов....	10
1.2.4. Влияние Ca ²⁺ на продолжительность подвижности сперматозоидов..	12
1.2.5. Влияние осмолальности на продолжительность подвижности сперматозоидов.....	13
1.2.6. Модель для регулирования активации и подвижности сперматозоидов осетровых.....	14
1.3. Целостность мембраны сперматозоидов.....	15
1.4. Энергетическое содержание спермы рыб.....	16
1.5. Концентрация спермы.....	18
1.6. Подвижность сперматозоидов.....	21
1.6.1. Субъективная оценка подвижности сперматозоидов.....	21
1.6.2. Описание процесса подвижности сперматозоидов.....	21
1.7. Количественная оценка подвижности сперматозоидов.....	22
2. ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ФАКТОРОВ НА ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ СПЕРМАТОЗОИДОВ РЫБ.....	25
2.1. Количественные параметры подвижности сперматозоидов.....	25
2.2. Скорость движения сперматозоидов.....	27
2.3. Частота биения жгутика.....	28
2.4. Содержание АТФ в клетках сперматозоидов.....	29
2.5. Состав семенной плазмы.....	29
2.6. Морфологические характеристики сперматозоидов.....	31
3. ХРАНЕНИЕ СПЕРМЫ ОСЕТРОВЫХ РЫБ.....	33
3.1. Краткосрочное хранение спермы.....	33
3.2. Криоконсервация спермы.....	35
3.3. Консерванты и антиоксиданты.....	43
4. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	46
5. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	49
5.1. Апробация метода CASA в исследовании сперматозоидов осетровых рыб.	49
5.2. Компьютерный анализ подвижности сперматозоидов ленского осетра в аквакультуре.....	64
5.3. Влияние различной концентрации разбавления спермы сибирского осетра на качественные и количественные показатели сперматозоидов в течение краткосрочного хранения.....	68
5.4. Влияние консервирующих веществ на период краткосрочного хранения спермы осетровых рыб.....	78
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	157
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК.....	159

Научное издание

Барулин Николай Валерьевич
Шумский Константин Леонардович

РЕГУЛИРОВАНИЕ КАЧЕСТВА СПЕРМОПРОДУКЦИИ
ОСЕТРОВЫХ РЫБ В ТЕХНОЛОГИИ ВОСПРОИЗВОДСТВА
ОБЪЕКТОВ АКВАКУЛЬТУРЫ

Монография

Редактор *О. Н. Минакова*
Технический редактор *Н. Л. Якубовская*

Подписано в печать 04.11.2019. Формат 60×84¹/₁₆. Бумага офсетная.
Ризография. Гарнитура «Таймс». Усл. печ. л. 10,23. Уч.-изд. л. 9,25.
Тираж 100 экз. Заказ .

УО «Белорусская государственная сельскохозяйственная академия».
Свидетельство о ГРИРПИ № 1/52 от 09.10.2013.
Ул. Мичурина, 13, 213407, г. Горки.

Отпечатано в УО «Белорусская государственная сельскохозяйственная академия».
Ул. Мичурина, 5, 213407, г. Горки.