

Ключевые слова:
криоконсервация,
криопротектор,
криоконсервированная
сперма, лососевые рыбы,
лососеобразные рыбы

Keywords:
cryopreservation,
cryoprotectant, cryopreserved
sperm, salmonids,
salmoniformes

Криоконсервация спермы лососеобразных рыб: современное состояние и перспективы

DOI

Канд. хим. наук **О.Б. Докина** – ведущий научный сотрудник, Филиал по пресноводному рыбному хозяйству ФГБНУ «ВНИРО» («ВНИИПРХ»); канд. биол. наук

А.А. Красильникова – старший научный сотрудник, ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Южный научный центр Российской академии наук»; канд. с/х наук, **К.В. Ковалев** – заведующий лабораторией криобиологии, Филиал по пресноводному рыбному хозяйству ФГБНУ «ВНИРО» («ВНИИПРХ»);

Н.Д. Пронина – главный специалист, Филиал по пресноводному рыбному хозяйству ФГБНУ «ВНИРО» («ВНИИПРХ»)

@ olgadokina@mail.ru;
alexandra.kras@ya.ru;
silur5@mail.ru;
proninatasha@rambler.ru

CRYOPRESERVATION OF SALMONIFORMES SPERM: CURRENT STATUS AND PERSPECTIVES

PhD. Candidate of Chemical Sciences **O. B. Dokina** – Leading Researcher, Branch for Freshwater Fisheries of the FGBNU "VNIRO" ("VNIIPRH");
PhD. Candidate of Biological Sciences **A. A. Krasilnikova** – Senior Researcher, Federal Research Center Southern Scientific Center of the Russian Academy of Sciences,
PhD. Candidate of Agricultural Sciences, **K. V. Kovalev** – Head of the Laboratory of Cryobiology, Branch for Freshwater Fisheries of the FGBNU "VNIRO" ("VNIIPRH");
N. D. Pronina – Chief Specialist, Branch for Freshwater Fisheries of FGBNU "VNIRO" ("VNIIPRH")
olgadokina@mail.ru; alexandra.kras@ya.ru; silur5@mail.ru; proninatasha@rambler.ru

Analysis of information from published sources was carried out with the aim of determining the most perspective tendencies and technological approaches in the field of research of salmoniformes sperm cryopreservation methods. Comparative evaluation of currently used methods, analysis of their effectiveness, and discussion of possibility of cryopreservation protocols standardization for the use in aquaculture are presented in this review.

ВВЕДЕНИЕ

В условиях усиления антропогенного воздействия на водные биосистемы и интенсивного развития аквакультуры, все большую актуальность приобретает криоконсервация спермы рыб как метод сохранения и восстановления редких и исчезающих видов, поддержания генетического разнообразия естественных популяций и объектов рыбоводства.

В научной литературе по способам криоконсервации спермы лососеобразных рыб

накоплен большой объем фактических сведений, часто противоречивых и не воспроизводимых по результатам, что обусловлено биологической неоднородностью материала. Приводятся детальные описания осуществления и оценки каждого этапа процедуры, начиная со сбора и проверки качества эякулятов и заканчивая осеменением икры размороженной спермой с последующей оценкой выхода и качества потомства. Наиболее эффективные из разработанных технологий

криоконсервации обеспечивают выживаемость размороженных клеток и сохранение ими оплодотворяющей способности на уровне нативной спермы. Современные исследования касаются всех аспектов процесса, включая изучение криоповреждений клеток с использованием новейшего аналитического инструментария.

Проблемой криоконсервации спермы лососеобразных рыб занимались коллективы ученых во многих странах Европы (включая Россию и Украину), а также – в США, Канаде, Бразилии, Чили, Японии, Китае, Турции, Иране.

Большинство работ выполнено на радужной форели (*Oncorhynchus mykiss*) и атлантическом лососе (*Salmo salar*). Изучалась возможность глубокого замораживания спермы и других видов лососевых: кумжи (*Salmo trutta f. fario*, *Salmo trutta f. lacustris*, *Salmo trutta macrostigma*, *Salmo trutta m. trutta*, *Salmo trutta caspius*) [28; 29; 50; 54; 55; 66; 67; 75; 76; 82; 83; 92; 93; 97; 98; 101; 107; 116; 117; 121; 129; 140; 141; 150], мраморной форели (*Salmo marmoratus*) [74; 75], аризонской форели (*Oncorhynchus apache*) [45], арктического гольца (*Salvelinus alpinus*) [92; 93; 97; 101; 105; 106; 128; 129; 135; 136], американского гольца (*Salvelinus fontinalis*) [54; 55; 80; 82; 83; 92; 93; 95; 97; 101; 117; 121], дунайского лосося (европейского тайменя) (*Hucho hucho*) [63; 92; 100; 101; 119], чавычи (*Oncorhynchus tshawytscha*) [7; 54], нерки (*Oncorhynchus nerka*) [5; 6], кеты (*Oncorhynchus keta*) [7], микижи (*Salmo mykiss*) [4], сахалинского тайменя (*Hucho perryi*) [87; 88], тайваньского лосося (*Oncorhynchus masou formosanus*) [69], симы (*Oncorhynchus masou masou*, *Oncorhynchus masou ishikawae*) [69; 123; 124; 157] и лососеобразных рыб: муксуна (*Coregonus muksun*) [131, 133], обыкновенного сига (*Coregonus lavaretus*) [41; 42; 49; 83; 92; 97; 98; 101; 118; 121; 130; 139], байкальского омуля (*Coregonus migratorius*) [10], европейского хариуса (*Thymallus thymallus*) [72-75; 92; 100; 101; 108; 119], щуки (*Esox lucius*) [18-20; 23; 36; 46; 49; 64; 99; 144; 159], белорыбицы (*Stenodus leucichthys*) [1; 8; 11].

В представленном аналитическом обзоре предпринята попытка систематизации обширного опубликованного материала с целью выявления наиболее перспективных тенденций и технологических подходов в области исследований способов криоконсервации спермы лососеобразных рыб.

ИСТОРИЧЕСКИЙ ОПЫТ РАЗРАБОТКИ СПОСОБОВ КРИОКОНСЕРВАЦИИ СПЕРМЫ ЛОСОСЕОБРАЗНЫХ РЫБ

Более половины исследований, проведенных в XX в. по криоконсервации спермы рыб, было выполнено на лососеобразных рыбах, начиная от первых попыток замораживания, предпринятых в середине 60-х годов, что объясняется ценностью этих видов, как важнейших объектов аквакультуры, и необходимостью восстановления генетического разнообразия деградированных естественных популяций. Проведенный нами ра-

С целью выявления наиболее перспективных тенденций и технологических подходов в области исследований способов криоконсервации спермы лососеобразных рыб проведен анализ сведений из литературных источников. В представленном обзоре дана сравнительная оценка используемых в настоящее время методик, проанализирована их эффективность, обсуждена возможность стандартизации протоколов криоконсервации для применения в аквакультуре.

нее анализ опубликованных сведений выявил характерные особенности протоколов криоконсервации, установленные к середине 90-х годов [2].

Сперма, криозащитная среда и контейнеры, в которых осуществляется замораживание разбавленной средой спермы, должны охлаждаться перед использованием. Сперма после сбора должна храниться на холоде (4-5°C) тонким слоем во влажной атмосфере в незакрытой таре. При разбавлении спермы защитной средой, большинством исследователей принималось соотношение: 1 часть спермы к 3-4 частям разбавителя. При этом выяснилось, что для лососевых нет необходимости в эквilibрации полученной суспензии, требующейся, как первоначально считалось, для полного проникновения криопротектора в клетки.

Представленные протоколы различались, в первую очередь, составом использованных криозащитных сред, состоящих из разбавителя и криопротекторов. Первоначально испытываемые разбавители, по аналогии с разбавителями для спермы млекопитающих, были многокомпонентными, имитирующими солевой состав семенной плазмы, в которые включались буферы, сахара, протеины, липопротеины, антибиотики и другие соединения. Наиболее часто использовались в той или иной степени модифицируемые авторами среды на основе:

- разбавителя Моуниба (125 мМ сахарозы, 100 мМ KHCO_3 , 6,5 мМ восстановленного глутатиона) [22; 90; 102; 104; 113; 129];

- разбавителя Кортланда (на 1 л воды содержит 1,88 г NaCl ; 7,2 г KCl ; 0,41 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,23 г $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,23 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1 г NaHCO_3 , 1 г глюкозы) [142];

- среда Штайна (на 1 л воды содержит 7,5 г NaCl ; 0,38 г KCl ; 2 г NaHCO_3 ; 0,53 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,46 г $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,23 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1 г глюкозы; 5 г глицина; 20% желтка куриного яйца, 10% диметилсульфоксида (ДМСО) [12; 46; 144];

- среда Штосса, Хольтца (101 мМ NaCl ; 23 мМ KCl ; 5,4 мМ CaCl_2 ; 1,3 мМ MgSO_4 ; 200 мМ трис; лимонная кислота до pH 8,0; 4 г/л бычьего сывороточного альбумина (BSA); 7,5 г/л соевого белка; 10% ДМСО) [133; 146-149];

- среда Эрдэла, Грэма (на 1 л воды содержит 0,105 г $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,22 г $\text{MgCl}_6 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,265 г Na_2HPO_4 ; 2,558 г KCl ; 5,841 г NaCl ; 0,1 г лимонной кислоты; 10 г глюкозы, 10 мл раствора (1,27

г/100 мл) КОН; 20 мл раствора (5,3 г/100 мл) бицина; рН 7,8; 7% ДМСО) [18; 54; 55].

Однако вскоре появились сообщения об успешном применении самых простых криозащитных сред: растворов глюкозы или сахарозы и ДМСО с добавлением желтка или без него [70; 71; 108; 129; 133; 145; 150].

В качестве проникающего криопротектора в работах этого периода чаще всего использовался ДМСО. Этиленгликоль и пропиленгликоль были малоэффективны [54], а защитное действие глицерина, необычное для спермы пресноводных рыб, было обнаружено Piironen J. и др. [133] для сперматозоидов сигов и арктического гольца лишь в сочетании с методикой гранулирования. Канадскими исследователями [109] была показана пригодность диметилацетамида (ДМАА) в качестве альтернативного криопротектора для замораживания спермы радужной форели. Л.И. Цветкова и М.В. Каранова [12] обнаружили криопротективное действие антифризных гликопротеинов (АФГП), выделенных из сыворотки крови атлантической трески. Наибольшая эффективность препарата АФГП в концентрациях 5 и 10 мг/мл достигалась в сочетании с 5% ДМСО в разных средах при замораживании спермы радужной форели.

Замораживание спермы, как сообщалось в этот период, осуществлялось на сухом льду и/или в парах жидкого азота (LN_2) в стеклянных ампулах или пластиковых пробирках объемом 0,5-2 мл, пластиковых соломинках объемом 250-1500 мкл или в виде гранул объемом 40-200 мкл. В ряде работ по замораживанию спермы радужной форели испытывались большие соломинки объемом 4,5-5 мл [104; 145; 155]. Значения скоростей замораживания, в зависимости от объема контейнера, предлагались в интервале 30-160°C/мин (техника гранул ограничивается величиной около 30°C/мин).

Оттаивание контейнеров с криоконсервированной спермой происходило на водяной бане при температурах от 4 до 60°C. Гранулы размораживались в растворах $NaHCO_3$, $NaCl$, в овариальной жидкости или в исходном разбавителе.

Оценка эффективности криоконсервации в рассматриваемых протоколах проводилась по подвижности и оплодотворяющей способности размороженной спермы. Несмотря на ряд сообщений об очень успешных опытах [54; 55; 103; 108; 129; 133; 146; 147], существовали трудности в воспроизведении их результатов, связанные с индивидуальными различиями в качестве спермы. Для уменьшения влияния этих различий рекомендовалось замораживание смеси спермы разных самцов, а при оплодотворении – десятикратное увеличение количества размороженной спермы по сравнению со свежей спермой [103].

Многие авторы отмечали, что способ оплодотворения икры оказывает сильное влияние на результаты. Так как сперма лососевых быстро теряет способность активироваться после оттаивания, рекомендовано добавление к икре

частично оттаявшей спермы, достигшей стадии «талого снега» [143]. Вода не должна использоваться для активации спермы («мокрый» способ оплодотворения), так как она укрепляет оболочку икринок и закрывает микроотверстие, через которое проникает сперматозоид. В гипотоничной среде осмотическое давление вызывает непоправимое повреждение спермиев. В природе икра оплодотворяется не с помощью воды, а несмотря на присутствие воды. И сперма, и икра защищены их изотоничными жидкостями. В «сухом» способе, после смешивания размороженной спермы с икрой, рекомендуется добавление активирующего раствора, в качестве которого первоначально использовались овариальная жидкость, растворы 119 мМ $NaHCO_3$, 120 мМ $NaCl$ [71; 146-150], а впоследствии предпочтение отдавалось буферному раствору, содержащему 0,9% $NaCl$, 0,01 М трис, 0,02 М глицина, рН 9 [102; 129; 142]. Характерная, очень короткая, продолжительность подвижности спермы лососевых (для форели – меньше 30 с, для атлантического лосося – 1-2 мин) может быть продлена добавлением к активирующему раствору 3-изобутил-1-метилксантина [153] или теофиллина [142].

Как показывает представленный материал, в практике криоконсервации спермы лососеобразных рыб к середине 90-х годов XX в. наметился отход от применения многокомпонентных разбавителей. Благодаря достигнутым высоким результатам по оплодотворению, предпочтение отдавалось упрощенным по составу средам, таким как растворы глюкозы или сахарозы с ДМСО, с добавлением желтка или без него, а также различным вариантам среды Моуниба. В качестве проникающего криопротектора, как правило, использовался ДМСО в концентрациях 9-12%. Исключение составляют лишь данные по сигу и арктическому гольцу, для спермы которых более предпочтительным криопротектором оказался глицерин, а также – первые опыты с ДМАА и АФГП. Добавление желтка к средам обычно способствовало повышению успеха криоконсервации. При разбавлении, соотношение сперма:среда почти всегда составляло 1:3. Сперма замораживалась либо в гранулах, либо в соломинках, охлаждаемых в парах LN_2 или на сухом льду, с последующим хранением в LN_2 . Наиболее результативным был «сухой» способ оплодотворения икры, в котором эффективную активацию спермы обеспечивали водный раствор соды или трис-буферный раствор хлорида натрия и глицина.

СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ В ОБЛАСТИ КРИОКОНСЕРВАЦИИ СПЕРМЫ ЛОСОСЕОБРАЗНЫХ РЫБ

За последние два десятилетия количество публикаций по криоконсервации спермы лососеобразных рыб возросло в несколько раз по сравнению с рассмотренным предыдущим периодом. Характерными чертами современного

этапа исследований, в отличие от работ прошлого века, стали:

- переход от эмпирического подбора параметров протоколов к изучению взаимного влияния различных факторов на разных этапах криоконсервации;
- появление нового, альтернативного диметилсульфоксиду, криопротектора — метанола;
- сравнение различных сред, криопротекторов или режимов замораживания-оттаивания в рамках одного протокола;
- работа по стандартизации протоколов для аквакультуры на основе широкого распространения простой техники замораживания спермы в соломинках;
- исследование особенностей криоконсервации спермы самок-реверсантов;
- появление новой техники замораживания спермы путем витрификации гранул;
- исследование техники замораживания больших объемов спермы и оплодотворения промышленных партий икры;
- появление новых методов оценки качества нативной и размороженной спермы с использованием прецизионной техники;
- изучение криоповреждений клеток спермы и их влияния на результат оплодотворения икры и качество потомства.

Для определения качества нативной спермы перед криоконсервацией, большинством исследователей используется метод компьютерного анализа параметров движения сперматозоидов CASA (computer-assisted semen analysis), обеспечивающий достоверность, воспроизводимость и объективность оценки. Отмечалось, что для замораживания отбирались образцы с подвижностью более 80-85%.

В протоколах криоконсервации на современном этапе ряд ученых традиционно сохраняет приверженность известным многокомпонентным разбавителям, обычно с ДМСО в качестве основного проникающего криопротектора и с разбавлением спермы средой в соотношении 1:3.

Два коллектива испанских исследователей используют среду Эрдэла, Грэма вышеприведенного состава: одни [30-34; 137] с добавлением различных комбинаций желтка, BSA и соевого белка, другие [107; 125-127] – с добавлением липопротеинов низкой плотности (LDL), которые считают более эффективными для защиты клеток, чем желток. Добавка 10% желтка и 7,5 мг/мл соевого белка позволила достигнуть на радужной форели 77,4% оплодотворения икры криоконсервированной спермой [33], а добавка 12% LDL – 66,7% [126] при замораживании спермы, в обоих случаях, в 0,5 мл-соломинках в 2 см над поверхностью LN₂ в течение 10 минут. Польские ученые [16], дополнив среду Эрдэла, Грэма 10% ДМАА (вместо ДМСО) и 10% желтка и замораживая сперму в гранулах на сухом льду с последующим погружением в LN₂, получили на радужной форели 89,6% оплодотворения. Ту же технику и среду Эрдэла, Грэма с 10% ДМСО

и 10% желтка они использовали также для консервации спермы щуки [19].

Французские криобиологи [3; 90; 91; 114; 122] традиционно работают со средой Моуниба с добавлением 10% ДМСО и 10% желтка. От 50 до 90% икры оплодотворяла сперма радужной форели, замораживаемая в 0,5 мл-соломинках в 3 см над поверхностью LN₂ в течение 10 минут.

Чилийские исследователи [59; 62; 56; 58; 110; 111], работая с коммерческой средой Кортланда, дополняли ее сахарозой или глюкозой, BSA и семенной плазмой в различных сочетаниях, с 10% ДМСО или без него. Лучший результат по оплодотворению икры (90,4%) спермой атлантического лосося, замороженной в 0,5 мл-соломинках в 2 см над поверхностью LN₂ в течение 10 минут, был достигнут при сочетании 10% ДМСО, 0,3 М глюкозы и 2% BSA [62]. Его удалось повысить до 96,9% при дополнении данной среды оптимальным сочетанием антиоксидантов (0,1 мМ α-токоферола и 1 мМ аскорбиновой кислоты) и использовании скорости замораживания 0,5 мл-соломинок 62,3°C/мин от +4 до -120°C в программируемом замораживателе [56].

Австрийский криобиолог Ф. Ланштайнер с сотрудниками [92; 93; 95; 96; 98; 99; 100] еще в середине 90-х годов прошлого века разработал криозащитную среду (103 мМ NaCl, 40 мМ KCl, 1 мМ CaCl₂, 0,8 мМ MgSO₄, 20 мМ HEPES, pH 7,8, 1,5% BSA, 7% желтка, 0,5% сахарозы), в которую он вначале включал 5% ДМСО и 1% глицерина [98], а потом, впервые для лососевых, стал применять метанол в концентрации 10% [92; 93; 99; 100]. При различных соотношениях разбавления спермы (от 1:3 до 1:7) для разных видов лососеобразных рыб (радужной форели, кумжи, арктического и американского гольца, сига, дунайского лосося, европейского хариуса, щуки) и использовании обычно 0,5- и 1,2 мл-соломинок, эта среда стабильно обеспечивала оплодотворение 90-100% икры криоконсервированной спермой от нативного контроля. На основании получаемых результатов данный протокол предлагался авторами как универсальный способ криоконсервации спермы лососевых рыб.

Достаточно успешно применялись также и другие подобные многокомпонентные солевые разбавители в сочетании с ДМСО, желтком и/или BSA для криоконсервации спермы кумжи [29; 67], радужной форели [89], щуки [23; 112].

Однако большинство исследователей предпочитает криозащитные среды простого состава, эффективность которых была замечена еще в конце прошлого века. Так, О.В. Желтоножко [4-7], замораживая в 1,5 мл-пробирках сперму тихоокеанских лососей (чавычи, нерки, кеты, микижи) при ее разбавлении 1:3 средой, содержащей в водном растворе 0,2 М сахарозы, 0,05 М NaHCO₃, 1,5 М ДМСО и 12,5% желтка, получал 67-80% оплодотворения икры.

Наиболее часто используемым разбавителем в течение последних 20 лет является 0,3 М во-

дний раствор глюкозы, в котором варьируется содержание 10-15% ДМСО, метанола или ДМАА с дополнением 7-13% желтка или без него. Соотношение разбавления спермы средами на этом простом разбавителе обычно составляет 1:3, реже используется 1:2, 1:4 или 1:5.

Турецкие исследователи [26-28; 52; 53; 151; 152] пришли к выводу о предпочтительности данного разбавителя, сравнивая его с многокомпонентными разбавителями Ланштайнера, Моуниба, Эрдэла, Грэма в опытах на сперме радужной форели и кумжи, при использовании обычно 0,5- и 0,25 мл-соломинок [26; 28; 151; 152]. Попытки повышения эффективности среды, содержащей 10% ДМСО в 0,3 М растворе глюкозы, путем введения в нее таурина [53] или стрептомицина [52] не привели к успеху.

Иранские исследователи, криоконсервируя сперму каспийской кумжи в 0,5 мл-соломинках, при сравнении со сложными средами Ланштайнера и Штайна, также обнаружили более эффективное действие двух простых сред, состоящих из 0,3 М глюкозы, 10% метанола, 10% желтка и 0,6 М сахарозы, 10% ДМСО, 10% желтка, которые обеспечивали соответственно 67 и 60% оплодотворения икры [140; 141]. Впоследствии усовершенствование протокола с использованием среды, содержащей 0,3 М глюкозы и 10% метанола, позволило получить 73,5% оплодотворения [66].

Канадские криобиологи, работая с 0,3 М раствором глюкозы, вначале традиционно вводили в него 10% ДМАА [134], но в дальнейшем, в опытах по замораживанию в 0,5 мл-соломинках спермы арктического гольца, проводя сравнение разных криопротекторов и разбавителей (в том числе разбавителя Ланштайнера), получали лучшие результаты (около 70% оплодотворения) при использовании этого простого разбавителя сначала с 10% ДМСО [136], а затем с 10% и 15% метанола [105; 135]. Однако польские исследователи сообщали о достаточно высокой эффективности действия 10% ДМАА в этом разбавителе при криоконсервации спермы радужной форели, как в 0,5 мл-соломинках с применением программируемого замораживателя [15], так и в гранулах [17].

Сравнивая действие трех протекторов (ДМАА, ДМСО и метанола) в 0,3 М растворе глюкозы при криоконсервации спермы тайваньского лосося в гранулах, исследователи из Тайваня и Японии пришли к выводу о предпочтительности 10% ДМСО, получив 84-88% оплодотворения икры [69]. Замораживание в гранулах спермы симы в этой среде позволяло японским криобиологам достигать 80-87% оплодотворения [123; 124], однако в опытах на сперме сахалинского тайменя более эффективным было сочетание 0,3 М глюкозы и 10% метанола [87; 88].

Польские ученые в опытах на сперме радужной форели и щуки довольно успешно использовали растворы 0,3 М глюкозы или 0,6 М сахарозы с 10-15% ДМСО [20; 37; 65], иногда с добавлением 10% желтка [21; 64]. Заморажи-

вание спермы форели, разбавленной в соотношении 1:3 средой, состоящей из 0,6 М сахарозы и 10% ДМСО, с применением техники гранулирования, обеспечило получение 90,1% оплодотворения икры [37], хотя этот успех отчасти может объясняться высоким качеством нативной спермы, отмечаемым авторами. Впоследствии, другими коллективами польских исследователей при криоконсервации спермы сига [42; 118] отдавалось предпочтение 0,3 М раствору глюкозы с 10-15% метанола, а при криоконсервации спермы атлантического лосося [51] и кумжи [50] – 0,3 М раствору глюкозы с 10% метанола и 10% желтка, при использовании одинаковой техники замораживания в 0,25 мл-соломинках.

Сообщалось также и о других, более или менее удачных, попытках применения упомянутых простых разбавителей с ДМСО для криоконсервации спермы радужной форели [43; 44; 115; 158], арizonской форели [45], кумжи [76].

Польскими криобиологами [63] еще в конце прошлого века, при замораживании в гранулах спермы дунайского лосося, было обнаружено повышение криозащитного действия среды, состоящей из 0,3 М глюкозы, 10% ДМСО и 10% желтка, при включении в нее 25 мМ хлорида калия (результат – 87,5% оплодотворения икры). Ученые из США, сравнивая среды на основе 0,3 М глюкозы и 1,7 г/л KCl, при замораживании в 0,5 мл-соломинках спермы атлантического лосося, лучшие результаты (72,9 и 83,5% оплодотворения) получили при дополнении ее соответственно 10% метанола или 10% метанола и 13,3% желтка. ДМСО в концентрации 5% сам по себе и в сочетании с 13,3% желтка оказался менее эффективен [77]. Сравнение подобных сред китайскими учеными в опытах по замораживанию в 0,5 мл-соломинках спермы щуки привело к аналогичному выводу. Использование среды, состоящей из 0,3 М глюкозы, 1,7 г/л KCl, 10% метанола и 10% желтка, обеспечило оплодотворение 91,4% икры. Замена глюкозы на 0,6 М сахарозы в этой среде немного снижала ее эффективность (81,3% оплодотворения), а ДМСО, в сочетании с обоими сахарами, давал лишь около 35% оплодотворения [159].

К простым средам можно отнести и разработанный венгерскими учеными [72-75] разбавитель, содержащий 0,2 М глюкозы, 0,04 М KCl, 0,03 М трис (pH 8), в котором, по сообщению авторов, метанол в концентрации 10% работает лучше, чем ДМСО. После криоконсервации в этой среде спермы хариуса и мраморной форели в 0,5 мл-соломинках удавалось достигнуть сохранения оплодотворяющей способности соответственно у 91,3% [73] и 84% [74] клеток. Испытания сред подобного состава (0,3 М трегалозы, 0,04 М KCl, 0,02 М трис, 20% метанола, pH 8,5 и 0,185 М трегалозы, 0,04 М KCl, 0,02 М трис, 10% метанола, pH 8,5), проведенные польскими исследователями, при замораживании соответственно спермы сига и щуки в 0,25 мл-соломинках, также позволило получить процент оплодотворения икры оттаявшей

спермой, близкий к нативному контролю [36; 139]. Однако в опытах на сперме радужной форели наиболее сильное криозащитное действие было обнаружено у водных растворов, содержащих 0,175 М трегалозы, 10% метанола (186 мОсм, рН 6,39) и 0,175 М трегалозы, 0,04 М KCl, 10% метанола (275 мОсм, рН 6,22), по сравнению с трис-буферными растворами. Среда с хлоридом калия обеспечивала самую высокую выживаемость клеток и сохранение их подвижности (75-85%) в оттаявшей сперме в течение 60 минут [78].

Как показывают представленные материалы, мнения авторов о наиболее эффективном проникающем криопротекторе в простых средах расходятся. Сравнивая действие разных протекторов в рамках своих протоколов, одни исследователи приходили к выявлению большей полезности ДМСО, другие – метанола. ДМАА обычно признавался менее эффективным.

В последнее десятилетие внимание исследователей все больше привлекают глюкозо-метанольные среды. Для оптимизации количественного состава такой среды и разработки эффективного протокола криоконсервации спермы лососеобразных рыб коллективом польских криобиологов под руководством А. Ciereszko был проведен большой объем исследований, представленный в многочисленных публикациях [38-41; 48; 49; 79-86; 116; 117; 119-121]. Прорывным результатом поисков можно считать стабильное сохранение высокой (на уровне нативного контроля) оплодотворяющей способности спермы, криоконсервированной в среде, состоящей из 0,18 М глюкозы и 9% метанола, при высоких степенях разбавления: 1:5 для радужной форели [38], кумжи [116], американского гольца [117], европейских тайменя и хариуса [119], сига и щуки [49] и 1:9 – для радужной форели-реверсанта [40; 48]. Эти достижения, по-видимому, обусловлены сочетанием оптимальных состава среды и степени разбавления с особой техникой замораживания 0,25 мл-соломинок: на рамке толщиной 3 см вначале в течение 15 минут на льду, затем в течение 5 минут – на поверхности LN₂ с последующим погружением. Разработанную среду авторы считают универсальной криозащитной средой для спермы лососеобразных, уточняя конечные концентрации ее компонентов в получаемой суспензии сперма-среда при разных степенях разбавления (при 1:5 – 0,15 М глюкозы и 7,5% метанола, при 1:9 соответственно – 0,162 М и 8,1%). В последующих исследованиях этим коллективом ученых было обнаружено, что криоконсервированная данным способом сперма атлантического лосося, кумжи, американского гольца, арктического гольца, сига, радужной форели и радужной форели-реверсанта способна после оттаивания сохранять подвижность в течение 30-120 минут при температуре 4°C [79; 79a; 83; 121]. Сообщалось также, что вместо глюкозы в данной среде может использоваться сахароза или трегалоза [121], а добавление KCl в среду приводило обыч-

но к снижению подвижности размороженной спермы [83]. В дальнейших исследованиях, проводимых с целью стандартизации протокола, авторы варьировали параметры процесса и изучали их влияние на результат криоконсервации. Была показана возможность использования в том же протоколе 0,5 мл-соломинок [80-82; 84-86; 120], определен оптимальный режим их оттаивания на водяной бане (40°C, 10 с) [80; 82; 84-86; 120], определены оптимальные концентрации спермы в соломинках, обеспечивающие высокую подвижность после оттаивания (1.10⁹ сперматозоидов/мл для радужной форели [120; 81; 84], 1,5.10⁹ – для арктического гольца [79a], 2.10⁹ – для американского гольца, 3.10⁹ – для кумжи, 4.10⁹ – для атлантического лосося [82], 1.10⁹-4.10⁹ – для реверсантов форели и гольца [80]).

Данным научным коллективом выполнены многочисленные исследования по проблеме криоконсервации спермы, полученной от самок-реверсантов [40; 48; 79; 80; 83; 85; 85a; 121], интерес к которой в настоящее время связан с распространением монокультур самок в рыбководстве. По сравнению со спермой нормальных самцов, сперма реверсантов, собираемая из семенников из-за неразвитости спермовыводящего протока, характеризуется высокой концентрацией сперматозоидов и высокой концентрацией протеинов в семенной плазме. Она обычно бывает низкого качества, с низким потенциалом подвижности и высоко вариабельна среди особей по стадии созревания [39; 48]. Считается, что качество может быть улучшено при инкубации ее в имитирующих семенную плазму растворах с высоким значением рН, что использовалось ранее другими исследователями [86a; 137]. Польские криобиологи получали повышение подвижности свежей спермы реверсантов радужной форели до 75%, при инкубации ее в течение 15 минут, в приведенной выше глюкозо-метанольной среде с рН 6,9 или в течение 120 минут в искусственной семенной плазме, содержащей 130 mM NaCl, 40 mM KCl, 3,3 mM CaCl₂•2H₂O, 1,5 mM MgCl₂•6H₂O, 2,5 mM NaHCO₃, с рН 9,9 [39]. Инкубация размороженной спермы, разбавленной теми же растворами в соотношении 1:10, приводила сначала к ингибированию, а затем к постепенному повышению ее подвижности, однако хранение в этих средах в течение 120 минут не влияло на оплодотворяющую способность [79]. Рассмотренный выше протокол оказался весьма эффективным для замораживания спермы реверсантов радужной форели [40; 48; 79; 80; 83; 85; 121] и американского гольца [80], позволяя получать близкие к нативному контролю степени оплодотворения икры криоконсервированной спермой. Отмечалось, что самую высокую подвижность размороженной спермы, как реверсантов, так и нормальных самцов радужной форели, обеспечивала оптимальная концентрация глюкозы (0,15 М) в разбавленной средой сперме, которая минимизировала окислительный стресс [85;

85a]. С меньшим успехом удавалось замораживание спермы радужной форели-реверсанта в средах сложного или простого состава с ДМСО и желтком в других технологиях [59; 115; 127; 137].

Большинство рассмотренных протоколов объединяет применение для замораживания разбавленной спермы пластиковых соломинок объемом 0,25 или 0,5 мл. Сообщается также об удачных попытках использования соломинок большего объема: 1,2 мл [99], 1,7 мл [136], 1,8 мл [33], 2,5 мл [44] и 5 мл [23; 33; 34; 90; 112; 122]. В большинстве технологий замораживание соломинок осуществляется при их горизонтальном расположении на полистироловой рамке, плавающей на поверхности LN₂ в полистироловом ящике (на высоте 1-6 см над этой поверхностью в течение 3-10 минут), с последующим погружением в LN₂.

Уникальная технология замораживания большого объема спермы радужной форели в 1,2 мл-соломинках, для дальнейшего осеменения им промышленных партий икры, была разработана Ф. Ланштайнером и сотрудниками [96]. Соломинки в количестве 16 шт., прикрепленные к гибкой пластиковой ленте, замораживались горизонтально в 1 см над поверхностью LN₂ в течение 10 минут, после чего, свернутая в рулон, лента с соломинками упаковывалась в цилиндрический стакан для хранения в LN₂. Оттаивание происходило в развернутом виде, а затем снова в свернутом проводилось одновременное обрезание концов всех соломинок и выливание всего объема размороженной спермы на 500 г икры. Полученная степень оплодотворения была такой же, как с нативным контролем (87,5%).

Некоторые авторы приводят описания других режимов в программируемых замораживателях [15; 30; 31; 44; 56; 115; 138], в том числе при использовании 10 мл-криопробирок [23; 112]. На рубеже веков использовалась классическая техника гранулирования разбавленной спермы на сухом льду с последующим погружением в LN₂ [16; 17; 19-21; 37; 63; 65; 69; 87; 88; 90; 123; 124; 157].

В последнее десятилетие чилийскими криобиологами [58; 59; 110; 111] для спермы лососевых разрабатывалась технология витрификации (стеклования) гранул, в которой суспензия спермы в среде накапливается по 20-30 мкл прямо в LN₂, с последующим хранением полученных сферических гранул в криопробирках в LN₂. Интерес к этой технологии связан с исключительным образованием внутри и вне клетки кристаллов льда, как основного повреждающего фактора, из-за сверхвысокой скорости замораживания. Лучшие результаты оплодотворения икры криоконсервированной таким образом спермой радужной форели-реверсанта и атлантического лосося пока не очень высоки (31% и 46%, соответственно), что может быть связано не только со способом замораживания, но и с составом криозащитной среды на основе трис-буферного

разбавителя Кортланда с добавлением 0,13 М сахарозы, 10% ДМСО, 2% BSA, и 50% семенной плазмы. Хотя именно этот количественный состав обеспечивал, по сообщению авторов, лучшие характеристики размороженной спермы: целостность плазматической мембраны – 98,4-98,6%, целостность митохондриальной мембраны – 36,2-47,2%, фрагментация ДНК – 9,2-11,1%.

Приводимые в рассматриваемых публикациях режимы оттаивания соломинок на водяной бане различны (в среднем при температуре 25-40°C за 10-30 с). Гранулы размораживались при тех же температурах в пробирках с раствором NaHCO₃ или со средой, в которой они были заморожены.

Эффективность протоколов криоконсервации в большинстве случаев оценивалась по результатам оплодотворения икры размороженной спермой. В общепринятом «сухом» способе осеменения икры, для активации подвижности сперматозоидов, иногда использовались растворы, содержащие 120 мМ NaHCO₃ [4; 29; 51; 67; 69; 88; 115; 123]; 51,3 мМ или 120 мМ NaCl [19; 28; 42; 53; 151; 152]; 60 мМ NaHCO₃, 50 мМ трис, pH 9 [89; 93; 95; 96; 106; 135] или то же с добавлением 20 мМ глицина и 5 мМ теофиллина [99; 100; 138]. Однако большинством исследователей применялся, разработанный Р. Бийаром [24], буферный раствор D 532, состав которого интерпретировался по-разному. В публикациях приводились четыре состава этого раствора:

1) 20 мМ трис, 30 мМ глицина, 125 мМ NaCl, pH 9 [38; 40; 66; 78; 117; 119; 140; 141];

2) 20 мМ трис, 30 мМ глицина, 125 мМ NaCl, 1 мМ CaCl₂, pH 9 [50; 81] (этот состав дополнялся также 0,2 или 0,5% BSA [39; 41; 116; 120; 121; 139];

3) 20 мМ трис, 30 мМ глицина, 154 мМ NaCl, 1 мМ CaCl₂, pH 9 [20; 21; 49];

4) 20 мМ трис, 50 мМ глицина, 95 мМ NaCl, pH 8,8 [44; 75; 125].

ВЫВОДЫ

Как показывает представленный обзор публикаций двух последних десятилетий, технологии криоконсервации спермы лососеобразных рыб получили широкое распространение во всем мире. В них, наряду с использованием известных ранее и новых многокомпонентных разбавителей, явное предпочтение отдавалось простым по составу криозащитным средам, таким как раствор глюкозы с добавлением, в качестве проникающего протектора, традиционно ДМСО или нового, перспективного метанола. Как стабилизаторы мембран клеток спермы не потеряли своей актуальности ни липопротеины желтка, ни белки, такие как комплекс белков сои, белки семенной плазмы или BSA. Представляется полезным добавление в среду хлорида калия для предотвращения преждевременной активации спермы при смешивании. В разбавлении спермы средой наметился переход от наиболее распространенного значения 1:3 к более высоким степеням разбавления. Повсеместно

применяется более простая и удобная, по сравнению с использованием программируемых замораживателей, техника замораживания разбавленной спермы в соломинках объемом 0,25 мл и 0,5 мл в парах LN₂ в 1-6 см над его поверхностью в течение 3-10 минут с последующим погружением. В общепринятом «сухом» способе оплодотворения икры получило широкое распространение использование трис-буферного активатора подвижности спермы D 532.

Работа по стандартизации протоколов криоконсервации спермы лососеобразных рыб для аквакультуры, на основе широкого распространения простой техники замораживания в соломинках, имеет пока локальный характер [84; 86]. Многообразии протоколов, огромное количество разрозненных фактических данных и близкие результаты оплодотворения икры размороженной спермой, достигаемые в различных протоколах, с разными средами и криопротекторами, исключают возможность реализации единого стандартного протокола. Исследовательские коллективы, в рамках своих протоколов, проводят работу по оптимизации и стандартизации всех параметров и этапов процесса. Главной проблемой в этой деятельности по-прежнему остается обеспечение воспроизводимости результатов криоконсервации, которые, в первую очередь, определяются качеством нативной спермы.

Улучшение качества нативной спермы достигается дополнением кормовых рационов производителей такими веществами, как аминокислоты (таурин и гипотаурин), витамины (E и C), липиды (улучшение качества криоконсервированной спермы – введением тех же веществ в криозащитные среды), или селекцией стрессоустойчивых и хорошо адаптирующихся к условиям содержания особей [35]. Для оценки качества, как нативной, так и криоконсервированной спермы, чаще всего используется анализ ее подвижности, который в большинстве современных исследований проводится с помощью метода CASA, позволяющего определять различные параметры подвижности: процент подвижных клеток MOT (percentage of motile sperm), скорость прямолинейного движения VSL (straight line velocity), скорость криволинейного движения VCL (curvilinear velocity), средняя скорость VAP (average path velocity), степень прямолинейности движения LIN (linearity) и другие. Качество размороженной спермы, кроме того, оценивается по таким показателям, как выживаемость (процент клеток с функциональной плазматической мембраной), содержание АТФ и целостность ДНК, что связано с возможностью повреждений соответственно плазматической мембраны, мембран митохондрий и хроматина сперматозоидов, вызываемых образованием внутри- и внеклеточных кристаллов льда, осмотическим и окислительным стрессом. Всесторонний анализ сведений по качеству гамет, методам оценки качества размороженной спермы и криоповреждений, с помощью современного инструментария, дан в обзорных публикациях [13; 14; 25; 35; 60; 61; 154; 156].

ЛИТЕРАТУРА И ИСТОЧНИКИ

1. Ананьев В.И. Опыт криоконсервации спермы белорыбицы и белуги / В.И. Ананьев, А.А. Андреев, Т.С. Голованова // Проблемы сохранения геномов лососевых и осетровых рыб. Рыбное хозяйство. Аналитическая информация, сер. Аквакультура. – М.: Экинас, 1998. – Вып. 1. – С. 25-36.
1. Ananyev V.I. Experience of cryopreservation of sperm of white fish and beluga / V.I. Ananyev, A.A. Andreev, T.S. Golovanova // Problems of genom preservation of salmonidae and sturgeons. Fisheries. Analytical information, ser. Aquaculture. – М.: Ekinas, 1998. – Issue 1. – P. 25-36.
2. Ананьев В.И. Проблемы сохранения геномов лососевых и осетровых рыб / В.И. Ананьев, Л.И. Цветкова, М.С. Манохина // Проблемы сохранения геномов лососевых и осетровых рыб. Рыбное хозяйство. Аналитическая информация, сер. Аквакультура. – М.: Экинас, 1998. – Вып. 1. – С. 2-24.
2. Ananyev V.I. Problems of genom preservation of salmonidae and sturgeons / V.I. Ananyev, L.I. Tsvetkova, M.S. Manokhina // Problems of genom preservation of salmonidae and sturgeons. Fisheries. Analytical information, ser. Aquaculture. – М.: Ekinas, 1998. – Issue 1. – P. 2-24.
3. Андреев А.А. Влияние липидов на физиологическую активность спермиев радужной форели при криоконсервации / А.А. Андреев, Л. Лаббе, Ж.-Л. Роже // Биол. мембраны. – 2006. – Т. 23. – № 1. – С. 53-56.
3. Andreev A.A. Influence of lipids on the physiological activity of rainbow trout spermatozoa during cryopreservation / A.A. Andreev, L. Labbe, J.-L. Roget // Biol. membranes. – 2006. – Vol. 23. – No. 1. – P. 53-56.
4. Желтоножко О.В. Криоконсервация спермы проходной и пресноводной форм микижи (*Salmo mykiss*) / О.В. Желтоножко, В.В. Желтоножко // Проблемы сохранения геномов рыб. Рыбное хозяйство. Аналитическая информация, сер. Аквакультура. – М.: Экинас, 1999. – Вып. 1. – С. 34-39.
4. Zheltonozhko O.V. Cryopreservation of sperm of entrance and freshwater rainbow trout forms (*Salmo mykiss*) / O.V. Zheltonozhko, V.V. Zheltonozhko // Problems of conservation of fish genomes. Fisheries. Analytical information, ser. Aquaculture. – М.: Ekinas, 1999. – Issue 1. – P. 34-39.
5. Желтоножко О.В. Криоконсервация спермы реофильной нерки / О.В. Желтоножко, В.В. Желтоножко // Проблемы сохранения геномов лососевых и осетровых рыб. Рыбное хозяйство. Аналитическая информация, сер. Аквакультура. – М.: Экинас, 1998. – Вып. 1. – С. 37-40.
5. Zheltonozhko O.V. Cryopreservation of sperm rheophilic sockeye / O.V. Zheltonozhko, V.V. Zheltonozhko // Problems of genom preservation of salmonidae and sturgeons. Fisheries. Analytical information, ser. Aquaculture. – М.: Ekinas, 1998. – Issue 1. – P. 37-40.
6. Желтоножко О.В. Опыт криоконсервации спермы реофильной нерки и оплодотворение икры размороженной спермой / О.В. Желтоножко, В.В. Желтоножко // Тезисы докладов Первого конгресса ихтиологов России. – Астрахань, 1997. – С. 354.
6. Zheltonozhko O.V. Experience of cryopreservation of sperm of rheophilic sockeye and fertilization of egg with thawed sperm / O.V. Zheltonozhko, V.V. Zheltonozhko // Abstracts of the reports of the First Congress of Ichthyologists of Russia. - Astrakhan, 1997. – P. 354.
7. Желтоножко О.В. Криоконсервация спермы тихоокеанских лососей Камчатки: чавычи (*Oncorhynchus tshawytscha*) и кеты (*Oncorhynchus keta*) / О.В. Желтоножко, В.В. Желтоножко, В.В. Черепанов // Проблемы криобиологии. – 1996. – № 3. – С. 30-34.
7. Zheltonozhko O.V. Sperm cryopreservation of Pacific salmon of Kamchatka: Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and chum salmon (*Oncorhynchus keta*) / O.V. Zheltonozhko, V.V. Zheltonozhko, V.V. Cherepanov // Problems of Cryobiology. – 1996. – No. 3. – P. 30-34.
8. Карамулдаева А.К. Применение глицерина для криоконсервации спермы белорыбицы / А.К. Карамулдаева, А.М. Тихомиров // Вестник АГТУ. Сер.: Рыбное хозяйство. – 2017. – № 2. – С. 117-121.
8. Karamuldaeva A.K. Application of glycerin for cryopreservation of white fish sperm / A.K. Karamuldaeva, A.M. Tikhomirov // Vestnik AGTU. Ser.: Rybnoe khozyaistvo. - 2017. – No. 2. – P. 117-121.

9. Каранова М.В. Криопротективные свойства антифризных гликопротеинов при замораживании спермы рыб / М.В. Каранова, Л.И. Цветкова // Известия АН (сер. биол.). – 1994. – № 5. – С. 818-827.
9. Karanova M.V. Cryoprotective properties of antifreeze glycoproteins in fish sperm freezing / M.V. Karanova, L.I. Tsvetkova // Izvestiya AN (ser. biol.). – 1994. – No. 5. – P. 818-827.
10. Суханова Л.В. Криоконсервация спермы байкальского омуля / Л.В. Суханова, О.Ю. Глызина, В.В. Смирнов // Биология, биотехника разведения и состояние запасов сиговых рыб. Матлы Восьмого межд. науч.-произв. совещания. – 2013. – С. 209-214.
10. Sukhanova L.V. Cryopreservation of sperm of the Baikal omul / L.V. Sukhanova, O.Yu. Glyzina, V.V. Smirnov // Biology, biotechnics of breeding and the state of stocks of whitefishes. Materials of the Eighth international scientific-proc. meeting. - 2013. – P. 209-214.
11. Тихомиров А.М. Разработка криозащитных сред для низкотемпературного консервирования сперматозоидов белорыбницы (*Stenodus leucichthys* Guldenstadti, 1772) в целях сохранения генофонда / А.М. Тихомиров, М.М. Богатырева, А.А. Красильникова // Вестник АГТУ. Сер.: Рыбное хозяйство. – 2011. – № 1. – С. 58-62.
11. Tikhomirov A.M. Development of cryoprotective media for low-temperature preservation of white fish spermatozoa (*Stenodus leucichthys* Guldenstadti, 1772) in order to preserve the gene pool / A.M. Tikhomirov, M.M. Bogatyreva, A.A. Krasilnikova // Vestnik AGTU. Ser.: Rybnoe khozyaistvo. – 2011. – No. 1. – P. 58-62.
12. Цветкова Л.И. Влияние антифризных гликопротеинов на качество криоконсервированной спермы рыб / Л.И. Цветкова, М.В. Каранова // Цитология. – 1994. – Т. 36. – № 11. – С. 1157-1163.
12. Tsvetkova L.I. Influence of antifreeze glycoproteins on the quality of cryopreserved fish sperm / L.I. Tsvetkova, M.V. Karanova // Cytology. – 1994. – Vol. 36. – No. 11. – P. 1157-1163.
13. Alavi S.M.H., Cosson J. Sperm motility in fishes. I. Effects of temperature and pH: a review // Cell Biology International – 2005. – V. 29. – P.101-110.
14. Alavi S.M.H., Cosson J. Sperm motility in fishes. II. Effects of ions and osmolality: A review // Cell Biology International – 2006. – V. 30. – P.1-14.
15. Babiak I., Fraser L., Dobosz S. et al. Computer-controlled freezing of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) spermatozoa for routine programmes // Aquacult. Res. – 1999. – V. 30. – P. 707-710.
16. Babiak I., Glogowski J., Dobosz S. et al. Semen from rainbow trout produced using cryopreserved spermatozoa is more suitable for cryopreservation // J.Fish Biol. – 2002. – V. 60. – P. 561-570.
17. Babiak I., Glogowski J., Goryczko K. et al. Effect of extender composition and equilibration time on fertilization ability and enzymatic activity of rainbow trout cryopreserved spermatozoa // Theriogenology. – 2001. – V. 56. – P. 177-192.
18. Babiak I., Glogowski J., Luczynski M.J. et al. Cryopreservation of the milt of the northern pike // J. Fish Biol. – 1995. – V. 46. – No 5. – P. 819-828.
19. Babiak I., Glogowski J., Luczynski M.J. et al. Effect of individual male variability on cryopreservation of northern pike, *Esox Lucius* L., sperm // Aquacult. Res. – 1997. – V. 28. – P. 191-197.
20. Babiak I., Glogowski J., Luczynski M.J. et al. The effect of egg yolk, low density lipoproteins, methylxanthines and fertilization diluent on cryopreservation efficiency of northern pike (*Esox lucius*) spermatozoa // Theriogenology. – 1999. – V. 52. – P. 473-479.
21. Babiak I., Glogowski J., Luczynski M.J. et al. The effect of individual male potency on fertilization ability of fresh and cryopreserved milt of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) // Aquacult. Res. – 1998. – V. 29. – P. 337-340.
22. Baynes S.M., Scott A.P. Cryopreservation of rainbow trout spermatozoa: the influence of sperm quality, egg quality and extender composition on post-thaw fertility // Aquaculture. – 1987. – V. 66. – No 1. – P. 53-57.
23. Bernath G., Molnar J., Varkonyi L. et al. The growth and survival rate in hatchery reared northern pike (*Esox Lucius*) larvae obtained from 3 different large-scale sperm cryopreservation methods // 7th Int. Workshop on the Biology of Fish Gametes. 2-6 Sept. 2019, Rennes, France. Abstract Book. — P. 130.
24. Billard R. Reproduction in rainbow trout: sex differentiation, dynamics of gametogenesis, biology and preservation of gametes // Aquaculture. – 1992. – V. 100. – P. 263-298.
25. Bobe J., Labbe C. Egg and sperm quality in fish // General and Comparative Endocrinology. – 2010. – V. 165. – P. 535-548.
26. Bozkurt Y., Akcay E., Tekin N. et al. Effect of freezing techniques, extenders and cryoprotectants on the fertilization rate of frozen rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) sperm // The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgheh. – 2005. – V. 57. – No 2. – P. 125-130.
27. Bozkurt Y., Secer S., Tekin N. et al. Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and mirror carp (*Cyprinus carpio*) sperm with glucose based extender // Suleyman Demirel Universitesi. – 2005. – No 1. – P. 21-25.
28. Bozkurt Y., Yavas I. Preliminary study on hybridization of brown trout (*Salmo trutta macrostigma*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using cryopreserved sperm // The Israeli Journal of Aquaculture. Bamidgheh. – 2014. – V. 66. – P. 958.
29. Bozkurt Y., Yavas I., Karaca F. Cryopreservation of brown trout (*Salmo trutta macrostigma*) and ornamental koi carp (*Cyprinus carpio*) sperm // Current Frontiers in Cryopreservation. Ed. I.I.Katkov. In Tech, 2012. – P. 293-304.
30. Cabrita E., Alvarez R., Anel L. et al. Sublethal damage during cryopreservation of rainbow trout sperm // Cryobiology. – 1998. – V. 37. – P. 245-253.
31. Cabrita E., Anel L., Herraes M.P. Effect of external cryoprotectants as membrane stabilizers on cryopreserved rainbow trout sperm // Theriogenology. – 2001. – V. 56. – P. 623-635.
32. Cabrita E., Martinez F., Real M. et al. The use of flow cytometry to assess membrane stability in fresh and cryopreserved trout spermatozoa // CryoLetters. – 2001. – V. 22. – P. 263-272.
33. Cabrita E., Robles V., Alvarez R. et al. Cryopreservation of rainbow trout sperm in large volume straws: application to large scale fertilization // Aquaculture. – 2001. – V. 201. – P. 301-314.
34. Cabrita E., Robles V., Rebordinos L. et al. Evaluation of DNA damage in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) cryopreserved sperm // Cryobiology. – 2005. – V. 50. – P. 144-153.
35. Cabrita E., Sarasquete C., Martinez-Paramo S. et al. Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives // J. Appl. Ichthyol. – 2010. – V. 26. – P. 623-635.
36. Cejko B.I., Sarosiek B., Dryl K. et al. The effect of cryopreservation extender on sperm motility and hatch success in northern pike (*Esox lucius*) // Aquaculture. – 2020. – V. 514. – P. 734482.
37. Ciereszko A., Dabrowski K. Effect of a sucrose-DMSO extender supplemented with pentoxifylline or blood plasma on fertilizing ability of cryopreserved rainbow trout spermatozoa // Progr. Fish-Culturist. – 1996. – V. 58. – P. 143-145.
38. Ciereszko A., Dietrich G.J., Nynca J. et al. Cryopreservation of rainbow trout semen using a glucose-methanol extender // Aquaculture. – 2014. – V. 420-421. – P. 275-281.
39. Ciereszko A., Dietrich G.J., Nynca J. et al. Maturation of spermatozoa from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) sex-reversed females using artificial seminal plasma or glucose-methanol extender // Theriogenology. – 2015. – V. 83. – P. 1213-1218.
40. Ciereszko A., Dietrich G.J., Nynca J. et al. Semen from sex-reversed rainbow trout of spring strain can be successfully cryopreserved and used for fertilization of elevated number of eggs // Aquaculture. – 2015. – V. 448. – P. 564-568.
41. Ciereszko A., Dietrich G.J., Nynca J. et al. The use of concentrated extenders to improve the efficacy of cryopreservation in whitefish spermatozoa // Aquaculture. – 2013. – V. 408-409. – P. 30-33.
42. Ciereszko A., Dietrich G.J., Wojtczak M. et al. Characterization and cryopreservation of whitefish (*Coregonus lavaretus* L.) semen from Lake Lebsko, Poland // Fundamental and Applied Limnology. – 2008. – V. 173. – No 1. – P. 59-65.
43. Cloud J.G. Cryopreservation of sperm of steelhead rainbow trout after refrigerated storage // Cryopreservation in Aquatic Species. World Aquaculture Society. Baton Rouge, Louisiana, 2000. – V. 7. – P. 101-103.
44. Conget P., Fernandez M., Herrera G. et al. Cryopreservation

- of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa using programmable freezing // Aquaculture. – 1996. – V. 143. – P. 319-329.
45. David R.E., Wirtanen L.J., Ternes M.A. Cryopreservation of sperm of the endangered Apache trout // Cryopreservation in Aquatic Species. World Aquaculture Society. Baton Rouge, Louisiana. – 2000. – V. 7. – P. 104-107.
46. De Montalembert G., Bry C., Billard R. Control of reproduction in northern pike // Am. Fish Soc. Spec. Publ. – 1978. – V. 11. – P. 217-225.
47. Diaz R., Lee-Estevez M., Quinoms J. et al. Changes in Atlantic salmon (*Salmo salar*) sperm morphology and membrane lipid composition related to cold storage and cryopreservation // Animal Reproduction Science. – 2019. – V. 204. – P. 50-59.
48. Dietrich G.J., Nynca J., Dobosz S. et al. Application of glucose-methanol extender to cryopreservation of semen of sex-reversed females rainbow trout results in high post-thaw sperm motility and fertilizing ability // Aquaculture. – 2014. – V. 434. – P. 27-32.
49. Dietrich G.J., Nynca J., Szczepkowski M. et al. The effect of cryopreservation of semen from whitefish (*Coregonus lavaretus*) and northern pike (*Esox lucius*) using a glucose-methanol extender on sperm motility parameters and fertilizing ability // Aquaculture. – 2016. – V. 464. – P. 60-64.
50. Dziewulska K., Domagala J. Spermatozoa concentration influences cryopreservation success in sea trout (*Salmo trutta m. trutta* L.) // Theriogenology. – 2013. – V. 80. – P. 659-664.
51. Dziewulska K., Rzemieniecki A., Czerniawski R. et al. Post-thawed motility and fertility from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) sperm frozen with four cryodiluents in straws or pellets // Theriogenology. – 2011. – V. 76. – P. 300-311.
52. Ekici A., Baran A., Ozdas O.B. et al. The effect of streptomycin on freezing rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) sperm // The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh. – 2014. – V. 66. – P. 961.
53. Ekici A., Baran A., Yamaner G. et al. Effects of different doses of taurine in the glucose-based extender during cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) semen // Biotechnol. & Biotechnol. – 2012. – V. 26. – No 4. – P. 3113-3115.
54. Erdahl A.W., Erdahl D.A., Graham E.F. Some factors affecting the preservation of salmonid spermatozoa // Aquaculture. – 1984. – V. 43. – P. 341-350.
55. Erdahl D.A., Graham E.F. Preservation of gametes of freshwater fish // 9th International Congress on Animal Reproduction (Madrid, Spain, June 16-20 1980). Madrid, 1980. – V. II. – P. 317-326.
56. Figueroa E., Farias J.G., Lee-Estevez M. et al. Sperm cryopreservation with supplementation of α -tocopherol and ascorbic acid in freezing media increase sperm function and fertility rate in Atlantic salmon (*Salmo salar*) // Aquaculture. – 2018. – V. 493. – P. 1-8.
57. Figueroa E., Lee-Estevez M., Valdebenito I. et al. Effects of cryopreservation on mitochondrial function and sperm quality in fish // Aquaculture. – 2019. – V. 511. – P. 634190.
58. Figueroa E., Merino O., Risopatron J. et al. Effect of seminal plasma on Atlantic salmon (*Salmo salar*) sperm vitrification // Theriogenology. – 2015. – V. 83. – No 2. – P. 238-245.
59. Figueroa E., Risopatron J., Sanchez R. et al. Spermatozoa vitrification of sex-reversed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effect of seminal plasma on physiological parameters // Aquaculture. – 2013. – V. 372-375. – P. 119-126.
60. Figueroa E., Valdebenito I., Farias J.G. Technologies used in the study of sperm function in cryopreserved fish spermatozoa // Aquaculture Research. – 2016. – V. 47. – P. 1691-1705.
61. Figueroa E., Valdebenito I., Lee-Estevez M. et al. Potential biomarkers of DNA quality in cryopreserved fish sperm: impact on gene expression and embryonic development // Reviews in Aquaculture – 2020. – V. 12 – No. 1. – P. 382-391.
62. Figueroa E., Valdebenito I., Merino O. et al. Cryopreservation of Atlantic salmon *Salmo salar* sperm: effects on sperm physiology // J. Fish Biol. – 2016. – V. 89. – No. 3. – P. 1537-1550.
63. Glogowski J., Babiak I., Goryczko K. et al. Properties and cryopreservation of Danube salmon (*Hucho hucho*) milt. // Archives of Polish Fisheries. – 1997. – V. 5. – No. 2. – P. 235-239.
64. Glogowski J., Babiak I., Luczynski M.J. et al. Factors affecting cryopreservation efficiency and enzyme activity in northern pike, *Esox lucius*, sperm // J. Appl. Aquacult. – 1997. – V. 7. – No. 4. – P. 53–67.
65. Glogowski J., Kwasnik M., Piro B. et al. Characterization of rainbow trout milt collected with a catheter: semen parameters and cryopreservation success // Aquacult. Res. – 2000. – V. 31. – No. 3. – P. 289-296.
66. Golshahi K., Shabani N., Aramli M.S. et al. Motility and fertilizing ability of cryopreserved Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*) sperm: Effect of post-thaw storage time and different sperm-to-egg ratios // Cryobiology. – 2015. – V. 71. – No. 2. – P. 360-363.
67. Gopalakrishnan A., Thakur K.L., Ponniah A.G. et al. Cryopreservation of brown trout (*Salmo trutta fario*) sperm: The influence of extender composition and fertilization procedure // Fishery Technology. – 1999. – V. 36. – No. 2. – P. 104-109.
68. Gwo J.-C., Kurokura H., Hirano R. Cryopreservation of spermatozoa from rainbow trout, common carp, and marine puffer // Nippon Suisan Gakkaishi. – 1993. – V. 59. – No. 5. – P. 777-782.
69. Gwo J.-C., Ohta H., Okuzawa K. et al. Cryopreservation of sperm from the endangered Formosan landlocked salmon (*Oncorhynchus masou formosanus*) // Theriogenology. – 1999. – V. 51. – P. 569-582.
70. Holtz W. Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) sperm: practical recommendations // Aquaculture. – 1993. – V. 110. – P. 97-100.
71. Holtz W., Schmidt-Baulain R., Meiners-Gefken M. A simple saccharide extender for cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // 4th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish (Norwich, July 1991). – P. 250-252.
72. Horvath A., Bokor Z., Bernath G. et al. Very low sperm-egg ratios result in successful fertilization using cryopreserved sperm in the Adriatic grayling (*Thymallus thymallus*) // Aquaculture. – 2015. – V. 435. – P. 75-77.
73. Horvath A., Jesensek D., Csorbai B. et al. Application of sperm cryopreservation to hatchery practice and species conservation: A case of the Adriatic grayling (*Thymallus thymallus*) // Aquaculture. – 2012. – V. 358-359. – P. 213-215.
74. Horvath A., Jesensek D., Snoj A. et al. Cryopreservation of sperm of the Adriatic grayling (*Thymallus thymallus*) and the marble trout (*Salmo marmoratus*) from the Soca river in Slovenia // Columella – J. of Agricultural and Environmental Sciences. – 2014. – V. 1. – P. 49-55.
75. Horvath A., Labbe C., Jesensek D. et al. Post-thaw storage of sperm from various salmonid species // J. Appl. Ichthyol. – 2015. – V. 31. – No. 1. – P. 119-124.
76. Iaffaldano N., Di Iorio M., Manchisi A. et al. Effective freezing rate for semen cryopreservation in endangered Mediterranean brown trout (*Salmo trutta macrostigma*) inhabiting the Biferno river (South Italy) // Zygote. – 2015. – V. 24. – P. 668-675.
77. Jodun W.A., King K., Farrell P. et al. Methanol and egg yolk as cryoprotectants for Atlantic salmon spermatozoa // North American Journal of Aquaculture. – 2006. – V. 69. – P. 36-40.
78. Judycka S., Cejko B.I., Dryl K. et al. The effect of supplementation of a trehalose-based extender with KCl on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) sperm freezability and post-thaw motility // Aquaculture. – 2016. – V. 465. – P. 303-310.
79. Judycka S., Ciereszko A., Dobosz S. et al. Effect of dilution in sperm maturation media and time of storage on sperm motility and fertilizing capacity of cryopreserved semen of sex-reversed female rainbow trout // General and Comparative Endocrinology. – 2017. – V. 245. – P. 89-93.
- 79a. Judycka S., Nynca J., Dietrich M.A. Development of an efficient and standardized method for the cryopreservation of Arctic charr milt and its use in the fertilization of brook trout eggs to produce 'spartic' hybrids // Aquaculture. – 2019. – V. 513. – P. 734363.
80. Judycka S., Nynca J., Liszewska E. et al. Comparative analysis of sperm freezability of sex-reversed female brook trout and of sex-reversed female rainbow trout semen // Aquaculture. – 2019. – V. 498. – P. 201-207.
81. Judycka S., Nynca J., Liszewska E. et al. Cryopreserved rainbow trout semen can be used for the fertilization of up to 8000 eggs in a single application // Aquaculture. – 2018. – V. 490. – P. 25-28.
82. Judycka S., Nynca J., Liszewska E. et al. Optimal sperm concentration in straws and final glucose concentration in extender are crucial for improving the cryopreservation protocol of salmonid spermatozoa // Aquaculture. – 2018. – V. 486. – P. 90-97.

83. Judycka S., Nynca J., Liszewska E. et al. Potassium ions in extender differentially influence the post-thaw sperm motility of salmonid fish // *Cryobiology*. – 2016. – V. 73. – No. 2. – P. 248-256.
84. Judycka S., Slowinska M., Nynca J. et al. Effects of glucose, methanol concentration, and time of equilibration on post-thaw sperm motility of rainbow trout semen // *Aquaculture*. – 2020. – V. 520. – P. 734996.
85. Judycka S., Slowinska M., Nynca J. et al. Oxidative stress in cryopreserved semen of normal males and sex-reversed females rainbow trout in relation to glucose concentration in the extender // 7th Int. Workshop on the Biology of Fish Gametes. 2-6 Sept. 2019, Rennes, France. Abstract Book. – P. 143.
- 85a. Judycka S., Slowinska M., Nynca J. et al. Oxidative stress in cryopreserved semen of sex-reversed female and normal male rainbow trout // *Aquaculture*. – 2020. – V. 528. – P. 735531.
86. Judycka S., Slowinska M., Nynca J. et al. The effect of glucose, methanol concentration and time equilibration on post-thaw sperm motility of rainbow trout sperm // 7th Int. Workshop on the Biology of Fish Gametes. 2-6 Sept. 2019, Rennes, France. Abstract Book. – P. 53-54.
- 86a. Kobayashi T., Fushiki Sh., Ueno K. Improvement of sperm motility of sex-reversed male rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by incubation in high-pH artificial seminal plasma // *Environmental Biology of Fishes*. – 2004. – V. 69. – P. 419-425.
87. Kusuda S., Koide N., Kawamura H. et al. Cryopreservation diluents for spermatozoa of Sakhalin taimen *Hucho perryi* // *Fish. Sci.* – 2005. – V. 71. – No. 2. – P. 293-298.
88. Kusuda S., Koide N., Kawamura H. et al. Cryopreservation of Sakhalin taimen *Hucho perryi* spermatozoa: Effect of cryoprotectants on post-thaw fertility // *Suisanzoshoku*. – 2004. – V. 52. – No. 2. – P. 171-175.
89. Kutluyer F., Kayim F., Ögretmen F. et al. Cryopreservation of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* spermatozoa: Effects of extender supplemented with different antioxidants on sperm motility, velocity and fertility // *Cryobiology*. – 2014. – V. 69. – No. 2. – P. 462-466.
90. Labbe C., Maise G. Influence of rainbow trout thermal acclimation on sperm cryopreservation: relation to change in the lipid composition of the plasma membrane // *Aquaculture*. – 1996. – V. 145. – P. 281-294.
91. Labbe C., Martoriati A., Devaux A. et al. Effect of sperm cryopreservation on sperm DNA stability and progeny development in rainbow trout // *Mol. Reprod. & Develop.* – 2001. – V. 60. – P. 397-404.
92. Lahnsteiner F. Cryopreservation protocols for sperm of salmonid fishes // *Cryopreservation in Aquatic Species*. World Aquaculture Society. Baton Rouge, Louisiana, 2000. – P. 91-100.
93. Lahnsteiner F. Semen cryopreservation in the Salmonidae and in the Northern pike // *Aquacult. Res.* – 2000. – V. 31. – P. 245-258.
94. Lahnsteiner F., Berger B., Weismann T. et al. The influence of various cryoprotectants on semen quality of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) before and after cryopreservation // *J. Appl. Ichthyol.* – 1996. – V. 12. – No. 2. – P. 99-106.
95. Lahnsteiner F., Mansour N., Kunz F.A. The effect of antioxidants on the quality of cryopreserved semen in two salmonid fish, the brook trout (*Salvelinus fontinalis*) and the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // *Theriogenology*. – 2011. – V. 76. – P. 882-890.
96. Lahnsteiner F., Mansour N., Weismann T. A new technique for insemination of large egg batches with cryopreserved semen in the rainbow trout // *Aquaculture*. – 2002. – V. 209. – P. 359-367.
97. Lahnsteiner F., Patzner R.A., Weismann T. Semen cryopreservation of salmonid fishes: Influence of handling parameters on the post-thaw fertilization rate // *Aquacult. Res.* – 1996. – V. 27. – No. 9. – P. 659-671.
98. Lahnsteiner F., Weismann T., Patzner R.A. A uniform method for cryopreservation of semen of the salmonid fishes *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), *Salmo trutta f. fario* L., *Salmo trutta f. lacustris* L., *Coregonus* sp. // *Aquacult. Res.* – 1995. – V. 26. – No. 11. – P. 801-807.
99. Lahnsteiner F., Weismann T., Patzner R.A. An efficient method for cryopreservation of testicular sperm from the Northern pike, *Esox Lucius* L. // *Aquacult. Res.* – 1998. – V. 29. – P. 341-347.
100. Lahnsteiner F., Weismann T., Patzner R. Cryopreservation of semen of the grayling (*Thymallus thymallus*) and the Danube salmon (*Hucho hucho*) // *Aquaculture*. – 1996. – V. 144. – P. 265-274.
101. Lahnsteiner F., Weismann T., Patzner R.A. Methanol as cryoprotectant and the suitability of 1.2 ml and 5 ml straws for cryopreservation of semen from salmonid fishes // *Aquacult. Res.* – 1997. – V. 28. – No. 6. – P. 471-479.
102. Legendre M., Billard R. Cryoconservation du sperme de truite arc-en-ciel (*Salmo gairdneri* R.) // *Bull. Fr. Pisc.* – 1980. – V. 278. – P. 11-33.
103. Legendre M., Billard R. Cryopreservation of rainbow trout sperm by deep freezing // *Reproduction, Nutrition and Development*. – 1980. – V. 20. – No. 6. – P. 1859-1868.
104. Maise G. Comparison of different carbohydrates for the cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) sperm // *Aquat. Living Resour.* – 1994. – V. 7. – No. 3. – P. 217-219.
105. Mansour N., Richardson G.F., McNiven M.A. Effect of extender composition and freezing rate on post-thaw motility and fertility of Arctic char, *Salvelinus alpinus* (L.), spermatozoa // *Aquacult. Res.* – 2006. – V. 37. – P. 862-868.
106. Mansour N., Richardson G.F., McNiven M.A. Effect of seminal plasma protein on postthaw viability and fertility of arctic char spermatozoa // *North American Journal of Aquaculture*. – 2008. – V. 70. – P. 92-97.
107. Martinez-Paramo S., Perez-Cerezales S., Gomez-Romano F. et al. Cryobanking as tool for conservation of biodiversity: Effect of brown trout sperm cryopreservation on the male genetic potential // *Theriogenology*. – 2009. – V. 71. – P. 594-604.
108. Mathes E., Stein H. Cryopreservation of grayling (*Thymallus thymallus*), nase (*Chondrostoma nasus*) and dace (*Leuciscus leuciscus*) // *Workshop on gamete and embryo storage and cryopreservation in aquatic organisms*. Marly le Roy, France, 30 march-2 april 1992. – 1992. – P. 39.
109. McNiven M.A., Gallant R.K., Richardson G.F. Dimethylacetamide as a cryoprotectant for rainbow trout spermatozoa // *Theriogenology*. – 1993. – V. 40. – No. 5. – P. 943-948.
110. Merino O., Risopatron J., Sanchez R. et al. Fish (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa cryoprotectant-free vitrification: Stability of mitochondrion as criterion of effectiveness // *Anim. Reprod. Sci.* – 2011. – V. 124. – P. 125-131.
111. Merino O., Sanchez R., Risopatron J. et al. Cryoprotectant-free vitrification of fish (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa: first report // *Andrologia*. – 2012. – V. 44. – P. 390-395.
112. Molnar J., Bokor Z., Varkonyi L. et al. The systematic development and optimization of large-scale sperm cryopreservation in northern pike (*Esox Lucius*) // *Cryobiology*. – 2020. – V. 92.
113. Mounib M.S. Cryogenic preservation of fish and mammalian spermatozoa // *J. Reprod. Fertil.* – 1978. – V. 53. – P. 13-18.
114. Müller K., Müller P., Pincemy G. et al. Characterization of sperm plasma membrane properties after cholesterol modification: consequences for cryopreservation of rainbow trout spermatozoa // *Biology of Reproduction*. – 2008. – V. 78. – P. 390-399.
115. Ninhaus-Silveira A., Foresti F., Tabata Y.A. et al. Cryopreservation of semen from functional sex-reversed genotypic females of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* // *Brazilian Archives of Biology and Technology*. – 2006. – V. 49. – No. 1. – P. 73-77.
116. Nynca J., Dietrich G.J., Dobosz S. et al. Effect of cryopreservation on sperm motility parameters and fertilizing ability of brown trout semen // *Aquaculture*. – 2014. – V. 433. – P. 62-65.
117. Nynca J., Dietrich G.J., Dobosz S. et al. Effect of post-thaw storage time and sperm-to-egg ratio on fertility of cryopreserved brook trout sperm // *Theriogenology*. – 2015. – V. 83. – P. 253-256.
118. Nynca J., Dietrich G.J., Fopp-Bayat D. et al. Quality parameters of fresh and cryopreserved whitefish (*Coregonus lavaretus* L.) semen // *J. Appl. Ichthyol.* – 2012. – V. 28. – No. 6. – P. 934-940.
119. Nynca J., Dietrich G.J., Grudniewska J. et al. Efficient method for cryopreservation of European huchen (*Hucho hucho* L.) and grayling (*Thymallus thymallus* L.) semen // *Aquaculture*. – 2015. – V. 435. – P. 146-151.
120. Nynca J., Judycka S., Liszewska E. et al. Standardization of spermatozoa concentration for cryopreservation of rainbow trout

- semen using a glucose-methanol extender // *Aquaculture*. – 2017. – V. 477. – P. 23-27.
121. Nynca J., Judycka S., Liszewska E. et al. Utility of different sugar extenders for cryopreservation and post-thaw storage of sperm from Salmonidae species // *Aquaculture*. – 2016. – V. 464. – P. 340-348.
122. Ogier de Baulny B., Le Vern Y., Kerboeuf D. et al. Flow cytometric evaluation of mitochondrial activity and membrane integrity in fresh and cryopreserved rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa // *Cryobiology*. – 1997. – V. 34. – No. 2. – P. 141-149.
123. Ohta H., Shimma H., Hirose K. Effects of freezing rate and lowest cooling pre-storage temperature on post-thaw fertility of amago and masu salmon spermatozoa // *Fisheries Science*. – 1995. – V. 61. – P. 423-427.
124. Ohta H., Shimma H., Hirose K. Relationship between fertility and motility of cryopreserved spermatozoa of the amago salmon *Oncorhynchus masou ishikawae*. *Fish. Sci.* – 1995. – V. 61. – P. 886-887.
125. Perez-Cerezales S., Martinez-Paramo S., Beirao J. et al. Evaluation of DNA damage as a quality marker for rainbow trout sperm cryopreservation and use of LDL as cryoprotectant // *Theriogenology*. – 2010. – V. 74. – P. 282-289.
126. Perez-Cerezales S., Martinez-Paramo S., Beirao J. et al. Fertilization capacity with rainbow trout DNA-damaged sperm and embryo developmental success // *Reproduction*. – 2010. – V. 139. – P. 989-997.
127. Perez-Cerezales S., Martinez-Paramo S., Cabrita E. et al. Evaluation of oxidative DNA damage promoted by storage in sperm from sex-reversed rainbow trout // *Theriogenology*. – 2009. – V. 71. – P. 605-613.
128. Piironen J. Cryopreservation of the sperm from Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.) // Workshop on gamete and embryo storage and cryopreservation in aquatic organisms (Marly le Roy, France, 30 march-2 april 1992). – 1992. – P. 42.
129. Piironen J. Cryopreservation of sperm from brown trout (*Salmo Trutta M. Lacustris* L.) and arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.) // *Aquaculture*. – 1993. – V. 116. – No. 2-3. – P. 275-285.
130. Piironen J. Cryopreservation of sperm from whitefish (*Coregonus spp.*) // Workshop on gamete and embryo storage and cryopreservation in aquatic organisms. Marly le Roy, France, 30 march-2 april 1992. – P. 43.
131. Piironen J. Factors affecting fertilization rate with cryopreserved sperm of whitefish (*Coregonus muksun Pallas*) // *Aquaculture*. – 1987. – V. 66. – P. 347-357.
132. Piironen J. Variation in the properties of milt from the Finnish landlocked salmon (*Salmo salar M. Sebago Girard*) during a spawning season // *Aquaculture*. – 1985. – V. 48. – P. 337-350.
133. Piironen J., Hyvarinen H. Cryopreservation of spermatozoa of the whitefish *Coregonus muksun Pallas* // *J. Fish Biol.* – 1983. – V. 22. – P. 159-163.
134. Pustowka C., McNiven M.A., Richardson G.F. et al. Source of dietary lipid affects sperm plasma membrane integrity and fertility in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) after cryopreservation // *Aquacult. Res.* – 2000. – V. 31. – P. 297-305.
135. Richardson G.F., McNiven M.A., Mansour N. Effect of methanol concentration and thaw rate on the viability and fertility of cryopreserved Arctic char, *Salvelinus alpinus* (L.), spermatozoa // *Aquacult. Res.* – 2011. – V. 42. – P. 1096-1100.
136. Richardson G.F., Miller T.L., McNiven M.A. Cryopreservation of Arctic char, *Salvelinus alpinus* (L.), semen in various extenders and in three sizes of straw // *Aquacult. Res.* – 2000. – V. 31. – P. 307-315.
137. Robles V., Cabrita E., Cunado S. et al. Sperm cryopreservation of sex-reversed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): parameters that affect its ability for freezing // *Aquaculture*. – 2003. – V. 224. – P. 203-212.
138. Salte R., Galli A., Falaschi U. et al. A protocol for the on-site use of frozen milt from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) applied to the production of progeny groups: comparing males from different populations // *Aquaculture*. – 2004. – V. 231. – P. 337-345.
139. Sarosiek B., Dryl K., Judycka S. et al. Cryopreservation method for whitefish (*Coregonus lavaretus*) semen possible for use in large-scale fertilization // *Aquacult. Res.* – 2016. – V. 47. – P. 4038-4042.
140. Sarvi M. K., Niksirat H., Mojazi Amiri B. et al. Cryopreservation of semen from the endangered Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*) // *Aquaculture*. – 2006. – V. 256. – P. 564-569.
141. Sarvi M. K., Niksirat H., Mojazi Amiri B. et al. The effect of extender type, freezing and thawing rates on fertility of the cryopreserved semen of the Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*) // *Iranian J. of Fisheries Sciences*. – 2007. – V. 7. – No. 1. – P. 111-128.
142. Scheerer P.D., Thorgaard G.H. Improved fertilization by cryopreserved rainbow trout semen treated with theophylline // *The Progr. Fish-Culturist*. – 1989. – V. 51. – P. 179-182.
143. Scott A.P., Baynes S.M. A review of the biology, handling and storage of salmonid spermatozoa // *J. Fish Biol.* – 1980. – V. 17. – P. 707-739.
144. Stein H., Bayrle H. Cryopreservation of the sperm of some freshwater teleosts // *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.* – 1978. – V. 18. – P. 1073-1076.
145. Steinberg H., Hedder A., Baulain R. et al. Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) semen in straws // Proc. 5th Int. Symp. Reprod. Physiol. Fish. Austin, Tex., 2-8 July 1995. – P. 146.
146. Stoss J., Holtz W. Cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) sperm. I. Effect of thawing solution, sperm density and interval between thawing and insemination // *Aquaculture*. – 1981. – V. 22. – P. 97-104.
147. Stoss J., Holtz W. Cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) sperm. II. Effect of pH and presence of a buffer in the diluent // *Aquaculture*. – 1981. – V. 25. – P. 217-222.
148. Stoss J., Holtz W. Cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) sperm. III. Effect of proteins in the diluent, sperm from different males and interval between sperm collection and freezing // *Aquaculture*. – 1983. – V. 31. – P. 275-282.
149. Stoss J., Holtz W. Cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) sperm. IV. The effect of DMCO concentration and equilibration time on sperm survival, sucrose and KCl as extender components and the osmolality of the thawing solution // *Aquaculture*. – 1983. – V. 32. – P. 321-330.
150. Stoss J., Refstie T. Short-term storage and cryopreservation of milt from Atlantic salmon and sea trout // *Aquaculture*. – 1983. – V. 30. – P. 229-236.
151. Tekin N., Secer S., Akcay E. et al. Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) semen // *The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh*. – 2003. – V. 55. – No. 3. – P. 208-212.
152. Tekin N., Secer S., Akcay E. et al. Effects of glycerol additions on post-thaw fertility of frozen rainbow trout sperm, with an emphasis on interaction between extender and cryoprotectant // *J. Appl. Ichthyol.* – 2007. – V. 23. – P. 60-63.
153. Terner C. Evaluation of salmonid sperm motility for cryopreservation // *The Progr. Fish-Culturist*. – 1986. – V. 48. – P. 230-232.
154. Valdebenito I.I., Gallegos P.C., Effer B.R. Gamete quality in fish: evaluation parameters and determining factors // *Zygote*. – 2013. – P. 1-21.
155. Wheeler P.A., Thorgaard G.H. Cryopreservation of rainbow trout semen in large straws // *Aquaculture*. – 1991. – V. 93. – No. 1. – P. 95-100.
156. Xin M., Niksirat H., Shaliutina-Kolesova A. et al. Molecular and subcellular cryoinjury of fish spermatozoa and approaches to improve cryopreservation // *Reviews in Aquaculture* – 2020. – V. 12. – No. 2. – P. 909-924.
157. Yamano K., Kasahara E., Yamaha E. et al. Cryopreservation of masu salmon sperm by the pellet method // *Bull. Fac. Fish Hokkaido Univ.* – 1990. – V. 41. – P. 149-154.
158. Young W.P., Frenyea K., Wheeler P.A. et al. No increase in developmental deformities or fluctuating asymmetry in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) produced with cryopreserved sperm // *Aquaculture*. – 2009. – V. 289. – P. 13-18.
159. Zhang J.J., Li S.Z., Tulake K. et al. The effects of extenders and sperm-egg ratios on fertilizing ability of cryopreserved testicular sperm of northern pike (*Esox Lucius* L.) // *J. Appl. Ichthyol.* – 2011. – V. 27. – P. 1037-1040.