

УДК 57.043.08:597:612.018

К.І. Буцький*, А.Ю. Пуговкін, Є.Ф. Копейка

Вплив гормональних ін'єкцій на параметри якості та кріорезистентність сперматозоїдів білого товстолобика (*Hypophthalmichthys molitrix*, Val. 1844)

UDC 57.043.08:597:612.018

K.I. Butskiy*, A.Yu. Puhovkin, E.F. Kopeika

Effect of Hormone Injections on Quality Parameters and Cryoresistance of Sperm from Silver Carp (*Hypophthalmichthys molitrix*, Val. 1844)

Реферат: Досліджено вплив різних видів гормональної стимуляції завершальних етапів гаметогенезу білого товстолобика (*Hypophthalmichthys molitrix*, Val. 1844) на якість його сперми. Препарати використовувались у наступному дозуванні: гіпофіз – 2,5 мг/кг; «Сурфагон» – 1 мкг/кг з «Метоклопрамідом» – 5мг/кг; «Овопель» – 0,5 гранули/кг. Встановлено, що після стимуляції плідників сумішшю «Сурфагону» та «Метоклопраміду» концентрація клітин у спермі була вище, ніж після стимуляції препаратом «Овопель» або гіпофізом сазана, та складала (9,7 ± 0,9); (10,7 ± 0,8); (13,3 ± 0,9) млрд/мл відповідно. Концентрація АТФ у сперматозоїдах після стимуляції цим препаратом також збільшилася майже удвічі та складала (51,9 ± 2,1) нмоль/мг білка, а препарату «Овопель» та гіпофіза сазана – (18,5 ± 0,7) та (30,3 ± 4) нмоль/мг білка. Більш висока концентрація активно рухливих сперматозоїдів після кріоконсервування може свідчити про відносно високу якість цієї сперми.

Ключові слова: сперма, товстолобик, гормональна стимуляція, кріоконсервування, АТФ, концентрація сперми.

Реферат: Исследовано влияние разных видов гормональной стимуляции завершающих этапов гаметогенеза белого толстолобика (*Hypophthalmichthys molitrix*, Val. 1844) на качество его спермы. Препараты использовались в следующей дозировке: гипофиз – 2,5 мг/кг; «Сурфагон» – 1 мкг/кг з «Метоклопрамидом» – 5 мг/кг; «Овопель» – 0,5 гранули/кг. Установлено, что после стимуляции самцов смесью «Сурфагона» и «Метоклопрамида» концентрация клеток в сперме была выше, чем после стимуляции препаратом «Овопель» или гипофизом сазана, и составляла (9,7 ± 0,9); (10,7 ± 0,8); (13,3 ± 0,9) млрд/мл соответственно. Концентрация АТФ в сперматозоидах после стимуляции этим препаратом также увеличилась почти вдвое и составляла (51,9 ± 2,1) нмоль/мг белка, а препарата «Овопель» и гипофиза сазана – (18,5 ± 0,7) и (30,3 ± 4) нмоль/мг белка. Более высокая концентрация активно подвижных сперматозоидов после криоконсервирования может свидетельствовать об относительно высоком качестве этой спермы.

Ключевые слова: сперма, толстолобик, гормональная стимуляция, криоконсервирование, АТФ, концентрация спермы.

Abstract: The influence of different hormonal stimulation of final stages of gametogenesis in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*, Val. 1844) on the quality of its sperm was studied. Preparations were used in following dosage: pituitary – 2.5 mg/kg; Surfagon – 1 µg/kg combined with Metoclopramide – 5 mg/kg; Ovopel – 0.5 pellet/kg. It was found that after stimulation of sires with a mixture of Surfagon and Metoclopramide the cell concentration in semen was higher than after stimulation by drug Ovopel or carp pituitary, and it was (9.7 ± 0.9); (10.7 ± 0.8); (13.3 ± 0.9) bln/ml, correspondingly. The ATP concentration in sperm after stimulation by this drug also was almost twice bigger and it was (51.9 ± 2.1) nmol/mg protein, and in case of Ovopel and carp pituitary it was (18.5 ± 0.7) and (30.3 ± 4) nmol/mg protein. A higher concentration of active motile spermatozoa after cryopreservation may indicate a relatively high quality of the sperm.

Key words: sperm, silver carp, hormone stimulation, cryopreservation, ATP, sperm concentration.

Забруднення водоймищ, будівництво гідростроуд і хижацький рибний промисел є причинами різкого зменшення чисельності багатьох популяцій цінних риб і навіть зникнення деяких їх видів. Для збереження генофонду риб використовують як методи кріоконсервування сперматозоїдів, так і штучного їх вирощування у риборозплідних господарствах. Покращення якості кріоконсервованої спер-

Water pollution, building of hydraulic constructs and robbery fishing are the reasons of dramatic deminishing of numerous populations of commercially valuable species and even loss of some species. To preserve fish gene pool one use either methods of sperm cryopreservation or artificial fish culture in fish hatcheries. Improving of a cryopreserved semen quality would enable to reduce probability of selection effects during

Відділ кріобіології системи репродукції, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:
вул. Переяславская, 23, м. Харків, Україна 61015;
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-30-84,
електронна пошта: kirill_buz@list.ru

Надійшла 24.12.2013
Прийнята до друку 27.02.2014

Проблеми кріобіології і кріомедицини. – 2014. – Т. 24, №2. – С. 140–148.
© 2014 Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України

Department of Cryobiology of Reproduction System, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

*To whom correspondence should be addressed:
23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015;
tel.: +380 57 3737435, fax: +380 57 373 3084,
e-mail: kirill_buz@list.ru

Received December 24, 2013
Accepted February 27, 2014

Probl. Cryobiol. Cryomed. 2014. 24(2): 140–148.
© 2014 Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

ми дозволить знизити ймовірність селекційних ефектів під час кріоконсервування, зменшити витрати на зберігання клітин, удосконалити біотехніку відтворення риб і підвищити продуктивність рибозплідних підприємств.

Якість кріоконсервованої сперми залежить від багатьох факторів як на стадії формування сперматозоїдів, так і на останньому етапі сперміації [13]. Однією з головних умов, за яких відбувається дозрівання риб, є певне співвідношення між температурою води та кількістю світлових днів. При отриманні гамет для штучного запліднення обов'язковою є гормональна стимуляція риб. На рибозплідних заводах для дозрівання риб використовують ін'єкцію розтертого гіпофіза, люліберіну, хоріонічного гонадотропіну або гормональні препарати «Сурфагон», «Овопель» та ін. Отже, особливого значення набувають як умови утримання риб, так і стимуляція дозрівання плідників на завершальному етапі.

Для кріоконсервування сперми білого товстолобика (*Hypophthalmichthys molitrix*, Val, 1844) використовували розроблені ще у 1986 р. методи кріоконсервування сперми коропових [3], за допомогою яких після відігріву отримували 30–40% рухливих клітин. Однак з'явилися відомості про отримання до 70% рухливих сперматозоїдів після кріоконсервування сперми коропових [9], але механізми підвищення якості цієї сперми недостатньо вивчені, а дані методи потребують подальшої перевірки. Крім того, цю роботу неможливо повторити через високу варіабельність якості нативної сперми.

На сьогодні ще недостатньо досліджена дія гормональних препаратів на метаболізм і функціональні характеристики сперматозоїдів риб до та після кріоконсервування. Основними параметрами, за якими оцінюють метаболізм та функціональний стан сперми після гормональної стимуляції, є запліднююча здатність, рівень рухливості та концентрація АТФ у спермі. Існує багато досліджень [8, 14, 21, 22] щодо впливу деяких гормонів на характеристики сперми риб у нормі, але лише у поодиноких роботах повідомляється про механізм їх дії на кріорезистентність сперматозоїдів [11, 15]. Встановлено, що після стимуляції веслоноса «Овопелем» сперматозоїди рухались на 2 хв довше, ніж після стимуляції синтетичним аналогом гонадотропін-рилізінг-гормону, а після кріоконсервування життєздатними залишалось вдвічі більше клітин [15].

Мета дослідження – вивчити вплив різних видів гормональної стимуляції білого товстолобика на концентрацію клітин, АТФ сперми, рівень та час рухливості сперматозоїдів після активації, а також на їх кріорезистентність.

cryopreservation, save the costs for cell storage, advance the biotechniques of fish reproduction and enhance productivity of fish hatcheries.

Cryopreserved sperm quality depends on the various factors both at the stage of sperm formation and at the very last step, spermiation [8]. One of the main conditions for fish maturation is apparently the ratio between water temperature and number of day-light hours. Hormone stimulation of fish is mandatory to derive the gametes for artificial insemination. Fish maturation at fish hatcheries is achieved by injection of pounded pituitary gland, luliberin, chorionic gonadotropin or such hormonal preparations as Surfagon, Ovopel etc. Thus, of special value are the fish keeping conditions as well as stimulation of male maturation at the final stage.

Cryopreservation of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*, Val. 1844) semen is possible by developed in 1986 methods for cryopreservation of carp sperm [12], which allow to get post thaw 30–40% motile cells. Nevertheless, there are some data on the possible up to 70% motile spermatozoa after cryopreservation of carp semen [4], but the mechanisms of improving the quality of the sperm are unclear, and the methods require further testing. Moreover, this experiment is impossible to perform due to a high variability of fresh sperm quality.

The effect of hormonal preparations on metabolism and functional characteristics of fish sperm prior to and after cryopreservation is not properly analyzed to date. Basic parameters for assessing the metabolism and functional state of sperm after hormone stimulation are male fertility, motility rate and ATP concentration in sperm. There are lot of reports [1, 9, 21, 22] on the impact of some hormones on the characteristics of fish sperm in a norm, but only several studies point to the mechanism of their effect on spermatozoa cryoresistance [6, 10]. We have found that after stimulation of paddlefish with Ovopel the spermatozoa were motile 2 min longer than after stimulation with synthetic analogue of gonadotropin-releasing hormone, and following cryopreservation twice as more cells remained viable [10].

The objective of this research was to study the effect of different types of hormone stimulation of silver carp on cell concentration, sperm ATP, rate and time of sperm motility after activation as well as on their cryoresistance.

Materials and methods

The research was performed at fish hatchery (Myronivskyy village, Donetsk region, Ukraine) in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*, Val. 1844). Mature males of an average weight of 4.5 kg were



Матеріали та методи

Дослідження проводили в рибному господарстві (сел. Миронівський, Донецька обл.) на білому товстолобику (*Hypophthalmichthys molitrix*). Плідників із середньою масою 4,5 кг утримували в басейнах із проточною водою (25°C), до яких їх переносили зі ставків. Ін'єкції проводили вранці після зважування. Для стимуляції сперміації використовували гомогенат гіпофіза сазана, суміш препаратів «Сурфагону» (синтетичний аналог гонадотропін-рилізінг-гормону ссавців) з «Метоклопрамідом» (блокатор дофамінових рецепторів), а також комерційний препарат «Овопель» для карпів (аналог гонадотропін-рилізінг-гормону ссавців із «Метоклопрамідом»). У роботі використовували наступні дози: гіпофіз – 2,5 мг/кг; «Сурфагон» («МосАгроГен», Росія) – 1 мкг/кг з «Метоклопрамідом» (ПАТ «Дарниця», Україна) – 5 мг/кг; «Овопель» («Inter Sh», Угорщина) – 0,5 гранули/кг.

Сперму збирали в сухий чистий посуд через 20–24 годин після ін'єкцій. Для визначення концентрації клітин сперму розводили ізотонічним розчином NaCl та використовували камеру Горяєва і фотоелектроколориметр KF-77 (Польща).

Об'єктивність візуальної оцінки рухливості активованих сперматозоїдів забезпечувалася методом «осліплення»: проби брали у випадковому порядку (експериментатору не було відомо, після якої стимуляції отримана кожна проба). Для активації нативної сперми використовували воду зі ставка (осмотичність 5–10 мОсм/кг), а для відігрітої сперми з метою зменшення впливу перепаду осмотичного тиску на клітини – гліциновий активатор з осмотичністю 177 мОсм/кг, до складу якого входили наступні компоненти: 49,5 мМ трис-НСІ-буфера (рН 8,1), 44,5 мМ NaCl, 4 мМ KCl та 18,7 мМ гліцину.

Сперму розводили у співвідношенні 1:1 кріозахисним розчином: 71,8 мМ NaCl; 0,8 мМ KCl; 2,4 мМ CaCl₂; 5,2 мМ MgSO₄; 33,3 мМ NaHCO₃; 5,7 мМ сахарози; 82,3 мМ трис-НСІ-буфера, рН 8,1; 24 мг/л яєчного жовтка; 0,01 мМ полівінілового спирту [3]. Отриману суспензію клітин розливали в ампули об'ємом 0,5 мл і охолоджували в парах рідкого азоту за трьохетапним режимом, розробленим для кріоконсервування сперми карпових. На першому етапі температуру знижували від 25 до –15°C зі швидкістю 3–5 град/хв, на другому до –70°C зі швидкістю 15–20 град/хв, далі 100 град/хв [3]. Ампули розморожували до появи рідкої фази на водяній бані (40°C), воду постійно перемішували.

Для визначення вмісту АТФ до 0,5 мл сперми додавали 0,5 мл 10%-го НСІО₄, потім інтенсивно перемішували і швидко охолоджували в рідкому азоті. Після відігріву до 2–5°C ампули центрифую-

kept in the pools with running water (25°C) wherein they were transferred from ponds. Injections were done in the morning after weighing. To stimulate the spermiation we used the homogenate of European carp pituitary, mixtures of preparations Surfagon (synthetic analogue of mammal gonadotropin-releasing hormone) with Metoclopramide (dopamine receptor antagonist) and commercial preparation Ovopel for carps (analogue of mammal gonadotropin-releasing hormone with Metoclopramide). In our study we used the following dosage: pituitary – 2.5 mg/kg, Surfagon (MosAgroGen, Russia) – 1 µg/kg with Metoclopramide (Darnitsa, Ukraine) – 5 mg/kg; Ovopel (Inter Sh, Hungary) – 0.5 granules/kg.

Collection of sperm was done into a dry clean vial in 20–24 hours following injections. To determine cell concentration the sperm was diluted with isotonic NaCl solution and calculated with Goryaev's chamber and photoelectrocolorimeter KF-77 (Poland).

Objective visual assessment of motility of activated spermatozoa was provided by 'blind' method: the samples were taken at random (researcher did not know after which stimulation each sample was obtained). To activate a native sperm we used pond water (osmolality of 5–10 mOsm/kg), and for thawed sperm to decrease the impact of osmotic pressure changes on the cells we applied glycine activating agent of 177 mOsm/kg osmolality which involved the following components: 49.5 mM Tris-HCl-buffer (pH 8.1), 44.5 mM NaCl, 4 mM KCl and 18.7 mM glycine.

Dilution of sperm was performed 1:1 with cryoprotective solution: 71.8 mM NaCl; 0.8 mM KCl; 2.4 mM CaCl₂; 5.2 mM MgSO₄; 33.3 mM NaHCO₃; 5.7 mM sucrose; 82.3 mM Tris-HCl-buffer, pH 8.1; 24 mg/l egg yolk; 0.01 mM polyvinyl alcohol [3]. The obtained cell suspension was poured into ampoules of 0.5 ml volume and cooled in the vapours of liquid nitrogen by three-step regimen developed for cryopreservation of carp semen. At the first stage temperature was lowered from 25 down to –15°C with the rate of 3–5 deg/min, at the second stage down to –70°C with the rate of 15–20 deg/min, and thereafter with 100 deg/min [12]. The ampoules were thawed in water bath (40°C) until the appearance of liquid phase, water was constantly mixed.

To determine the ATP content, 0.5 ml sperm was supplemented with 0.5 ml 10% HClO₄, then it was intensively mixed and rapidly cooled in liquid nitrogen. After warming up to 2...5°C the ampoules were centrifuged at 5°C for 5 min at 1,000 g. Supernatant was transferred into another vial, neutralized with 2 M aqueous KOH solution to pH 7.0 and incubated during 15 min at 5°C. Protein in the sediment was determined by Lowry method in Miller's modification. Thereafter supernatant was centrifuged for 5 min at 1,000 g. ATP



гували за температури 5°C протягом 5 хв при 1000g. Супернатант переносили в іншу пробірку, нейтралізували водним розчином 2М КОН до рН 7,0 та інкубували 15 хв при 5°C. Білок в осаді визначали методом Лоурі в модифікації Міллера. Після цього супернатант центрифугували протягом 5 хв при 1000g. Визначення концентрації АТФ проводили ферментативним методом за перетворенням НАДН у НАДФН у системі сполучених ферментативних реакцій, послідовно додавали глюкозо-6-фосфатдегідрогеназу (Г6ФДГ) та гексокіназу (ГК) з глюкозою. Середовище для визначення концентрації АТФ містило 100 мМ трис-НСІ, рН 7,0; 4,1 мМ етилендіамінтетраоцтової кислоти (ЕДТА); 2мМ MgCl₂; 4 мМ НАДН; 25 од/мл Г6ФДГ; 5 од/мл ГК [5]. Рівень НАДФН реєстрували спектрофотометричним методом при довжині хвилі 340 нм. Вміст АТФ виражали в нмоль/мг білка.

Осмотичну резистентність сперматозоїдів оцінювали за розробленим нами раніше методом [7]. Для цього в кювету фотоелектроколометра додавали 3,6 мл дистильованої води та 54 мкл сперми та, постійно перемішуючи, встановлювали зміну світлопропускання з часом. За експериментально отриманою залежністю кількості пошкоджених клітин від світлопропускання розраховували час, за який гине 50% клітин (T₅₀).

Отримані результати статистично обробляли за допомогою t-критерію Стьюдента для незалежних вибірок із використанням програм «Statistica 7.0» («Statsoft», США) та «Excel» («Microsoft», США). Відмінності між виборками вважали статистично значущими за $p < 0,05$ ($n = 7$).

Результати та обговорення

У результаті експериментів було визначено вплив різної гормональної стимуляції плідників на концентрації одержаної сперми та АТФ (рис. 1).

Після стимуляції товстолобика сумішшю «Сурфагону» і «Метоклопраміду» була отримана сперма зі значно більшою концентрацією клітин ($p < 0,05$) порівняно зі стимуляцією «Овопелем» або гіпофізом на 20,5 та 28% відповідно (рис. 1). Ця різниця в перерахунку на 1 мл сперми становила 2,75 млрд клітин при використанні «Овопеля» та 3,75 млрд – гіпофіза. Рівень АТФ у спермі плідників після різної гормональної стимуляції також значно відрізнявся (рис. 2).

Концентрована сперма, яку отримали після стимуляції плідників сумішшю «Сурфагону» та «Метоклопраміду», в середньому містила майже на третину більше клітин та мала вдвічі більший рівень АТФ, ніж після стимуляції гіпофізом або «Овопелем».

concentration was determined by enzymatic method by the transformation of NADH into NADPH through the system of combined enzyme reactions, to start these glucose-6-phosphatedehydrogenase (G6PDH) and hexokinase (HK) with glucose were stepwise added. The medium for determination of ATP concentration contained 100 mM Tris-HCl, pH 7.0; 4.1 mM ethylene diamine tetraacetate (EDTA); 2 mM MgCl₂; 4 mM NADP; 25 IU/ml G6PDH; 5 IU/ml HK [19]. NADPH level was assessed spectrophotometrically at 340 nm. ATP content was expressed through nmol/mg of protein.

Osmotic resistance of spermatozoa was assessed by previously developed by us method [17]. For this purpose, the cuvette of photoelectrocolorimeter was filled with 3.6 ml distilled water, 54 μ l sperm was added and after constant mixing the change of light transmission was recorded with the time course. Using the experimentally obtained dependence of damaged cell number vs. the light transmission we calculated the time of death of 50% cells (T₅₀).

The results were statistically processed with Student's t-test for independent samples using Statistica 7.0 (Statsoft, USA) and Excel (Microsoft, USA). The differences between samples were considered significant at $p < 0.05$ ($n = 7$).

Results and discussion

The experiments allowed to determine the effect of different hormone stimulation of mature males on concentration of the obtained sperm and ATP (Fig. 1).

After stimulation of carp with the mixture of Surfagon and Metoclopramide we obtained the sperm with significantly higher cell concentration ($p < 0.05$) if compared to the stimulation with Ovopel or pituitary by 20.5 and 28%, respectively (Fig. 1). This difference normalized to 1 ml sperm was 2.75 bln cells when using Ovopel and 3.75 bln in case of pituitary. ATP level in mature male spermatozoa after different hormone stimulation differed significantly as well (Fig. 2).

Concentrated sperm obtained after stimulation of mature males with the mixture of Surfagon and Metoclopramide in average contained nearly a third more cells and had two times higher ATP level than after stimulation with pituitary or Ovopel.

In addition to assessment of cell concentration and ATP content it was important to reveal the effect of cryoprotective solution and cryopreservation on the characteristics of spermatozoa obtained after different types of hormone stimulation of mature males. For this purpose the activated sperm was assessed by the motility of cells with a forward rectilinear movement motion and duration of their movement. No differences between the samples were found according to these criteria (Fig. 3).



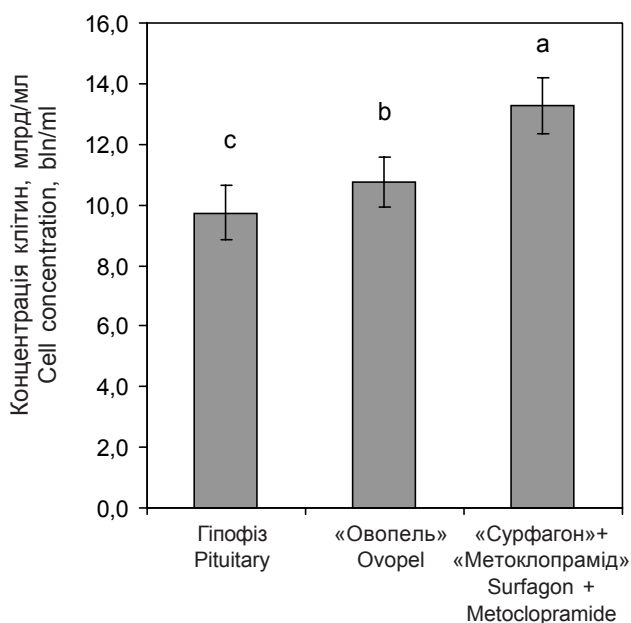


Рис. 1. Концентрація клітин нативної сперми білого товстолобика (*Hypophthalmichthys molitrix*, Val, 1844) після гормональної стимуляції різними препаратами; різниця між даними, позначеними різними індексами (a, b, c), статистично значуща, $p < 0,05$.

Fig. 1. Concentration of native sperm cells of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*, Val. 1844) after hormone stimulation with different preparations; differences between data indicated with different indices (a, b, c) are statistically significant, $p < 0.05$.

Крім визначення концентрації клітин та вмісту АТФ, важливим було виявити вплив криозахисного розчину та криоконсервування на функціональні характеристики сперматозоїдів, отриманих після різних видів гормональної стимуляції плідників. Для цього в активованій спермі визначали рухливість клітин із поступовим прямолінійним рухом та час їх руху. За цими критеріями відмінностей між групами встановлено не було (рис. 3).

У відігрітій активованій спермі рухливість сперматозоїдів була майже однаковою. Виходячи з цих результатів, можна припустити, що сперма, отримана після стимуляції сумішшю «Сурфагону» і «Метоклопрамід», була чутливішою до впливу середовища криоконсервування, але рухливість клітин у полі зору не є показником абсолютної їх кількості. При визначенні відносної рухливості сперматозоїдів, тобто відношення відсотка рухливих клітин після криоконсервування до відсотка у криозахисному розчині до криоконсервування, виявилося, що у відігрітій спермі, отриманій після стимуляції сумішшю «Сурфагону» і «Метоклопрамід», кількість клітин, які рухались, була найбільшою. Враховуючи ці дані, можна визначити концентрацію рухливих клітин у спермі («Сурфагон» і «Метоклопрамід» – 3,2; «Овопель» – 2,2; гіпофіз –

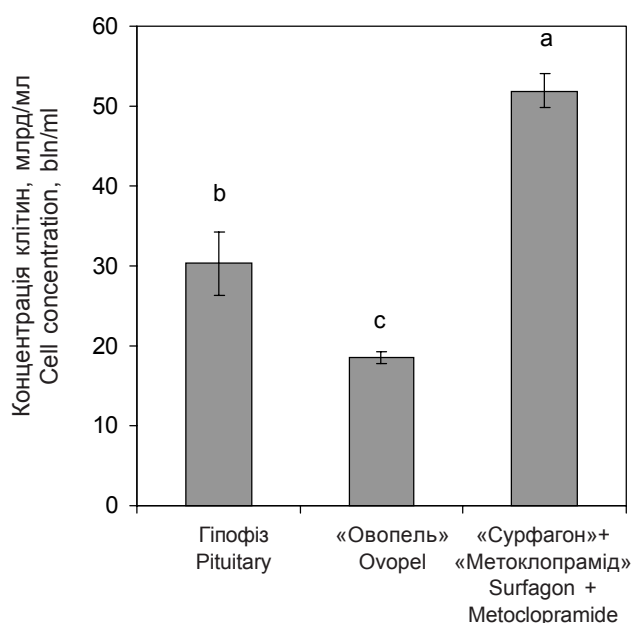


Рис. 2. Концентрація АТФ на 1 мг білка в нативній спермі білого товстолобика (*Hypophthalmichthys molitrix*, Val, 1844); різниця між даними, позначеними різними індексами (a, b, c), статистично значуща, $p < 0,05$.

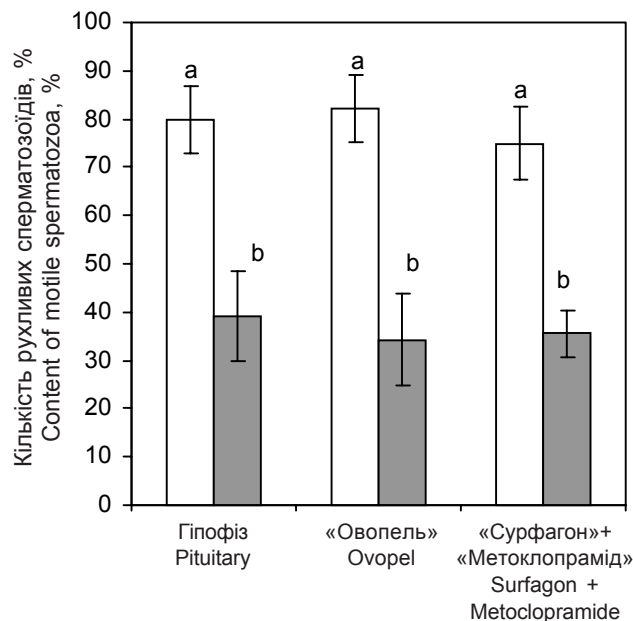
Fig. 2. ATP concentration per 1 mg protein in native sperm of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*, Val. 1844); differences between data indicated with different indices (a, b, c) are statistically significant, $p < 0.05$.

The motility was almost the same in all the groups of thawed activated sperm. In terms of these results we can suggest that sperm obtained after stimulation with the mixture of Surfagon and Metoclopramide was more sensitive to the effect of cryopreservation medium, but cell motility within the field of vision could not point their absolute quantity. Assessment of relative spermatozoa motility, *i. e.* relation of percentage of motile cells after cryopreservation to the one found in cryoprotective solution prior to cryopreservation allowed to note thawed semen obtained after stimulation with the mixture of Surfagon and Metoclopramide had the highest number of motile cells. Considering these data it is possible to calculate the concentration of motile cells in sperm (3.2 bln/ml for Surfagon and Metoclopramide; 2.2 for Ovopel; and 2.4 for case of pituitary). We have found that in thawed semen derived after hormone stimulation with the mixture of Surfagon and Metoclopramide, ATP and cell concentrations were the highest. A significant loss of motile cells in cryoprotective solution in our opinion may be explained by the fact that this sperm had higher heterogeneity by the maturity degree if compared to other stimulating agents. Probably it would be reasonable to collect the spermatozoa several hours later. As it was previously mentioned [10], stimulation of paddlefish mature males with



Рис. 3. Вплив криозахисного розчину та криоконсервування на рухливість сперматозоїдів білого товстолобика (*Hypophthalmichthys molitrix*, Val, 1844): □ – рівень рухливості нативних сперматозоїдів; ■ – рівень рухливості криоконсервованих сперматозоїдів; різниця між даними, позначеними різними індексами (a, b) статистично значуща, $p < 0,05$.

Fig. 3. Effect of cryoprotective solution and cryopreservation on the motility of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*, Val, 1844) spermatozoa: □ – motility rate of native spermatozoa, %; ■ – motility rate of cryopreserved spermatozoa, %; differences between data indicated with different indices (a, b) are statistically significant, $p < 0.05$.



2,4 млрд/мл). Встановлено, що у відігрітій спермі, отриманій після гормональної стимуляції сумішшю «Сурфагону» і «Метоклопраміду», концентрація АТФ та клітин найбільша. Значну втрату рухливих клітин у криозахисному розчині, на наш погляд, можна пояснити тим, що ця сперма мала більшу гетерогенність за ступенем зрілості в порівнянні з іншими стимуляторами. Можливо, слід було збільшити термін між стимуляцією та отриманням сперми. Як зазначалося раніше [15], після стимуляції плідників веслоноса «Овопелем» їх сперма дозрівала вдвічі довше порівняно зі стимуляцією лютеїнізуючим гормоном.

На думку деяких авторів [1, 10], при збільшенні концентрації клітин у суспензії підвищується їх стійкість до несприятливих факторів криоконсервування. Отже, різна початкова концентрація сперми може впливати на її криорезистентність. Після стимуляції сумішшю «Сурфагону» і «Метоклопраміду» на фоні більшої концентрації сперматозоїдів спостерігається більший рівень збереженості клітин [2], що може пояснюватися внутрішньою регуляцією на рівні організму плідників як саморегулюючих систем. При збільшенні концентрації клітин підвищується осмотичний тиск плазми, а тому і стійкість мембран [19].

Результати наших досліджень свідчать про майже однакову осмотичну резистентність сперматозоїдів, отриманих після різних видів гормональної стимуляції (зокрема «Овопелем» та сумішшю «Сурфагону» і «Метоклопраміду», рис. 4), однак вони потребують доопрацювання.

Після різних видів стимуляції пошкодження мембран 50% сперматозоїдів відбувається вдвічі

Ovopel led to twice longer maturation of their sperm if compared with the stimulation of luteinizing hormone.

Some authors suggested [2, 5] that increasing of the cell concentration in suspension resulted in an increased resistance to the unfavorable conditions of cryopreservation. In other words, different initial sperm concentration can affect its cryoresistance. Following stimulation with Surfagon and Metoclopramide resulted in higher spermatozoa concentration we observed an increased level of cell survival [3]. This can be explained by internal regulation at the organismal level of mature male as self-regulating systems. Rised cell concentration leads to an increased osmotic pressure of plasma, and therefore an improved membrane resistance [16].

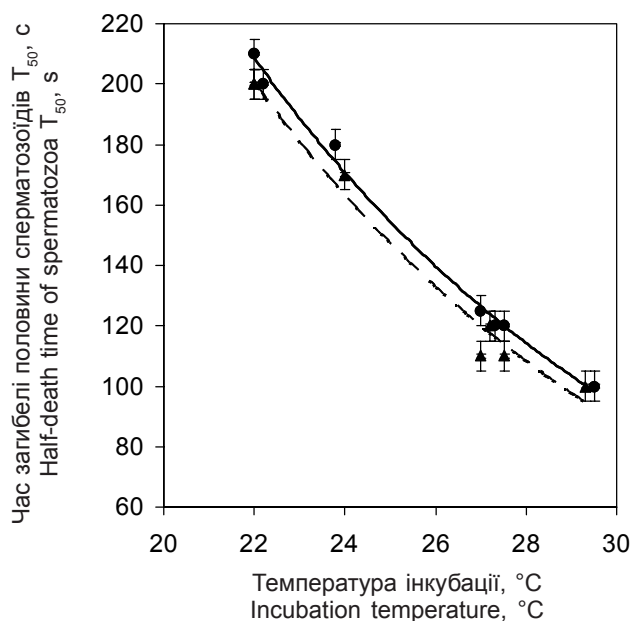
Our findings confirm quite an equal osmotic resistance of spermatozoa derived after different types of hormone stimulation (in particular, Ovopel and the mixture of Surfagon and Metoclopramide (Fig. 4)), but these still require further ascertainment.

After various stimulations the damage in 50% of spermatozoa membranes occurred twice faster if incubation medium temperature was 29°C, if compared with 22°C. Primarily, this is due to the dependence of cell membranes permeability for water molecules vs. the temperature [20].

In the end of summer all carp spermatozoa are entirely formed and non-motile in fish gonads until new spawning season. Thus, the cause of possible increasing of their cryoresistance can be the rise of ATP concentration in sperm. As it is known, the stimulation of males with Metoclopramide inhibits dopamine excretion, leading to an increased level of prolactin in blood [15] which affects different processes in fish

Рис. 4. Залежність загибелі сперматозоїдів (T_{50}), отриманих після різних видів гормональної стимуляції, від температури середовища інкубації: ▲ та суцільна лінія – стимуляція сумішшю «Сурфагону» і «Метоклопраміду»; ● та пунктирна лінія – стимуляція «Овопелем»).

Fig. 4. Dependence of spermatozoa death half time (T_{50}) obtained after various hormone stimulation, on temperature of incubation medium (▲ and solid line denote stimulation with Surfagon and Metoclopramide; ● and dotted line denote stimulation with Ovopel).



швидше за температури середовища інкубації 29°C, ніж за температури 22°C, що, в першу чергу, пояснюється залежністю проникності їх мембран для молекул води від температури [6].

Усі сперматозоїди у коропових вже наприкінці літа повністю сформовані та нерухливі в гонадах риб до нового нерестового сезону, тому причиною можливого підвищення їх кріорезистентності може бути збільшення концентрації АТФ у спермі. Відомо, що стимуляція самців «Метоклопрамідом» інгібує виділення дофаміну, що призводить до підвищення рівня пролактину в крові [18], який впливає на різноманітні процеси в організмі риб [17], у тому числі й на концентрацію клітин та іонний склад сперми. Для забезпечення цих процесів потрібна більша концентрація АТФ. Крім того, АТФ необхідна кожній клітині для регуляції її об'єму [12, 19]. Тому ми вважаємо, що з регуляторними процесами на рівні організму пов'язана і більша концентрація АТФ у сперматозоїдах, отриманих після стимуляції плідників сумішшю «Сурфагону» і «Метоклопраміду» порівняно з іншими препаратами. Сперматозоїду АТФ необхідна для підтримання рухливості, градієнта концентрацій іонів на мембрані [16] та кріорезистентності [20]. Показано, що при зниженні концентрації АТФ у спермі після кріоконсервування зменшується її здатність до запліднення [4]. Отже, після стимуляції плідників сумішшю «Сурфагону» і «Метоклопраміду» збільшення концентрації АТФ у спермі впливає на кріорезистентність, однак це ствердження потребує подальших досліджень. Ефективнішу дію суміші «Сурфагону» і «Метоклопраміду» порівняно з «Овопелем» можна пояснити більшим дозуванням «Метоклопраміду» у суміші, ніж у «Овопелі».

organism [14] including the cell concentration and sperm ion composition. To provide these processes higher ATP concentration is required. Moreover, ATP is necessary for each cell to regulate its volume [7, 16]. So, we suggest that higher ATP concentration in spermatozoa derived after stimulation of mature males with the mixture of Surfagon and Metoclopramide comparing with the other preparations is associated with the regulatory processes at the organismal level. A spermatozoon needs ATP to maintain the motility, the gradient of ion concentration on the membrane [11] and cryoresistance [18]. It was reported, that decreasing of ATP concentration in sperm following cryopreservation resulted in reduced fertilization ability [13]. Therefore, stimulation of mature males with the mixture of Surfagon and Metoclopramide results in the increase of ATP concentration in sperm and influences their cryoresistance, nevertheless this suggestion requires further study. More effective impact of the mixture of Surfagon and Metoclopramide if compared to Ovopel could be explained by higher dosage of Metoclopramide in the mixture if compared with Ovopel.

Conclusions

Stimulation of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*, Val. 1844) with the mixture of Surfagon and Metoclopramide resulted in obtaining a sperm with the highest ATP concentration and cell number if compared with Ovopel and pituitary homogenate. Thus, this type of stimulation could be recommended for cryopreservation and application in fish breeding.

Choice of optimal drugs, their dosage and proper period post hormonal stimulation would allow to enhance the spermatozoa cryoresistance. Of importance is the investigation of hormonal effect at the final stage



Висновки

У результаті стимуляції плідників білого товстолобика (*Hypophthalmichthys molitrix*, Val, 1844) «Сурфагоном» із «Метоклопрамідом» порівняно з «Овопелем» та гомогенатом гіпофіза була одержана сперма з найбільшою концентрацією клітин та АТФ, тому можна рекомендувати такий вид стимуляції плідників для кріоконсервування та використання в рибоводній практиці.

Підбір оптимальних препаратів, їх дозування та визначення періоду після гормональної стимуляції дозволять підвищити кріорезистентність сперматозоїдів. Важливим є вивчення впливу гормонів на завершальні етапи гаметогенезу. Наприклад, ще недостатньо вивчена роль пролактину в цьому процесі. Розуміння всіх механізмів гормональної регуляції репродуктивної системи дозволить отримувати статеві продукти найвищої якості та з високою кріорезистентністю.

Література

1. Белоус А.М., Гордиенко Е.А., Розанов Л.Ф. Биохимия мембран. Замораживание и криопротекция. – М.: Высш. шк., 1987. – 80 с.
2. Буцкий К.И., Пуговкин А.Ю. Изменение качества нативной и кріоконсервированной спермы белого толстолоба (*Hypophthalmichthys molitrix*) при различной гормональной стимуляции // Матеріали VI Міжнарод. іхтіолог. наук.-практ. конф. «Сучасні проблеми теоретичної та практичної іхтіології». – Тернопіль, 2013. – С. 44–47.
3. Копейка Е.Ф. Инструкция по низкотемпературной консервации спермы карпа. – М.: Изд-во ВНИПРХ, 1986. – 11 с.
4. Копейка Е.Ф., Черепанов В.В., Дзюба Б.Б. Анализ содержания АТФ и креатинфосфата в сперме карпа (*Cyprinus carpio*) до и после кріоконсервации // Проблемы кріобиологии. – 1997. – №4. – С. 41–45.
5. Прохорова М.И. Методы биохимических исследований: липидный и энергетический обмен. – Л.: Изд-во Ленинград. ун-та, 1982. – 272 с.
6. Пуговкин А.Ю., Копейка Е.Ф. Осмотическая резистентность сперматозоидов карпа *Cyprinus carpio* // Проблемы кріобиологии и кріомедицины. – 2013. – Т. 23, №2. – С. 190.
7. Пат. №83803, Україна, МПК G01N33/48 G01N15/14. Спосіб визначення якості сперми коропа / Е.Ф. Копейка, А.Ю. Пуговкін, К.І. Буцький. – № u201305510; заявл. 29.04.2013; опубл. 25.09.2013, Бюл. №18. – 4 с.
8. Alavi S.M., Hatef A., Mylonas C.C. et al. Sperm characteristics and androgens in *Acipenser ruthenus* after induction of spermiation by carp pituitary extract or GnRHa implants // Fish Physiol. Biochem. – 2012. – Vol. 38, №6. – P. 1655–1666.
9. Chen S. L., Liu X. T., Lu D. C. et al. Cryopreservation of spermatozoa of silver carp, common carp, blunt snout bream and grass carp // Acta Zoologica Sinica. – 1992. – Vol. 38, №4. – P. 413–424.
10. Ciereszko A. Chemical composition of seminal plasma and its physiological relationship with sperm motility, fertilizing capacity and cryopreservation success in fish // Fish Spermatology / Ed. by Alavi S.M.H. – Oxford: Alpha Science Ltd., 2007. – P. 215–240.
11. Ding F., Milley J.E., Rommens M. et al. Effect of hormone implantation on cryopreservation of Atlantic halibut (*Hippoglossus*

of hametogenesis, e. g. the role of prolactin is unclear. Understanding of entire mechanism of hormonal regulation in reproductive system would allow to obtain sexual products of highest quality and cryoresistance.

References

1. Alavi S.M., Hatef A., Mylonas C.C. et al. Sperm characteristics and androgens in *Acipenser ruthenus* after induction of spermiation by carp pituitary extract or GnRHa implants. Fish Physiology and Biochemistry 2012; 38(6): 1655–1666.
2. Belous A.M., Gordienko E.A., Rozanov L.F. Membrane biochemistry. Freezing and cryoprotection. Moscow: Visshaya Shkola; 1987.
3. Butskiy K.I., Puhovkin A.Y. Changing of fresh and cryopreserved sperm quality of white silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) after different hormonal stimulation: Proceedings of the VI International ichtiol scientific-practical conference 'Modern Problems of Theoretical and Practical Ichthyology'. Ternopil; 2013. p. 44–47.
4. Chen S.L., Liu X.T., Lu D.C. et al. Cryopreservation of spermatozoa of silver carp, common carp, blunt snout bream and grass carp. Acta Zoologica Sinica 1992; 38(4): 413–424.
5. Ciereszko A. Chemical composition of seminal plasma and its physiological relationship with sperm motility, fertilizing capacity and cryopreservation success in fish. In: Alavi S.M.H. et al., editors. Fish Spermatology, Oxford: Alpha Science Ltd; 2007. p. 215–240.
6. Ding F., Milley J.E., Rommens M. et al. Effect of hormone implantation on cryopreservation of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) sperm. Cryobiology 2012; 65(1): 51–55.
7. Florian L., Busch G.L., Ritter M. et al. Functional significance of cell volume regulatory mechanisms // Physiol Rev 1998; 78 (1): 247–306.
8. Hajirezaee S., Mojazi B., Mirvaghefi A., Mirvaghefi A. Fish milt quality and major factors influencing the milt quality parameters: A review. Afr J Biotechnol 2010; 9(54): 9148–9154.
9. Kayim M., Bozkurt Y., Ogretmen F. Comparing the Effectiveness of Ovopel and Carp Puritary Extract (CPE) on Artificial Spawning of Scaly Carp (*Cyprinus carpio*). J Anim Vet Adv 2010; 9(20): 2589–2592.
10. Kopeika E.F., Drokin S.I., Cherepnin V.A., et al. Experience in obtaining the high-quality of paddlefish sperm and its cryopreservation. Proceedings of the 1st International Workshop on the Biology of Fish Sperm; Vodnany; 2007. p. 48–49.
11. Kopeika E.F., Kopeika J.E. Variability of sperm quality after cryopreservation in fish. In: Alavi S.M.H. et al., editors. Fish spermatology. Oxford: Alpha Science Ltd; 2007. p. 347–396.
12. Kopeika E.F. Instruction of carp sperm low temperature conservation. Moscow: VNIPRH; 1986.
13. Kopeika E.F., Cherepanov V.V., Dzyuba B.B. Analysis of ATP and creatine phosphate content in carp (*Cyprinus carpio*) before and after cryopreservation. Problems of Cryobiology 1997; (4): 41–45.
14. Manzon L.A. The role of prolactin in fish osmoregulation: a review. Gen Comp Endocrinol 2002; 125(2): 291–310.
15. McCallum R.W., Sowers J.R., Hershman J.M., Sturdevant R.A.L. Metoclopramide stimulates prolactin secretion in man. J Clin Endocrinol Metab 1976; 42(6): 1148–1152.
16. Meryman H.T. Osmotic stress as a mechanism of freezing injury. Cryobiology 1971; 8(5): 489–500.
17. Kopeika E.F., Puhovkin A.Y., Butskiy K.I. Method of carp sperm quality determining. Patent of Ukraine 83803, G01N33/48 G01N15/14, u201305510. 2013 Sep25.
18. Perchec G., Jeulin C., Cosson J. et al. Relationship between sperm ATP content and motility of carp spermatozoa. J Cell Sci 1995; 108: 747–753.



- hippoglossus L.) sperm // *Cryobiology*. – 2012. – Vol. 65, №1. – P. 51–55.
12. Florian L., Busch G.L., Ritter M. et al. Functional significance of cell volume regulatory mechanisms // *Physiol. Rev.* – 1998. – Vol. 78, №1. – P. 247–306.
 13. Hajirezaee S., Mojazi B., Mirvaghefi A., Mirvaghefi A. Fish milt quality and major factors influencing the milt quality parameters: a review // *Afr. J. Biotechnol.* – 2010. – Vol. 9, №54. – P. 9148–9154.
 14. Kayim M., Bozkurt Y., Ogretmen F. Comparing the effectiveness of Ovopel and carp puritary extract (CPE) on artificial spawning of scaly carp (*Cyprinus carpio*) // *J. Anim. Vet. Adv.* – 2010. – Vol. 9, №20. – P. 2589–2592.
 15. Kopeika E.F., Drokin S.I., Cherepnin V.A. et al. Experience in obtaining the high-quality of paddlefish sperm and its cryopreservation // *The 1st International Workshop on the Biology of Fish Sperm: Abstract book.* – Vodnany, 2007. – P. 48–49.
 16. Kopeika E.F., Kopeika J.E. Variability of sperm quality after cryopreservation in fish // *Fish Spermatology* / Ed. by Alavi S.M.H. – Oxford: Alpha Science Ltd., 2007. – P. 347–396.
 17. Manzon L.A. The role of prolactin in fish osmoregulation: a review // *Gen. Comp. Endocrinol.* – 2002. – Vol. 125, №2. – P. 291–310.
 18. McCallum R.W., Sowers J.R., Hershman J.M., Sturdevant R.A.L. Metoclopramide stimulates prolactin secretion in man // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 1976. – Vol. 42, №6. – P. 1148–1152.
 19. Meryman H.T. Osmotic stress as a mechanism of freezing injury // *Cryobiology*. – 1971. – Vol. 8, №5. – P. 489–500.
 20. Perchee G., Jeulin C., Cosson J. et al. Relationship between sperm ATP content and motility of carp spermatozoa // *J. Cell Sci.* – 1995. – Vol. 108. – P. 747–753.
 21. Seifi T., Imanpoor M.R., Golpour A. The effect of different hormonal treatments on semen quality parameters in cultured and wild carp // *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences.* – 2011. – Vol. 11, №4. – P. 595–602.
 22. Zarski D., Kucharczyk D., Targonska K. et al. Application of Ovopel and Ovaprim and their combinations in controlled reproduction of two reophilic cyprinid fish species // *Polish Journal of Natural Sciences.* – 2009. – Vol. 24, №4. – P. 235–244.
 19. Prokhorova M.I. *Methods of biochemical research: energy and lipid metabolism.* Leningrad: Leningrad University Press; 1982.
 20. Puhovkin A.Y., Kopeika E.F. Osmotic resistance of carp *Cyprinus carpio* spermatozoa. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine* 2013; 23(2): 190.
 21. Seifi T., Imanpoor M.R., Golpour A. The effect of different hormonal treatments on semen quality parameters in cultured and wild carp. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 2011; 11(4): 595–602.
 22. Zarski D., Kucharczyk D., Targonska K. et al. Application of Ovopel and Ovaprim and their combinations in controlled reproduction of two reophilic cyprinid fish species. *Polish Journal of Natural Sciences* 2009; 24(4): 235–244.

