

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА
НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ ВИСОКИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Завідувач кафедри молекулярної біотехнології та біоінформатики
к. б. н. Олексій Юрійович Нипорко
Протокол № _____ засідання кафедри
від “ _____ ” _____ 20__ р.

**ВПРОВАДЖЕННЯ ТА ОПТИМІЗАЦІЯ ПРОТОКОЛІВ
ЗАМОРОЖУВАННЯ СПЕРМИ РАЙДУЖНОЇ ФОРЕЛІ
(*ONCORHYNCHUS MYKISS*, WALBAUM) З ОСОБЛИВИМ АКЦЕНТОМ
НА ВПЛИВ РОЗМОРОЖЕНОГО МОЛОЧКА НА УСПІШНІСТЬ
ЗАПЛІДНЕННЯ ІКРИ**

Випускна кваліфікаційна робота магістра
студентки спеціальності 162
Біотехнології та біоінженерія
ОП «Високі технології (Біотехнологія)»

Голуб Еліни Олегівни

Науковий керівник від кафедри
завідувач кафедри молекулярної
біотехнології та біоінформатики
к. б. н., доцент

Нипорко Олексій Юрійович

Робота виконана у компанії Viviers de Sarrance під керівництвом директора з дослідження та розробок PhD **Емілієна Сегре**.

Оцінка захисту роботи

Київ – 2024 р.

АНОТАЦІЯ

Голуб Е. О. Впровадження та оптимізація протоколів заморожування сперми райдужної форелі (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) з особливим акцентом на вплив розмороженого молочка на успішність запліднення ікри. – Випускна кваліфікаційна робота магістра за спеціальністю 162 Біотехнології та біоінженерія ОП «Високі технології (Біотехнологія)».

Представлено результати порівняльного аналізу свіжого та кріоконсервованого молочка райдужної форелі (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792) з фермерського господарства Viviers de Sarrance, що знаходиться у муніципалітеті Сарранс, Атлантичні Піренеї, Нова Аквітанія, Франція, та дослідження впливу різних концентрацій сперматозоїдів на успішність запліднення з метою оцінки біотехнологічного потенціалу використання кріоконсервованого молочка та доцільності впровадження його використання у виробничих протоколах. Проведено порівняльний аналіз концентрації та рухливості сперматозоїдів до та після кріоконсервації; показників запліднення, виживання на стадії вічка та вилуплення ікри, заплідненої свіжим або розмороженим молочком; виявлення впливу різних концентрацій на успішність запліднення (порівняння показників успішності запліднення, виживання на стадії вічка та вилуплення); дослідження можливості використання кріоконсервованого молочка у виробничих протоколах, що, як відомо, дозволяє оптимізувати використання кількості молочка форелі, мати молочко належної якості на виробництві незалежно від сезону та використовувати його в рамках програм селекції та розмноження. Отримані результати можуть бути використані для подальших досліджень, спрямованих на підтвердження ефективності протоколів, використаних у дослідженні, у великомасштабному виробництві та пошуках оптимальної концентрації для запліднення ікри без шкоди для рівня успішності запліднення ікри.

Проведені експерименти включали такі етапи: вилучення статевих залоз, екстракція молочка, визначення концентрації сперми та рухливості

сперматозоїдів, розведення сперми до цільової концентрації, кріоконсервація, запліднення ікри, тест на успішність запліднення та відслідковування смертності 3 рази на тиждень з усуненням мертвих ікринок.

Проаналізовано концентрацію та рухливість сперматозоїдів, рівень успішності запліднення, виживання на стадії вічка та вилуплення. Встановлено, що нові протоколи запліднення для форелі є більш ефективними, ніж ті, що описані в літературі, адже ті не були адаптовані для форелі. Не було виявлено відмінності в успішності запліднення ікри свіжим та кріоконсервованим молочком. Коли сперматозоїди заморожуються, а потім розморожуються, спостерігається зменшення рухливості, однак нижча рухливість кріоконсервованої сперми жодним чином не впливає на високу успішність запліднення. Концентрації від 1,5 до 3 мільйонів сперматозоїдів на яйцеклітину показали найкращі результати запліднення. Рівень виживання при вилупленні був вищим за 80% у кожному зразку.

Отже, кріоконсервацію молочка форелі можна оцінити як ефективний метод біотехнологічного застосування у виробництві та рекомендувати проведення подальших досліджень для підтвердження ефективності використаних протоколів у широкомасштабному виробництві з подальшим вибором оптимальної концентрації сперми, адже результати є дуже обнадійливими для впровадження у виробничі протоколи.

Ключові слова: райдужна форель (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792), кріоконсервація, заморожування/розморожування, сперма форелі, якість сперми, запліднення.

ABSTRACT

Holub E. O. Implementation and optimization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) semen congelation protocols with a special focus on impact of unfrozen milt on eggs' fertilization success. – Master's final qualification work on specialty 162 Biotechnology and bioengineering OP "High technologies (Biotechnology)".

In this study, the results of comparative analysis of fresh and cryopreserved sperm of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792) from the fish farm Viviers de Sarrance, located in Sarrance, Pyrénées-Atlantiques, Nouvelle-Aquitaine, France, and study of the impact of different sperm concentrations on the fertilization success are presented to investigate the biotechnological potential of usage and the feasibility of implementing of cryopreserved milt in production protocols. Comparative analysis of sperm concentration and motility before and after cryopreservation was presented; as well as fertilization rates, survival rates at the eyed stage and hatching rates of eggs fertilized with fresh and thawed milt were compared; the influence of different concentrations on fertilization success (comparison of fertilization rates, survival at the eyed stage and hatching rates) was investigated; possibility of using cryopreserved sperm in production protocols was explored, which is known to optimize the use of the quantity of trout milt, to have milt of appropriate quality in production regardless of the season and to use it in selection and multiplication programs. These results can guide further studies aimed at confirming the efficiency of the protocols used in this study for large-scale production, as well as determining the optimal sperm concentration for fertilizing eggs without compromising fertilization success.

The experiments involved the following steps: stripping of gonads, milt extraction, determination of sperm concentration and sperm motility, dilution of sperm to the target concentration, cryopreservation, fertilization of eggs, fertilization test and mortality tracking of eggs three times a week with removal of dead eggs.

Concentration and motility of spermatozoa, fertilization rate, survival and hatching rates were analyzed in this study. New fertilization protocols for trout have been found to be more effective than previously described in the literature, as they have not been adapted for trout. No difference in the fertilization success of eggs fertilized with fresh and cryopreserved milt was observed. When spermatozoids are frozen, then unfrozen, a drop of motility rate is observed, however, lower motility of cryopreserved sperm does not make any negative impact on high fertilization success. Concentrations range from 1.5 to 3 millions sperm cells/egg performed with the best fertilization results. Survival rates were higher than 80% in each sample.

Thus, cryopreservation of trout sperm can be evaluated as effective biotechnological method for use in production. Further studies are recommended to confirm the efficiency of the used protocols in large-scale production and to determine the optimal sperm concentration. These results provide strong encouragement for the implementation of cryopreservation in production protocols.

Key words: rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792), cryopreservation, freezing/thawing, trout sperm, sperm quality, fertilization.

ПОДЯКА

Висловлюю подяку Фредеріку та Йоану Кашелу за надану можливість виконати цю роботу в сонячній Франції, в прекрасному регіоні у неймовірних Піренейських горах. За те, що довірили працювати на своєму господарстві та забезпечили всі умови для отримання найціннішого досвіду. Професіоналізм у вашій справі щодня надихав виконувати роботу найкращим чином та прагнути до більшого.

Дякую найкращому керівнику Емілієну Сегре за проявлене терпіння, відповіді на всі питання, детальні пояснення, допомогу, наполегливість у досягненні найкращих результатів, за знання, досвід та навички, якими ви щедро ділились. Висловлюю щирю вдячність за приділений час, відданість своїй справі, довіру та гостинність, а також за підтримку на всіх етапах цієї роботи, настанови, зауваження та результат.

Окрема вдячність всьому колективу Viviers de Sarrance за вашу важку працю, допомогу та підтримку.

Подяка команді Cryogenetics за новий досвід, чудову співпрацю та натхнення для нових звершень.

Дякую моєму батькові за місту Нововолинськ за моральну підтримку.

ЗМІСТ

ВСТУП	9
РОЗДІЛ 1. ЗАГАЛЬНИЙ ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	11
1.1. Репродуктивна стратегія та статевий цикл	11
1.1.1. Цикл формування гамет	12
1.1.2. Поділ гоніальних клітин.....	14
1.1.3. Овуляція.....	16
1.1.4. Розвиток	16
1.2. Якість сперми риби.....	22
1.2.1. Характеристики сперми	22
1.2.2. Рухливість і концентрація сперматозоїдів як основні показники якості сперми	23
1.2.3. Фактори, що впливають на якість сперми	26
РОЗДІЛ 2. ВИКОРИСТАННЯ РОЗМОРОЖЕНОГО МОЛОЧКА ДЛЯ ВІДТВОРЕННЯ ФОРЕЛІ В УМОВАХ ВИРОБНИЦТВА	29
2.1. Вступ	29
2.1.1. Використання розмороженого молочка в загальному процесі аквакультури.....	29
2.1.2. Використання розмороженого молочка лососевих та форелі на сьогодні.....	30
2.1.3. Інтерес у виробничому контексті.....	31
2.2. Попередній експеримент.....	31
2.3. Матеріали і методи	33
2.3.1. Екстракція гонад, підготовка молочка та кріоконсервація.....	33
2.3.2. Проведення експериментів з розморожування та запліднення	36
2.3.3. Обробка даних.....	37
2.4. Результати	38
2.4.1. Концентрація та рухливість сперматозоїдів	38
2.4.2. Запліднення	40

2.4.3. Рівень виживання.....	41
2.5. Висновки до розділу 2	43
РОЗДІЛ 3. ПОКРАЩЕННЯ ТА ОПТИМІЗАЦІЯ ВИКОРИСТАННЯ СВІЖОГО ТА РОЗМОРОЖЕНОГО МОЛОЧКА ДЛЯ ЗАПЛІДНЕННЯ ООЦИТІВ	44
3.1. Вступ	44
3.1.1. Контроль концентрації сперми.....	44
3.1.2. Контроль рухливості сперми	45
3.1.3. Процес запліднення на даний час	45
3.1.4. Робота, що проводиться для оптимізації якості сперми та кількості молочка	46
3.2. Попередній експеримент.....	48
3.3. Матеріали і методи	50
3.3.1. Екстракція гонад, підготовка молочка та кріоконсервація	50
3.3.2. Проведення експериментів з розморожування та запліднення	51
3.3.3. Обробка даних.....	53
3.4. Результати.....	53
3.4.1. Результати запліднення «Кріо 2»	53
3.4.2. Рівень виживання до вилуплення «Кріо 2».....	55
3.4.3. Результати запліднення «Кріо 3»	56
3.4.4. Рівень виживання до вилуплення «Кріо 3».....	57
3.5. Висновки до розділу 3	58
ВИСНОВКИ.....	60
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	62

ВСТУП

Кріоконсервація сперми риб широко застосовується в аквакультурі для синхронізації штучного відтворення, ефективного використання сперми (особливо під час сезонної нестачі самців та/або самок) та для підтримки генетичної мінливості плідників.

Рибні господарства потребують сперму хорошої якості поза періодом нересту протягом тривалого періоду часу. Кріоконсервація сперми може задовольнити цю потребу та може бути використана для оптимізації та використання генетичних надбань в рамках програм селекції або розмноження. Згідно з попередніми дослідженнями, процес заморожування та розморожування викликає певні клітинні пошкодження у сперматозоїдах райдужної форелі (*Oncorhynchus mykiss*). Значне зниження рухливості сперматозоїдів спостерігається після розморожування за старими протоколами. Згідно з останніми дослідженнями, кріоконсервоване молочко не має негативного впливу на показники запліднення. Незважаючи на наявність протоколів кріоконсервації сперми риб, протоколи саме для райдужної форелі не були протестовані. Таким чином, першочерговим завданням для впровадження кріоконсервації на рибних господарствах залишається оптимізація протоколів запліднення для більш оптимального використання сперми форелі.

При розведенні самців райдужної форелі виникають труднощі, а саме: підвищена смертність після 24 місяців життя, потреба у використанні гормонів (метилтестостерон для інверсії статі), що викликає етичні суперечки та шкодить довкіллю, витрати ресурсів, коштів та часу. Цим обумовлена актуальність теми, адже кріоконсервація дозволяє уникнути вказаних проблем та заощаджувати природні та виробничі ресурси оптимальним використанням молочка у виробництві.

Ця потреба змусила Viviers de Sarrance розпочати велику дослідницьку роботу з метою впровадження використання розмороженого молочка у

виробничі протоколи. У цьому контексті кілька учасників, таких як INRAE (Французький агрономічний науково-дослідний інститут), IMV Technologies© (французька компанія, що спеціалізується на біотехнологіях репродукції тварин) та Cryogenetics© (норвезька компанія, що спеціалізується на протоколах репродукції риби з використанням свіжого або розмороженого молочка), зробили свій внесок у це досягнення.

Мета: Порівняльне дослідження якості свіжої та розмороженої сперми райдужної форелі (*Oncorhynchus mykiss*); дослідження впливу кріоконсервації на здатність сперматозоїдів успішно запліднювати ікру та на розвиток нормального ембріона; виявлення впливу різних концентрацій сперми на успішність запліднення для подальшої розробки підходів використання кріоконсервації в аквакультурі та впровадження нових протоколів у виробництво.

Завдання:

1. Провести порівняльний аналіз концентрації та рухливості сперми райдужної форелі до та після кріоконсервації;
2. Дослідження показників запліднення, виживання на стадії вічка та вилуплення ікри, заплідненої свіжим або розмороженим молочком;
3. Виявлення впливу різних концентрацій на успішність запліднення;
4. Вивчення можливості використання кріоконсервованого молочка у виробничих протоколах.

РОЗДІЛ 1. ЗАГАЛЬНИЙ ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Репродуктивна стратегія та статевий цикл

Райдужна форель (*Oncorhynchus Mykiss*, Walbaum, 1792) — кісткова риба родини лососевих. Гонохоричні особини не змінюють стать протягом свого життєвого циклу. Самки досягають статевої зрілості у віці 24 або 36 місяців (перший нерест) залежно від генетичного штаму. Райдужна форель — один із рідкісних, якщо не єдиний вид роду *Oncorhynchus*, здатний протягом життя здійснювати кілька послідовних циклів розмноження. Репродуктивний цикл у природних умовах триває 1 рік, але його тривалість може бути скорочена або подовжена під фотоперіодичним контролем [1], [2].

Таблиця 1.1 – Репродуктивний вік та періоди райдужної форелі [3].

Species	Sexual maturation (years)				Reproductive period (years)	
	In nature		Within farm conditions		Within farm conditions	
	Females	Males	Females	Males	Females	Males
Rainbow trout	3–4	2–3	2–3	(1)–2	4–6	6–7

Райдужна форель починає свій репродуктивний цикл, коли досягає статевої зрілості: 2 роки для самців і 2-3 роки для самок [4]. При розмноженні форель чутлива до високих температур, температура повинна бути не вище 14°C. Залежно від генетичних штамів, розмноження при природному фотоперіоді відбувається з жовтня (осінній штаб) до березня (весняний штаб). Самки зазвичай відкладають 2000 яєць/кг маси тіла.

На швидкість розмноження райдужної форелі головним чином впливає фотоперіод, до якого чутливі нерестовики. Температура води та стрес від навколишнього середовища також можуть мати вплив (більш обмежений) на тривалість різних фаз статевого циклу. Зміни фотоперіоду та інших

"інформативних" параметрів середовища інтегруються в центральну нервову систему батьків. Мозок контролює репродуктивний цикл, впливаючи на гіпофіз за допомогою нейропептидів і нейромедіаторів [5], [6], [7], [8]. Регенерація яєчників і ранній вітелогенез стимулюються довгим або збільшеним світловим днем, тоді як синхронізація пізніх стадій дозрівання ооцитів і овуляції залежить від зменшеного або короткого фотоперіоду. [9], [10].

Піддаючи маткове поголів'я впливу контрольованого фотоперіоду, рибоводи тепер можуть наблизити або віддалити дату нересту відносно природного фотоперіоду [11]. Застосовуючи контрольований фотоперіод до кількох поколінь нерестовиків, рибні ферми можуть виробляти зрілі гонади протягом цілого року.

1.1.1. Цикл формування гамет

Яєчник містить як ооцити, що беруть участь у мейотичних поділах, які синхронно овулюють у черевній порожнині, так і недиференційовані оогонії та первинні ооцити, які продукують наступні ооцити. Йдеться про синхронізований гаметогенез за групами. Самка виробляє велику кількість гігантських ікринок (в середньому від 3 до 5 мм в діаметрі у райдужної форелі, тобто в 20 разів більше, ніж вторинний ооцит людини) [12], з виходом від 2000 до 3000 яєць/кг живої маси маткового поголів'я за хороших умов [13].

У райдужної форелі в природних умовах гаметогенез є щорічним і відбувається в кілька етапів:

- Проліферація та диференціація оогонії;
- Ріст первинного ооцита, превітелогенез;
- Вітелогенез, відкладення ліпопротеїдного жовтка, утворення променевої зони;
- Дозрівання ооцитів;

- Овуляція.

Результатом оогенезу у самки є вивільнення гамет, заблокованої в метафазі II другого поділу мейозу, ооцита II, який зазвичай називають яйцем, а часто яйцеклітиною (неправильна назва, оскільки яйцеклітина є продуктом запліднення ооцита). Варто зазначити, що одомашнення призвело до втрати здатності до відкладання ікри у райдужної форелі, яку розводять в умовах фермерських господарств. Ооцити, що потрапили в черевну порожнину, на фермах вилучають за допомогою масажу черевної порожнини для вилучення та отримання гамет через сечостатевої сосочок.

Діаметр ооцита становить від 3 до 7 мм [14]. Під час овуляції їх зазвичай називають яйцеклітинами ще до формального запліднення. Яйцеклітини, вироблені в Саррансі, мають діаметр від 4,5 до 6 мм. Після запліднення ікри самцем цикл ембріонального розвитку триває 300 градусоднів до моменту вилуплення. Це найкоротший цикл серед усіх лососевих [15]. Для досягнення повної резорбції жовткового мішка необхідна додаткова тривалість приблизно 200 градусоднів. Тривалість інкубаційного циклу можна збільшити, регулюючи температуру води [16].



Рисунок 1.1 та 1.2 – Отримання ікри.

1.1.2. Поділ гоніальних клітин

Оогонії, диплоїдні первинні статеві клітини, що диференціюються із соматичних клітин на ембріональних стадіях і які формують майбутні оцити, спочатку проходять фазу поділу. Йдеться про гоніальний поділ, що відбувається в яєчнику. Це явище дозволяє поновлювати запас ооцитів, що беруть участь у мейозі [17], [18].

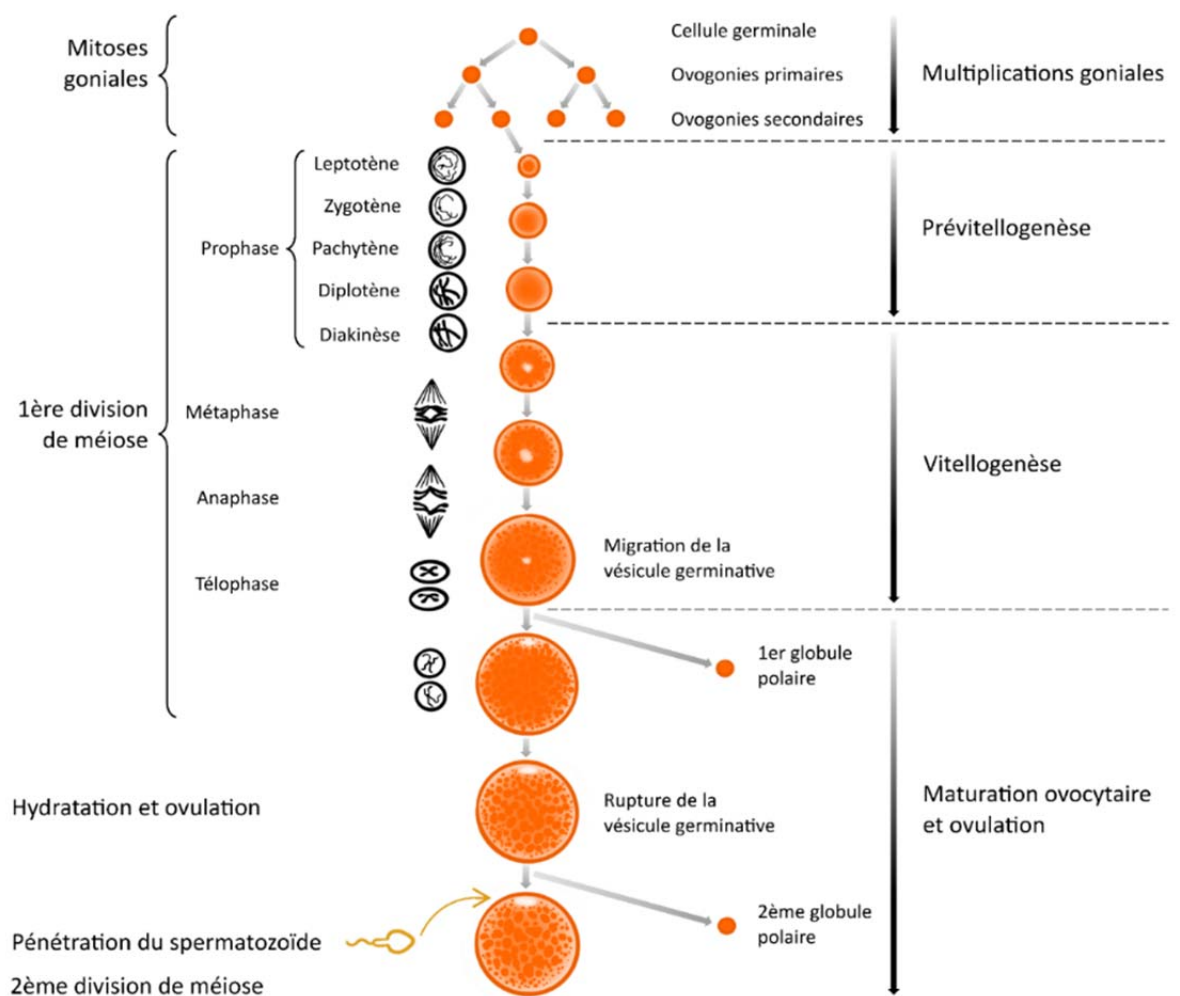


Рисунок 1.3 – Загальна діаграма процесу оогенезу.

Початок вітелогенезу відзначається здійсненням першого поділу мейозу і подвоєнням кількості хромосом. Йдеться вже не про оогонію, а про

ооцит I. Ця стадія завершується деконденсацією генетичного матеріалу всередині зародкового пухирця та збільшенням об'єму ооцита внаслідок накопичення численних клітинних органел [19]. Саме в цей період відбувається диференціація клітин фолікула яєчника та формування оболонок, які будуть оточувати ооцит, що виявляється за профілями експресії генів на момент початку мейозу [20], [21]. Після цих фаз ядерної підготовки та фолікулярної диференціації ооцит бере участь у вітеллогенезі, під час якого жовток накопичується всередині ооцита. Позаклітинна оболонка ооцита утворюється в результаті синтезу ліпопротеїнів у зоні блискучої оболонки (оболонка, що контактує з вітелиноюю мембраною ооцита). Ця оболонка потім буде називатися хоріоном [7], [8], [22] і буде важливою для захисту яйцеклітини під час овуляції та запобігання поліспермії. Під час вітеллогенезу (від 3 до 9 місяців, залежно від фотоперіодичних циклів) діаметр ооцита збільшується з 300-400 мкм до понад 2 мм.

На цьому етапі ооцит знаходиться в метафазі першого поділу мейозу і має всі резерви, необхідні для правильного розвитку майбутнього ембріона. Він завжди пов'язаний з гранульозою клітинними з'єднаннями, а його зародковий пухирець знаходиться в центральному положенні. Наприкінці вітеллогенезу відновлюється мейоз, і ооцит запускає механізми дозрівання яйцеклітини. Зародковий пухирець, що містить генетичний матеріал ооцита, поступово мігрує до периферії ооцита і може спостерігатися під бінокулярним мікроскопом. Під час виділення першого полярного тільця (зменшення кількості хромосом до $2n$) ядерна мембрана зникає, спричиняючи розрив зародкового пухирця. Ооцит вступає в метафазу другого поділу мейозу. Спостерігається зміна зовнішнього вигляду ооцита, який стає напівпрозорим і всередині якого з'являється мережа ліпідних крапельок. Ооцит стає гідратованим, а його об'єм збільшується [12], [23], [24], [25], [26], [8], [18]. Результатом цього етапу є отримання зрілої,

гідратованої яйцеклітини, яка набула необхідних якостей для овуляції, запліднення та розвитку в життєздатного малька без вад розвитку.

1.1.3. Овуляція

Після дозрівання і гідратації ооцити вивільняються з фолікулярних тканин у черевну порожнину: це явище і є овуляцією. Овуляція відбувається між 48 і 96 годинами при температурі 10-13°C після початку дозрівання [27], [28] і триває ще кілька годин. Деякі дослідження показують незадовільні результати запліднення, коли запліднення досягається відразу після овуляції [29]. Ці спостереження свідчать про те, що механізми дозрівання тривають ще кілька годин після овуляції. Таким чином, ці два явища (остаточне дозрівання ооцитів і овуляція) можуть накладатися в часі.

Отримана яйцеклітина є високодиференційованою тваринною клітиною, заблокованою в метафазі II другого поділу мейозу, що містить звичайні клітинні органели, але також має численні особливості, пов'язані з виконуваними функціями. Її будова подібна до відновлення мейозу, за винятком зародкового пухирця, який розірвався під час виходу першого полярного тільця. На цьому етапі перивітеліновий простір (простір між вітеліновою мембраною і хоріоном) зазвичай не видно неозброєним оком, а ліпідна сітка складається з великої кількості дуже дрібних крапельок, що робить розрізнення дуже складним.

1.1.4. Розвиток

Яйцеклітина активується при контакті з водою, незалежно від того, запліднена вона чи ні, і піднімає напівпрозору білу шкаралупу, променисту зону (*zona radiata*) [30], яка несе чітко виражений мікропіле. Після того, як сперматозоїд потрапляє в яйцеклітину, і перивітеліновий простір заповнюється рідиною, цитоплазма поступово збирається у високий пагорб

на вершині жовткової сфери. Цей процес називається біполярним диференціюванням [31].

Під час зовнішнього запліднення сперматозоїд потрапляє в яйцеклітину через мікропіле в хоріоні. Ця захисна оболонка оточує жовткову масу та її вітелінову мембрану. Дробіння, в якому бере участь лише невелика частина всієї яйцеклітини, є меробластичним і дискоїдним. Зародковий диск розщеплюється і зрештою поглинає відносно неушкоджений жовток. Цей диск підтримується в дорсальному положенні скупченням ліпідних крапель на поверхні жовтка. Вегетативний полюс виділяється на поверхні жовтка на 180 градусів від зародкового диска через 5-6 годин після запліднення (залежить від температури) [32].

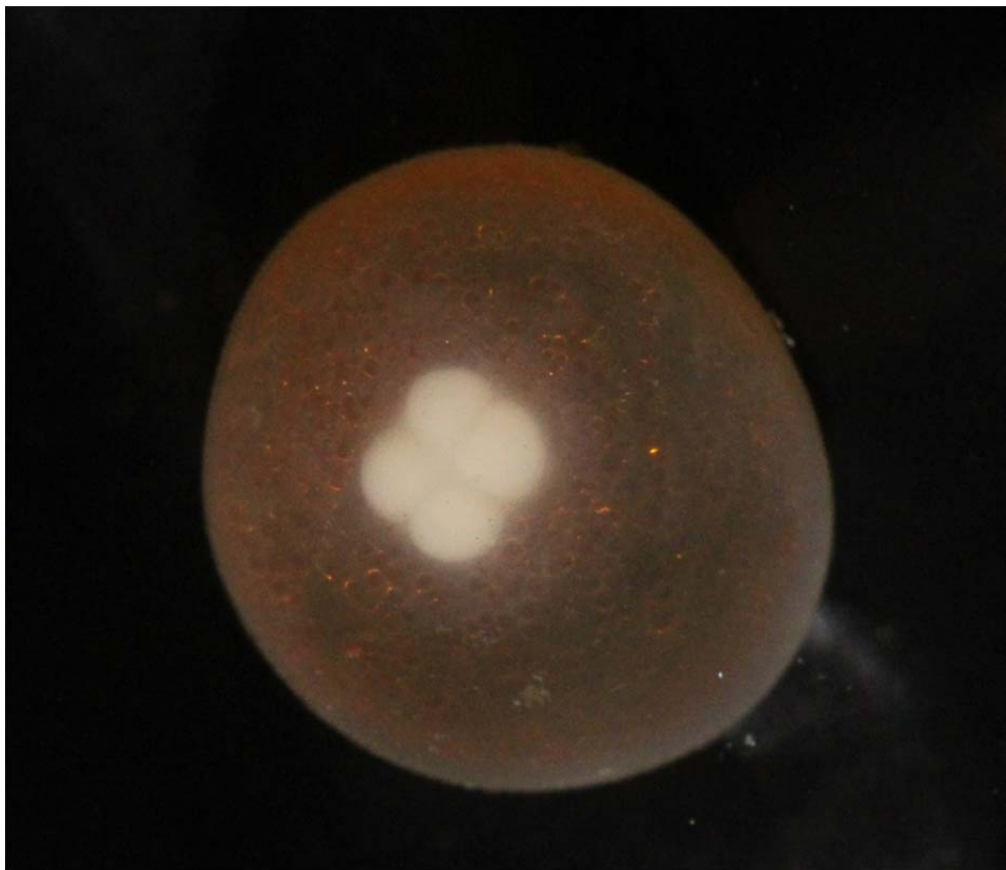


Рисунок 1.4 – Запліднена ікринка на чотиріклітинній стадії 12 годин після запліднення при інкубації при 11 °С.

Перший поділ після запліднення ділить зародковий диск порівну. Потім з'являється другий поділ, або чотиріклітинна стадія. Площина цього поділу перпендикулярна до площини початкового поділу.

Таблиця 1.2 – Час інкубації, необхідний для досягнення видимого поділу на 4 клітини залежно від температури.

Item	Accumulated incubation temperature (degrees-hour)	Hours at 5 C
Salmon (<i>Salmo salar</i>)	150-200	30-40
Rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	75-100	15-20

Вісім однакових клітин зазвичай з'являються через 2 години після стадії чотирьох клітин, під час третього дроблення, яке відбувається паралельно першому.



Рисунок 1.5 – Запліднена ікринка на восьмиклітинній стадії 15 годин після запліднення при інкубації при 11 °С.

Незабаром клітини піднімаються зі сплющеного положення, і з'являється порожнина, заповнена рідиною, або бластоцель. Бластомери набувають квадратної форми, розташовуючись у 4 ряди по 4 клітини в кожному, загалом 16 клітин. П'яте дроблення може відбутися в широкому діапазоні часу, що минув. Останній помітний поділ дає 64 клітини. Таким чином, більшість ембріонів стають бластодермами в перший день життя.

В одному з досліджень, яке проводилося при температурі 12°C, зразки, що розглядалися на предметному склі, мали від 100 до 150 клітин у зародковому диску, коли їм було 24 години від народження [32]. У період від 30 до 48 годин бластодерма не збільшується в діаметрі, але клітини поступово зменшуються і стають більш численними. Протягом 2 діб вони складаються в три шари. Потім через 56 годин бластула сплющується, поширюючись на поверхню жовтка. Через три дні після запліднення ембріон має діаметр приблизно 2 міліметри. Через 4 дні під ембріональним щитком з'являється ентодерма, а незабаром після цього видно зародкове кільце. На дорсальній губі бластопора видно нервовий кіль, який стає більш помітним через 5 днів, коли жовток розростається. Незабаром стає видно зачаток зорового нерва, що виходить з ектодерми нервової складки або кіля. У віці 5 днів плюс 21 година у ембріона, що розвивається, присутні від 17 до 24 сомітів мезодермального походження. У цей час також присутні слухові пухирці. Губа бластопора швидко просувається, утворюючи жовткову пробку за 6 днів. Коли бластопор дозріває протягом одного тижня, можна розрізнити кришталіки ока, передній мозок, зорові частки, мозочок і довгастий мозок. Вони, як і слухові пухирці, мають ектодермальне походження. Через 8 днів ембріон має 30 сомітів на додаток до зачатків грудних плавців. До цього часу хвостовий бугорок звільнився від зародкового кільця. Нюхові частки головного мозку стають очевидними через 9 днів, коли ембріон має довжину 4,5 міліметра і повний набір з 60 сомітів. У цей момент клітини мезенхіми

формують складові крові в ділянках жовткового мішка, прилеглих до тіла ембріона. Рухи ембріона, що складаються в основному з помахів хвоста, є міогенними або спонтанними в самих сомітах. Серце, що б'ється, мігрує зі свого колишнього положення спереду голови і тепер знаходиться вентрально від зябрових зачатків у 10-денному віці.

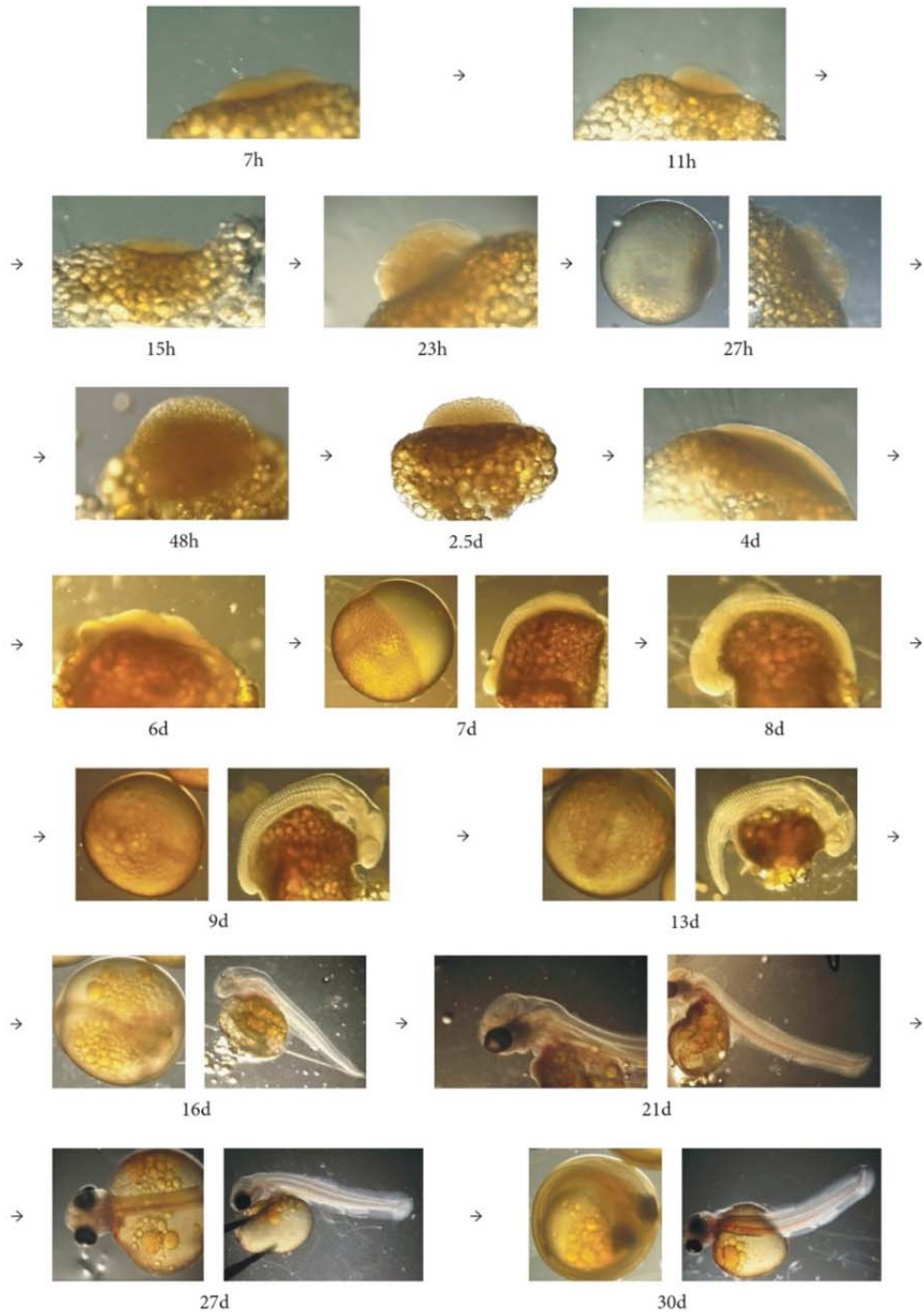


Рисунок 1.6 – Стадії розвитку райдужної форелі при 10°C [33].

На дванадцятий день пігментація очей робить їх видимими крізь хоріон. Наступного дня стають помітними зябра. Носові кістки формуються впродовж 2 тижнів. Через 20 днів спинний плавець перевищує висоту плавникової складки, а тіло ембріона виглядає набагато темнішим, оскільки вкрите безліччю меланофорів. За день до вилуплення хвостовий плавець майже торкається голови. В області голови і передньої третини жовткового мішка присутні вивідні залози, але їх нелегко помітити. Пік інкубаційної активності, вирішальний момент для молодих риб, припадає на 23-й день. Коли ферменти для вилуплення послаблюють хоріон, під час руху тіла личинки відбувається розрив оболонки. Поки жовтковий мішок не зменшиться в розмірах, значна частина дихального обміну здійснюється за рахунок судинної оболонки жовтка [32].

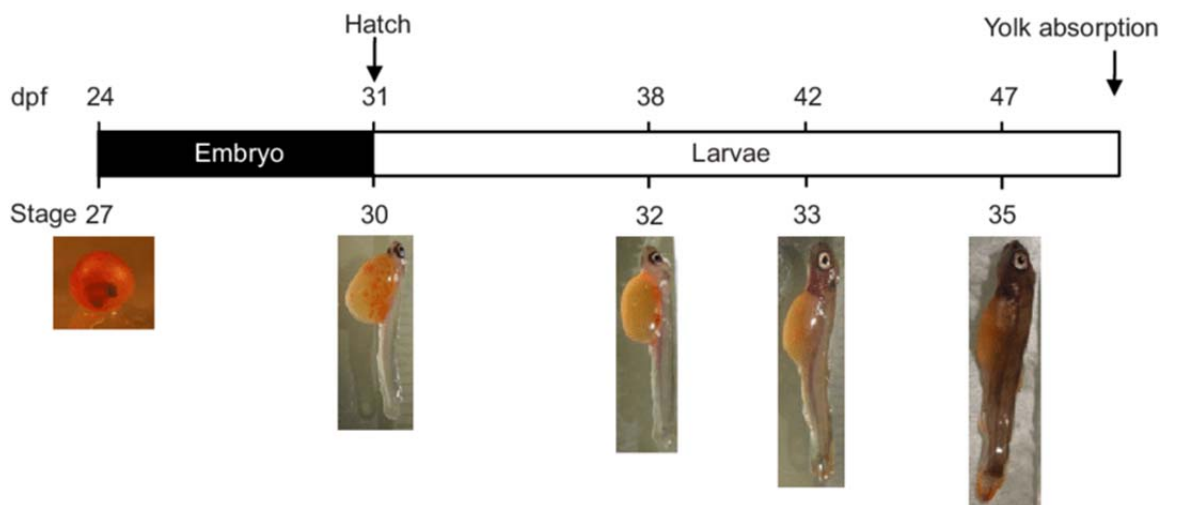


Рисунок 1.7 – Хронологія в днях після запліднення (dpf) ранньої стадії розвитку райдужної форелі за умов нормоксії (10°C) [34].

У цьому дослідженні відстеження смертності на описаних вище етапах було використано як маркер якості ікри та успішності запліднення.

1.2. Якість сперми риби

1.2.1. Характеристики сперми

Плазматична мембрана головки сперматозоїда щільно перекриває ядро, і між плазматичною мембраною і ядром залишається лише тонкий цитоплазматичний шар. На рівні серединної частини, деяка складчастість плазматичної мембрани вздовж кореня аксонемі призводить до накладання шарів мембрани. У видів родини лососевих плазматична мембрана, що оточує аксонему, має парні бічні розширення, що нагадують спіралеподібний плавник, вздовж усього хвоста [35]. Плазматична мембрана сперматозоїдів відіграє важливу роль в активації руху. Сприйняття іонних змін, відповідальних за початок биття джгутиків при вивільненні сперматозоїда у воду, відбувається через цю мембрану. Оскільки сперматозоїди не несуть акросоми в кісткових риб, плазматична мембрана сперматозоїдів також є ключовим компонентом злиття гамет, і деякі компоненти були описані у райдужної форелі: GM3, гангліозид, локалізований у голівці сперматозоїда, бере участь у зв'язуванні сперматозоїдів з яйцеклітинами [36]. Було також показано, що деякі нехарактеризовані білки, локалізовані в області голови, беруть участь у заплідненні [37]. На біофізичному рівні мембранні ліпіди визначають плинність мембрани, тоді як і білки, і ліпіди сприяють загальній проникності для води та іонів. Подовжене ядро має інвагінацію, глибина якої становить близько третини довжини ядра [38]. Ядро райдужної форелі містить як протаміни, так і гістони [39], [40].

Сім'яна рідина має унікальний склад органічних і неорганічних компонентів мінералів (калій, натрій, магній, кальцій, хлорид), рН, осмоляльність, білки, глюкоза і тригліцериди - всі вони, як виявляється, відіграють певну роль у якості сперми [41], [42], [43], [44], [45]. Рухливість і щільність сперматозоїдів визначають здатність сперматозоїдів до

запліднення і часто використовуються для оцінки якості молочка [46], [47], [48].

1.2.2. Рухливість і концентрація сперматозоїдів як основні показники якості сперми

Якість сперми можна визначити її здатністю успішно запліднювати яйцеклітину і згодом забезпечити розвиток нормального ембріона.



Рисунок 1.8 – Маркери якості сперми.

У самців кількість сперматозоїдів (наприклад, об'єм і концентрація) і якість (наприклад, рухливість сперматозоїдів, рН сім'яної плазми, склад і

стабільність мембрани та цілісність ДНК) можна визначати здатністю до запліднення і репродуктивний успіх як при природному, так і при штучному нересті.

pH насінневої плазми, осмоляльність і склад (іони, ліпіди, білок), а також ферментативна і протеолітична активність є специфічними біомаркерами, які впливають на дозрівання сперматозоїдів і пов'язані зі здатністю сперматозоїдів до запліднення яйцеклітин [49].

Концентрація та рухливість сперматозоїдів є ключовими факторами успіху запліднення. Концентрація сперматозоїдів – це кількість сперматозоїдів на мілілітр молочка. Вона визначає кількість сперматозоїдів у безпосередньому оточенні незаплідненої яйцеклітини під час процесу запліднення. Оптимальна кількість сперматозоїдів збільшує ймовірність запліднення яйцеклітини.

Існують різні фактори, на які можна впливати, змінюючи виробництво сперми (об'єм або концентрацію сперматозоїдів). Репродуктивні показники самців можна підвищити за допомогою гормональної терапії, яка використовується для стимуляції сперматогенезу в інкубаторній практиці. Ефект гормонального лікування залежить від типу гормону, дози введення та інших факторів, таких як температура, при якій утримувалися самці після гормонального лікування. Також було виявлено, що виробництво сперми залежить від відповідного часу, оскільки сезонні зміни у репродуктивному розвитку самців відбуваються у більшості видів риби [49].

Крім того, рухливість сперматозоїдів є інтегративним параметром якості, який об'єднує якість декількох клітинних відділів, відповідальних за активацію рухливості та підтримку прогресивного руху. Аналіз рухливості сперматозоїдів дуже корисний для порівняння різних експериментальних умов, таких як процеси збору, середовище для розведення сперми та умови зберігання сперми. Рухливість сперматозоїдів також широко використовується для оцінки впливу біотехнологій, таких як кріоконсервація [35].

У *Salmonidae*, рухливість тестикулярних сперматозоїдів не може бути активована [50] під час міграції сперматозоїдів вниз по сім'явивідних протоках, сперматозоїди набувають потенціалу для активації рухливості [51], [52]. Було показано, що це дозрівання спричинене підвищенням рН сперми [53], що призводить до збільшення внутрішньоклітинного АМРс [51], [54]. Ця стадія дозрівання погано досліджена у інших видів, але часто визнається, що зберігання тестикулярних сперматозоїдів у буфері при рН 8 або вище сприяє здатності сперматозоїдів реагувати на сигнал про початок рухової активності. Коли зрілі сперматозоїди вивільняються у зовнішнє середовище, позаклітинні іонні зміни індукують активацію рухливості [55]. У *Salmonidae* зниження позаклітинного K^+ є активатором рухливості сперматозоїдів [56]. Було висловлено припущення, що швидкість сперматозоїдів, ключовий фактор для оцінки рухливості загальної кількості сперматозоїдів, може бути класифікована CASAS (Computer assisted semen analysis system) на наступні категорії: нерухомі, частково рухливі та рухливі [57]. Комп'ютерна оцінка дозволяє об'єктивно порівняти рух сперматозоїдів риб, що зазнали впливу різних фізіологічних ситуацій, що призводить до порівняння їхньої здатності до плавання, здатності до запліднення та виживання під час процедур заморожування [58].

На тривалість рухливості сперматозоїдів риб впливають такі параметри середовища, як концентрація іонів (K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}), осмотичний тиск, рН, температура і розведення [59], [60]. У всіх досліджених видів риб сперматозоїди є нерухомими в сім'яниках та сім'яній плазмі [59], [61]. У лососевих пригнічення рухливості сперматозоїдів у спермі в основному контролюється концентрацією іонів K^+ [59], [61]. Температура має значний вплив як на загальну тривалість, так і на тривалість прогресивного руху сперматозоїдів форелі [62].

1.2.3. Фактори, що впливають на якість сперми

На якість сперми можуть впливати кілька факторів: режим годівлі, якість корму [63], [64]; фактори навколишнього середовища, такі як температура [65], [66], солоність [67], [68] фотоперіод [69]; сезон року [70], вік риби, методи утримання, включаючи індукцію нересту, постовуляторне старіння ікри та обробку гамет після вилучення; стрес; забруднюючі речовини або фізико-хімічні властивості води, гормони [22], [35].

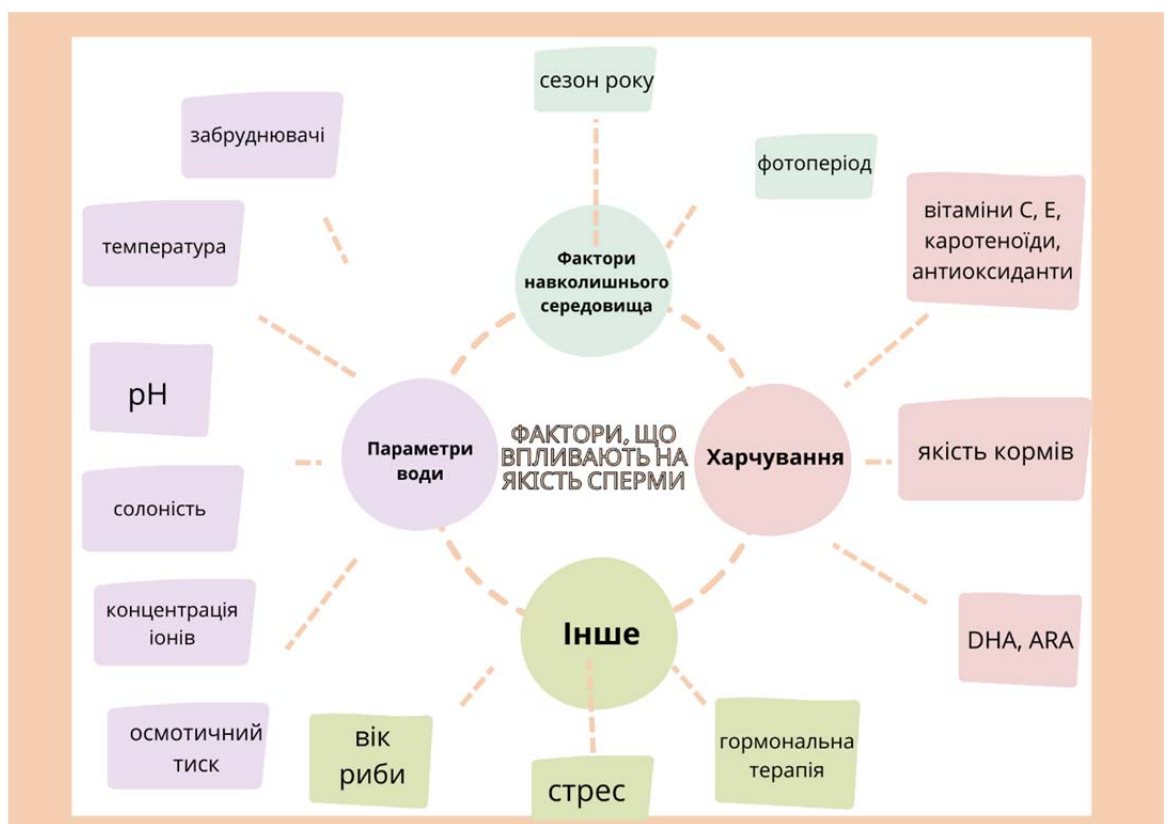


Рисунок 1.9 – Фактори, що впливають на якість сперми.

У райдужної форелі сперматозоїди риби, перенесених до температури, нижчої за температуру їхнього вирощування (холодна акліматизація), мали ліпідний склад, дещо відмінний від ліпідного складу риби, акліматизованих у тепліше середовище [71]. Крім того, якість сперми після заморожування-розморожування була кращою у акліматизованих до холоду риби порівняно з

акліматизованими в теплі. Ефект цієї температурної акліматизації більше не виявлявся через 2 місяці після зміни температури. Однак ці температурні ефекти не були протестовані на свіжих сперматозоїдах. Було досліджено, чи був позитивний температурний ефект зумовлений змінами ліпідів, а саме змінами вмісту холестерину [72], але не було повідомлено про пряму роль холестерину.

Повідомлялося, що сперматозоїди струмкової форелі, вирощеної в морській воді, мали вищу проникність мембрани та/або нижчу стійкість мембрани до гіпоосмотичного стресу, ніж сперматозоїди риб, які утримувалися в прісній воді [73]. Повідомлялося, що сперматозоїди струмкової форелі, вирощеної в морській воді, мали вищу проникність мембрани та/або нижчу стійкість мембрани до гіпоосмотичного стресу, ніж сперматозоїди риб, які утримувалися в прісній воді [73]. Примітно, що рухливість сперматозоїдів одразу після збору була кращою в групі з прісною водою, тоді як через 3 дні зберігання вона була кращою в групі з морською водою. Роль осмотичного тиску сім'яної рідини пропонується як один з параметрів, що впливає на реакцію сперматозоїдів на солоність води в середовищі вирощування самців.

Індуктори нересту є дуже ефективними для збільшення об'єму та щільності сперми [74]. Індуктори нересту або підтримують, або збільшують рухливість сперматозоїдів у всіх досліджуваних видів, найімовірніше, тому, що гормональна стимуляція є сприятливою для дозрівання сперматозоїдів у яєчках і сім'явивідних протоках.

У видів з річним ритмом розмноження, таких як райдужна форель, виробництво сперми починається раніше і закінчується пізніше протягом репродуктивного сезону, ніж виробництво ікри [75], [76], [77]. Більшість досліджень повідомляють про зниження загальної кількості сперми як на початку, так і в кінці репродуктивного сезону, на відміну від стабільного виробництва сперми, що спостерігається в середині сезону. Іноді повідомлялося про обмежену втрату рухливості сперматозоїдів на початку і в

кінці періоду дозрівання сперми. Слід мати на увазі, що частий забір може викликати стрес у самців і згодом спричинити проблеми з виробництвом сперми та/або її якістю [35].

Також було підтверджено, що обмежена здатність сперматозоїдів до запліднення, яка спостерігається у водах, забруднених ксенобіотиками, є наслідком змін у структурі сперматозоїдів та їхньої зниженої рухливості [78]

Вік самців також є важливим фактором, який може впливати на фертильність. Незважаючи на те, що вплив віку самок на фертильність є досить добре вивченим, дані щодо самців є лише обмеженими [79]. Подальші дослідження необхідні для кращого пояснення ролі віку самців та старіння сперматозоїдів у долі потомства риб.

РОЗДІЛ 2. ВИКОРИСТАННЯ РОЗМОРОЖЕНОГО МОЛОЧКА ДЛЯ ВІДТВОРЕННЯ ФОРЕЛІ В УМОВАХ ВИРОБНИЦТВА

2.1. Вступ

2.1.1. Використання розмороженого молочка в загальному процесі аквакультури

Окрім широкого використання кріоконсервації сперми для репродукції людини та штучного запліднення деяких домашніх видів тварин, кріобанки сьогодні стикаються зі зростаючим попитом на збереження продуктів генетичної селекції та видів, що перебувають під загрозою зникнення. Крім того, кріоконсервованою спермою можна обмінюватися між країнами, розташованими в обох півкулях, замість того, щоб обмінюватися рибою, що є особливо важливою перевагою, коли імпорт живих тварин заборонений [80].

Кріоконсервація сперми риб може застосовуватися в аквакультурі для синхронізації штучного відтворення, ефективного використання сперми та підтримки генетичної мінливості плідників [81]. Кріоконсервована сперма риб може дозволити ввести гени диких або місцевих популяцій в інкубаційні запаси, коли час нересту не співпадає, а також забезпечити наявність сперми для програм селективного розведення, особливо під час сезонного дефіциту самців та/або самок. У наукових дослідженнях кріоконсервована сперма риб використовується в експериментах, які потребують сперми поза нерестовим сезоном постійної якості протягом тривалих періодів часу [81]. Тому надійні методи кріоконсервації сперми мали б переваги як для аквакультури (синхронізація штучного відтворення, ефективне використання сперми, підтримка генетичної мінливості плідників), так і для збереження біорізноманіття (генні банки цінних штамів, зникаючих видів, автохтонних популяцій) [82].

2.1.2. Використання розмороженого молочка лососевих та форелі на сьогодні

Сперматозоїди райдужної форелі (*Oncorhynchus mykiss*) демонструють специфічний патерн конденсації гістонів/протамінів у ядрі [83]. Їхні протаміни не містять цистеїну, але багаті на аргінін [84]. Це призводить до більшої вразливості хроматину до денатурації, порівняно з бичачими та людськими сперматозоїдами [83]. Таким чином, цей тип ядра може бути ще більш чутливим до хімічних ушкоджень, індукованих кріоконсервацією, що робить його цікавою моделлю для вивчення наслідків кріоконсервації.

Процес заморожування і розморожування викликає певні клітинні пошкодження у сперматозоїдах райдужної форелі (*Oncorhynchus mykiss*). Для оптимального запліднення після заморожування і розморожування все ще потрібна велика кількість сперматозоїдів, не тільки через загибель клітин, але й через підвищену частоту крихкості мембран у популяції сперматозоїдів [85].

Кріоконсервація також призводить до значної втрати мембранних функцій, збільшуючи крихкість мембран у живих клітинах [86]. Стабільність мембрани надзвичайно важлива для сперматозоїдів форелі, оскільки запліднення відбувається у прісній воді, і контроль осмотичного стресу стає вирішальним питанням [38], [87], [88]. Більше того, зміни проникності мембрани можуть змінювати потік іонів через плазматичну мембрану, необхідний для активації клітинної рухливості [89]. Втрата мембранної функціональності пов'язана зі зниженням стійкості мембран до гіпоосмотичного шоку.

Однією з абсолютних вимог до використання кріоконсервованої сперми є те, що процес кріоконсервації не повинен викликати змін, які можуть погіршити розвиток нащадків [90]. Відомо, що змінені сперматозоїди дуже швидко виробляють активні форми кисню [91], [92], особливо після

заморожування [93]. Ці продукти пероксидації є дуже шкідливими для ДНК і можуть індукувати як розриви ланцюгів, так і модифікацію основ [94], [95].

2.1.3. Інтерес у виробничому контексті

Зростає потреба в контролі та оптимізації протоколів запліднення свіжим або розмороженим молоком як для оптимізації виробництва ікри райдужної форелі, так і для оптимізації та капіталізації генетичних досягнень в рамках програм селекції або розмноження. Ця потреба спонукала Viviers de Sarrance розпочати велику дослідницьку роботу з метою впровадження використання розмороженого молочка у виробничі протоколи.

2.2. Попередній експеримент

Перший експеримент був проведений з використанням протоколів заморожування та розморожування ікри форелі IMV Technologies©, з використанням оцінки концентрації та швидкості як маркерів якості. Метою цього експерименту було дослідити можливість використання розмороженого ікри в протоколах запліднення, а також дослідити діапазон концентрації сперматозоїдів, необхідний для досягнення оптимальних показників запліднення. Використані протоколи були розроблені у співпраці з державним інститутом INRAE.

Під час цього першого експерименту три зразки (включаючи пул з двох особин) розмороженого молочка були використані для тестування рухливості сперматозоїдів після розморожування відповідно до протоколів, наданих IMV Technologies©. Відсоток виживання до резорбції жовткового мішка вимірювали на стадії вічка та на стадії вилуплення.

Однак результати були не дуже обнадійливими через дуже низьку рухливість розморожених сперматозоїдів [1-3,5% проти 70-90% зі свіжим молочком]. Найкращий результат виживання до вилуплення яєць, запліднених кріоконсервованим молочком, становив 44,18%, а до резорбції

жовткового мішка – 39,97% порівняно з середнім показником 90% при використанні свіжого молочка.

Таблиця 2.1 – Результати експерименту з розмороженим молочком з відсотком виживання до вилуплення та резорбції жовткового мішка.

Зразок	Загальна кількість ікри	% рухливості сперми	Кількість рухливих сперматозоїдів на яйцеклітину	% виживання ікри до вилуплення	% виживання до резорбції жовткового мішка
184	1315	1,9	1,65E+05	0,23% +/- 0,12%	0,23% +/- 0,12%
61-114	1187	1	2,70E+05	44,18% +/- 7,29%	39,97% +/- 8,45%
174	1303	3,5	3,03E+05	0,54% +/- 0,0%	0,54% +/- 0,0%

Ці перші результати були суперечливими і не задовольнили Viviers de Sarrance. Такі результати дозволили б відновити генетичну мінливість у разі втрати живого маточного стада або невеликих потреб, але не можуть бути застосовані у виробничому процесі, який зазвичай становить 90% від середнього рівня запліднення. Тоді Viviers de Sarrance вирішили спробувати інші протоколи від компанії Cryogenetics, норвезької компанії, що спеціалізується на заплідненні риби, використовуючи свіже або розморожене молочко.

2.3. Матеріали і методи

2.3.1. Екстракція гонад, підготовка молочка та кріоконсервація

Для перевірки ефективності протоколів Cryogenetics в цьому експерименті було використано десять зразків молочка від різних неосамців для дослідження рухливості сперматозоїдів, рівня успішності запліднення та смертності яєць до вилуплення для порівняння свіжого та кріоконсервованого молочка. Це дозволило вивчити доцільність використання кріоконсервованого молочка у виробничих масштабах та вплив кріоконсервації на рівень успішності запліднення, вилуплення і рухливість сперматозоїдів.



Рисунок 2.1 – Протокол вилучення гонад, підготовки молочка та кріоконсервації.

Сперму було отримано від 25-місячних неосамців райдужної форелі (*Oncorhynchus mykiss*, які отримували корм з добавкою метилтестостерону протягом перших 900 градусоднів). Після того, як вони були підвішені за

хвіст, піддані анестезії MS222-трикаїном, неосамці були вбиті шляхом знекровлення через зябра. Цей процес дозволяє уникнути присутності крові в тканинах гонад, щоб уникнути потенційного росту бактерій у молочці. Таким чином, це дозволяє збільшити термін зберігання. Гонади відбирали руками в стерильних рукавичках.



Рисунок 2.2 та 2.3 – Забій неосамців та вилучення гонад .

Всі подальші етапи проводилися при температурі 7°C. Гонади зважували, а кровоносні судини видаляли за допомогою леза скальпеля. Гонади гомогенізували за допомогою механічної м'ясорубки, потім отриману фазу, яка називається "молочко", було зважено. Середнє значення ваги екстрагованих гонад становило 59,8 г (+/-18,9). Молочко було розведено 1:1 з

AquaBoost®Spermcoat, залишено на 10-15 хвилин і відфільтровано. Концентрацію сперматозоїдів вимірювали на фотометрі SDM6.

Для кожного самця зразки розводили до цільової концентрації 9 млрд. сперматозоїдів/мл для використання свіжого молочка. Рухливість сперматозоїдів вимірювали за допомогою приладу CASAS у свіжій спермі протягом 10 хвилин після розведення. Для кожного самця частину початкових зразків (після розведення 1:1) розвели до 1,5 млрд. сперматозоїдів/мл і кріоконсервували, використовуючи конфіденційні протоколи Cryogenetics. Зразки було розміщено в контейнери Squarepack® (12 мл).



Рисунок 2.4 та 2.5 – Етапи отримання молочка.

2.3.2. Проведення експериментів з розморожування та запліднення

У цьому експерименті було протестовано два стани молочка. Як описано в попередній частині, використовувалось свіже молочко десяти різних самців в якості контролю молочка в розмороженому вигляді. Метою було проаналізувати вплив заморожування та розморожування на рівень успішності запліднення. Кріоконсервоване молочко розморожували, виймаючи контейнер із молочком із резервуару з азотом, і занурюючи його у воду з температурою 25°C рівно на 30 секунд. Потім розморожене молочко використовували для запліднення протягом наступних 10-15 хвилин. У заморожених зразках рухливість сперматозоїдів також вимірювали за допомогою CASAS відразу (протягом 5 с) після розморожування.

Яйцеклітини, що використовувалися, були зібрані від 5 самок і змішані в однакових кількостях для кожного досліджу. 10 мл яйцеклітин, що містять приблизно 100 яйцеклітин, від кожної самки були покладені в склянки для запліднення, щоб стерти будь-який потенційний «вплив самки». Для кожного самця дві склянки яйцеклітин були запліднені свіжим молочком, і дві склянки яйцеклітин були запліднені розмороженим молочком. Запліднення проводилося шляхом додавання співвідношення 3 мільйони сперматозоїдів на яйцеклітину, незалежно від рухливості. Для запліднення активатор Aquaboost© додавали разом з розмороженим молочком, обережно перемішували і зберігали протягом 2 хвилин. Після цього яйцеклітини ретельно промивали, а потім розкладали в окремі інкубатори.

Рівень успішності запліднення вимірювали відповідно до протоколу тестування Quattro. Рівень виживання вимірювали до моменту вилуплення, видаляючи і фіксуєючи мертві ікринки 3 рази на тиждень, а також підраховуючи живі ікринки на стадії вилуплення.



Рисунок 2.6 – Протокол експерименту з розморожування та запліднення.

2.3.3. Обробка даних

Дані про рухливість, отримані з аналізу CASA, дані про запліднення, дані про виживання не були розподілені за нормальним законом (тест Shapiro-Wilk, $p < 0,001$). Порівняння груп проводилось за допомогою непараметричних U-тестів. Для обробки даних використовувалось програмне забезпечення XLSTAT (Microsoft office©).

2.4. Результати

2.4.1. Концентрація та рухливість сперматозоїдів

При дослідженні рухливості сперматозоїдів у свіжій і кріоконсервованій спермі в новому експерименті, було виявлено значну різницю між рухливістю у зразках свіжого і кріоконсервованого молочка.

Таблиця 2.2 – Рухливість сперматозоїдів зі свіжого та кріоконсервованого молочка в експерименті «Кріо 1».

Стан молочка	Рухливість сперматозоїдів, %
Свіже	79,03% +/- 8,08%
Розморожене	51,739% +/- 6,51%
p-value	<0,0001***

Ці результати підтверджують зниження рухливості сперматозоїдів після розморожування: середня рухливість свіжої сперми становила 79,03% (SD=8,10%), а кріоконсервованої – 51,74% (SD=6,50%) рухливих сперматозоїдів, що є порівняно хорошим рівнем рухливості сперматозоїдів після розморожування за даними літератури та попереднього експерименту.

У літературі спостерігається значне зниження рухливості після розморожування [50,4% до заморожування; 8,4% після розморожування] [96]. В інших експериментах рухливість свіжих сперматозоїдів навесні коливається від 88% до 100% і від 1% до 6% після розморожування, взимку значення рухливості свіжого молочка коливається від 69% до 94% і значно знижується після розморожування (від 18% до 29%) [97].

Більш сучасні посилання, однак, свідчать про те, що оволодіння протоколами дозволило послабити це зниження рухливості [84,6% до заморожування; 56,8% після розморожування] [98], або 49,9% рухливості

сперматозоїдів після розморожування [99]. Високий відсоток (50-60%) рухливості сперми райдужної форелі після розморожування також спостерігався [85], [86], [100], що більш схоже на наші спостереження.

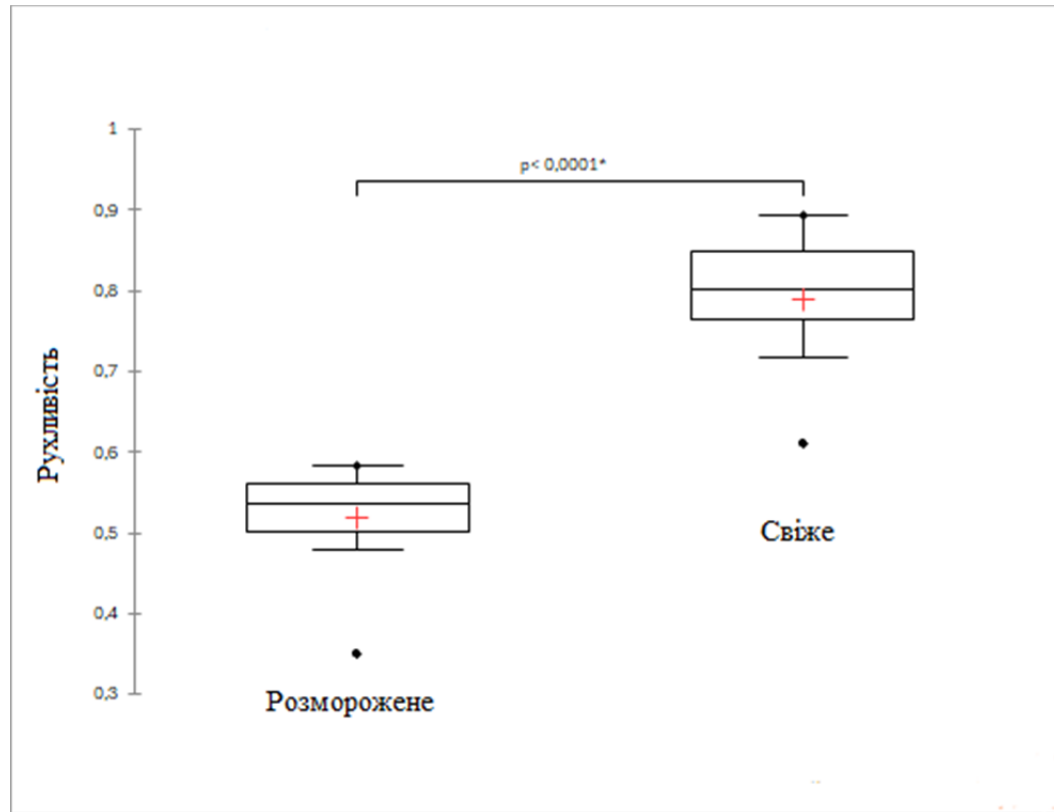


Рисунок 2.7 – Порівняння вимірів рухливості сперматозоїдів у свіжій та розмороженій спермі.

Таблиця 2.3 – Середня кількість рухливих сперматозоїдів на яйцеклітину при заплідненні.

Стан молочка	Середня кількість рухливих сперматозоїдів на яйцеклітину
Свіже	2,37E+06
Розморожене	1,55E+06

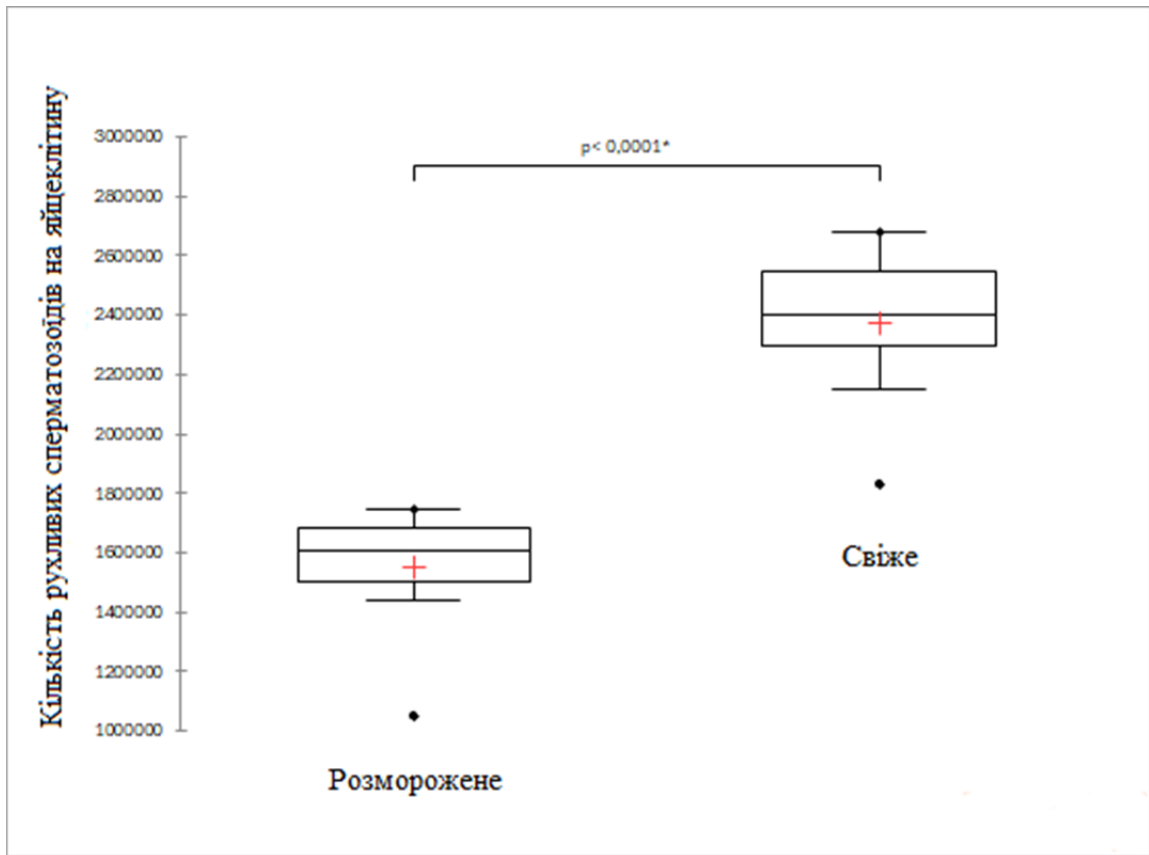


Рисунок 2.8 – Кількість рухливих сперматозоїдів на яйцеклітину при заплідненні у свіжій та розмороженій спермі.

2.4.2. Запліднення

Для середнього рівня запліднення між свіжим молочком (97,28%, SD=1,90%) та кріоконсервованим молочком (96,47%, SD=2,50%) дані є однорідними, і значної різниці не виявлено.

Таблиця 2.4 – Дані про успішність запліднення.

Стан молочка	Запліднені яйцеклітини, %
Свіже	97,27% \pm 1,88%
Розморожене	96,47% \pm 2,52%
p-value	0,29

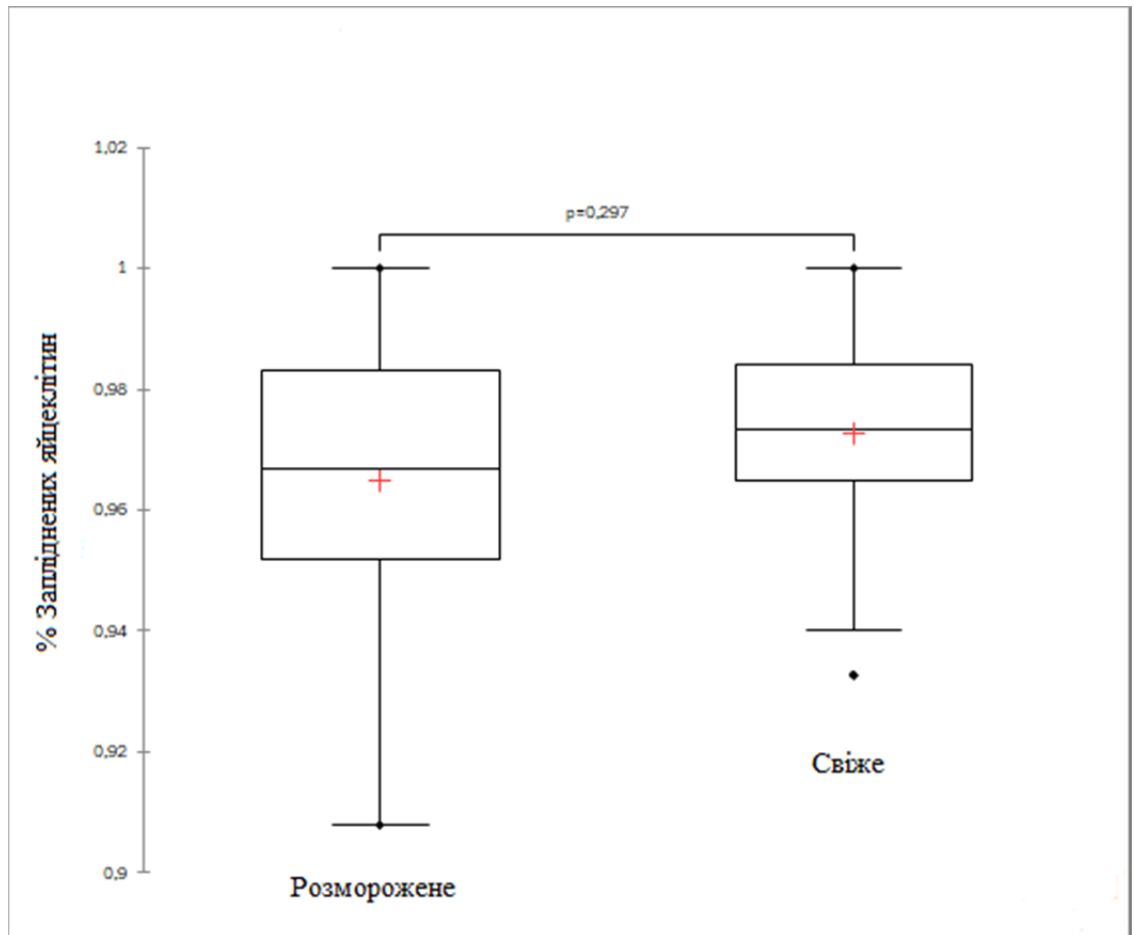


Рисунок 2.9 – Порівняння даних про успішність запліднення яйцеклітин свіжою та розмороженою спермою.

Ці результати можуть бути підтверджені літературними даними: Показники запліднення свіжорозведеної сперми (87-90%) статистично не відрізняються від здатності до запліднення кріоконсервованої сперми [99], [101], [15], [102], [80], [85], [103], [104], [105].

2.4.3. Рівень виживання

У цьому дослідженні спостерігалася незначна різниця у смертності до вилуплення між ікринками, заплідненими свіжим і кріоконсервованим молочком, але рівень виживання все одно був дуже високим як для ікринок,

запліднених молочком різного стану. Для свіжого молочка рівень виживання становить 94,77% (SD=1,70%), а для кріоконсервованого – 93,74% (SD=1,70).

Таблиця 2.5 – Виживаність ікри до вилуплення, заплідненої свіжою та розмороженою спермою.

Стан молочка	Виживаність ікри до вилуплення, %
Свіже	94,76% +/- 1,75%
Розморожене	93,73% +/- 1,75%
p-value	0,04*

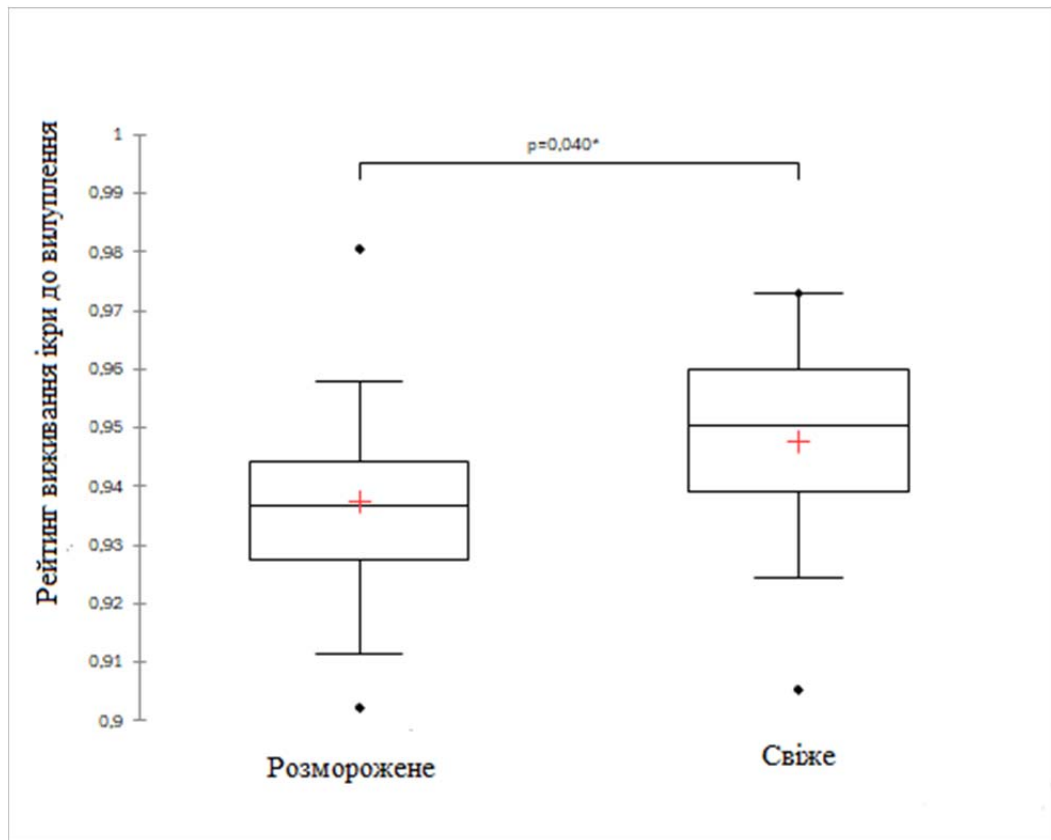


Рисунок 2.10 – Порівняння рейтингів виживання ікри до вилуплення, заплідненої свіжим або розмороженим молочком.

2.5. Висновки до розділу 2

Коли сперматозоїди заморожують, а потім розморожують, спостерігається зниження рівня рухливості. Однак менша рухливість кріоконсервованих сперматозоїдів не має негативного впливу на високий успіх запліднення. У цьому дослідженні спостерігалася статистична різниця між виживанням до вилуплення ікринок, запліднених свіжим або розмороженим молочко, але обидва показники все ще були високими. Необхідні подальші дослідження для визначення оптимальної концентрації сперми форелі для запліднення без шкоди для рівня успішності запліднення.

РОЗДІЛ 3. ПОКРАЩЕННЯ ТА ОПТИМІЗАЦІЯ ВИКОРИСТАННЯ СВІЖОГО ТА РОЗМОРОЖЕНОГО МОЛОЧКА ДЛЯ ЗАПЛІДНЕННЯ ООЦИТІВ

3.1. Вступ

У той час як якість ікри впливає на здатність ікри запліднюватися, вилуплюватися і перетворюватися на нормальну рибу [74] якість сперми також важлива для успішного запліднення ікри і для нормального розвитку ембріонів [35]. Деякі з наведених вище факторів важливо контролювати, щоб оцінити якість сперми і, відповідно, шанси на успішне запліднення.

3.1.1. Контроль концентрації сперми

Концентрацію сперматозоїдів у спермі легко оцінити за допомогою різних методів, таких як мікроскопічний підрахунок, спектрофотометр, проточна цитометрія та визначення значень спермакриту [106]. Однак різні запропоновані методи пов'язані з певними незручностями. Підрахунок (який є основним методом) дозволяє оцінити кількість сперматозоїдів з прийнятною варіабельністю, зумовленою розведенням і помилками підрахунку, які оцінюються до 6% для 300 сперматозоїдів на одне спостереження, коли підрахунок 1/500 розведеної сперми повторювався 3 рази [107]. Це найдешевший спосіб оцінки концентрації сперматозоїдів, але основна проблема цього методу полягає в тому, що він займає багато часу і може бути несумісний з подальшим використанням сперми, наприклад, кондиціонуванням для збереження або аліквотуванням для багаторазових схрещувань в генетичних дослідженнях [108]. Вимога швидкої оцінки концентрації сперматозоїдів може бути реалізована за допомогою різних методів, таких як фотометрія, цитометрія, включаючи лічильник Коултера, і центрифугування. Концентрацію сперматозоїдів можна точно і швидко оцінити за допомогою складних і дорогих інструментів, які можуть надати

інші характеристики життєздатності сперматозоїдів, але нові дешеві програми, такі як невеликі мобільні однохвильові (навіть в УФ) фотометри або аналіз зображень, можуть бути успішно використані з прийнятною затримкою в часі для подальшого використання сперми [108].

3.1.2. Контроль рухливості сперми

Рухливість сперматозоїдів вважається однією з ключових характеристик аналізу сперми. Відомо, що ручна мікроскопічна оцінка рухливості є недостовірною, неточною [109] та суб'єктивною [110]. Комп'ютерні аналізатори сперми (CASA) надають точну і достовірну інформацію про різноманітні характеристики руху сперматозоїдів і можуть бути використані для об'єктивної оцінки рухливості [111]. Поступова поява систем комп'ютерного аналізу сперми (CASA-Mot) дозволила оцінити більшу кількість кінетичних параметрів сперматозоїдів за допомогою об'єктивних, чутливих і точних методів [112]. У комп'ютерному аналізі сперми (CASA) [113], [114], відеозапис руху сперматозоїдів і аналіз декількох параметрів руху дозволяє оцінити морфологію сперматозоїдів, а також швидкість руху, рух голівки і загальний відсоток рухливих сперматозоїдів. Такі аналізи дають велику кількість даних, які часто важко співвіднести з конкретною функцією сперматозоїдів. Однак метод є дуже корисним для порівняння зразків, особливо за допомогою кластерного аналізу, розробленого Martinez-Pastor та ін. [115] де аналізуються зміни в розподілі кластерів сперматозоїдів в еякуляті.

3.1.3. Процес запліднення на даний час

В даний час виробничі протоколи для Viviers de Sarrance не фокусуються на рухливості та концентрації сперматозоїдів. Гонади неосамців витягують із забитої риби, потім подрібнюють і розбавляють

розчинником IMV у співвідношенні 1:9. Розбавлене молочко зберігають при температурі 9°C щонайменше 1 годину, а іноді до 36 годин перед використанням. Незалежно від розміру яйцеклітин або концентрації молочка, застосовується приблизно таке співвідношення: один об'єм розведеного молочка на 100 об'ємів ооцитів. Активатор додається до яйцеклітин відразу після розведеного молочка. Потім весь контейнер обережно перемішується і закладається на 5 хвилин. Потім запліднені яйцеклітини промивають і переносять в інкубатори.

3.1.4. Робота, що проводиться для оптимізації якості сперми та кількості молочка

Якість сперми, яка включає показники рухливості, швидкості, довговічності та щільності сперматозоїдів, вважається основною характеристикою, що визначає успіх запліднення [116], [117].

Сперматогенез та остаточне дозрівання сперматозоїдів у риб контролюється на гіпоталамо-гіпофізарно-гонадній (HPG) осі, де секреція гіпофізарно-гонадотропінів контролюється гіпоталамусом через стимулюючу дію гонадотропін-рилізінг-гормону (GnRH). GnRH є первинними нейропептидами, які регулюють розмноження у риб та інтегрують зовнішню інформацію, таку як температура, фотоперіод, падіння води та соціальні взаємодії [118]. Репродуктивний механізм на осі HPG використовується у риб в контрольованих умовах, де, крім факторів навколишнього середовища, гормональне лікування може також застосовуватися для досягнення синхронізації нересту і остаточного дозрівання сперматозоїдів. Переваги застосування гормональної терапії також стосуються виробництва сперматозоїдів (яке визначається як концентрація, помножена на отриманий об'єм), їх здатності до руху та запліднення. Оскільки відтворення є вирішальним у тваринництві, оцінка якості сперми відіграє життєво важливу роль у практиці аквакультури, часто визначаючи її прибутковість.

Встановлено, що якість сперми сильно залежить від сезону [61], [119], [120]. Щільність сперми, відсоток рухливих клітин, швидкість та лінійність значно змінюються протягом нерестового сезону [119]. Розуміння сезонних змін якості сперми може бути використане для оптимізації успішності запліднення для інкубаційного виробництва [77], вдосконалення методів зберігання гамет [121], підвищення ефективності програм селекційного розведення [122] та оцінки впливу старіння сперми [123]. Було виявлено, що 7-27% варіацій ознак сперми можна пояснити сезонними коливаннями, що вказує на те, що сезонність може мати значний вплив на якість рухливості, швидкість, лінійність, довговічність і щільність сперматозоїдів [124]. Розуміння цих сезонних коливань якості сперми є важливим для кількісної оцінки впливу батька на успіх запліднення.

Харчування маточного поголів'я є ключовим фактором, який може впливати на плодючість, гаметогенез та якість гамет [74], [125], і, як відомо, впливає на відтворення риби, якість личинок та виживання [125], [126]. Лише деякі дослідження використовували самців плідників, що свідчить про необхідність оптимізації харчових потреб як самців, так і самок плідників [127], [128]. Хімічний склад сперми також визначається раціоном самця і може бути успішно використаний для оцінки її якості [129]. Важливими компонентами раціону, що впливають на якість сперми, є вітаміни, які діють як антиоксиданти. До них відносяться вітаміни С і Е та каротиноїди. Підтверджено, що вміст вітаміну С у плазмі сперми визначається його кількістю в раціоні риби, наприклад, у райдужної форелі (*Oncorhynchus mykiss*) [130]. Антиоксиданти відіграють захисну роль для клітин під час сперматогенезу та позитивно впливають на рухливість сперматозоїдів. Тому високий рівень антиоксидантів у сім'яній плазмі (вітаміни С і Е) позитивно впливає на якість сперми, її здатність до запліднення та розвиток ембріонів. Антиоксиданти також необхідні для стероїдогенезу та захисту клітин під час цього процесу до запліднення [125]. Їх присутність знижує ризик пероксидації ліпідів, процесу, що є шкідливим для рухливості

сперматозоїдів. Також було доведено, що рухливість сперматозоїдів та їхня здатність запліднювати яйцеклітину залежить від докозагексаєнової кислоти (DHA) та арахідонової кислоти (ARA) [125].

3.2. Попередній експеримент

Перший експеримент був проведений з використанням протоколів IMV Technologies© заморожування та розморожування ікри форелі, з використанням оцінки концентрації та швидкості як маркерів якості.

Метою цього експерименту було дослідити можливість використання розмороженого ікри в протоколах запліднення, а також дослідити діапазон концентрації сперматозоїдів, необхідний для досягнення оптимальних показників запліднення.

У першому експерименті використовували свіже молочко від одного 25-місячного неосамця. Після екстракції та розведення 1:1, концентрацію та рухливість сперми перевіряли за допомогою системи CASA. Шляхом різних розведень було отримано кілька зразків зі зменшеною концентрацією (ідентифіковано від 6.1 до 6.4). Один і той самий об'єм з кожного зразка використовували в двох екземплярах для запліднення однакових за якістю пулів яйцеклітин.

Таблиця 3.1 – Результати першого експерименту на ооцитах, запліднених кріоконсервованим молочком з використанням IMV Technologies.

Зразок	Рухливість сперматозоїдів, %	Кількість рухливих сперматозоїдів на яйцеклітину	Вживання ікри до вилуплення, %	Вживання до резорбції жовткового мішка, %
6.1	53,6	1,03E+06	97,19% +/-1,02%	90,42% +/-1,20%
6.2	53,6	2,38E+05	95,81% +/-0,24%	88,54% +/-0,82%
6.3	53,6	1,17E+05	90,81% +/-2,39%	85,07% +/-4,53%
6.4	53,6	6,78E+04	86,39% +/-0,98%	81,51% +/-3,63%

Показники виживання до вилуплення становили від 86,39% до 97,20%, що є дуже високим показником і може бути порівняно з показниками виживання запліднених свіжим молочком яйцеклітин. Показники виживання до резорбції становили від 81,52% до 90,43%. Ці порівняно хороші результати спонукали продовжити дослідження з розмороженим молочком, щоб оцінити їх і впровадити нові протоколи з оптимальними концентраціями, які використовуються для запліднення.

3.3. Матеріали і методи

3.3.1. Екстракція гонад, підготовка молочка та кріоконсервація

У першому експерименті було використано 4 зразки молочка від різних неосамців, щоб дослідити вплив різних концентрацій на успішність запліднення.

Сперму було отримано від 25-місячних неосамців райдужної форелі (*Oncorhynchus mykiss*, які отримували корм з добавкою метилтестостерону протягом перших 900 градусоднів). Після того, як вони були підвішені за хвіст, піддані анестезії MS222-трикаїном, неосамці були вбиті шляхом знекровлення через зябра. Цей процес дозволяє уникнути присутності крові в тканинах гонад, щоб уникнути потенційного росту бактерій у молочці. Таким чином, це дозволяє збільшити термін зберігання. Гонади відбирали руками в стерильних рукавичках.

Всі подальші етапи проводилися при температурі 7°C. Гонади зважували, а кровоносні судини видаляли за допомогою леза скальпеля. Гонади гомогенізували за допомогою механічної м'ясорубки, потім отриману фазу, яка називається "молочко", було зважено. Середнє значення ваги екстрагованих гонад становило 59,8 г (+/-18,9). Молочко було розведено 1:1 з AquaBoost®Spermcoat, залишено на 10-15 хвилин і відфільтровано. Концентрацію сперматозоїдів вимірювали на фотометрі SDM6.

Для кожного самця частину початкових зразків (після розведення 1:1) розвели до 1,5 млрд сперматозоїдів/мл і кріоконсервували, використовуючи конфіденційні протоколи Cryogenetics. Зразки було розміщено в контейнери Squarepack® (12 мл).



Рисунок 3.1 – Протокол вилучення гонад, підготовки молочка та кріоконсервації.

3.3.2. Проведення експериментів з розморожування та запліднення

Кріоконсервоване молочко розморожували, виймаючи контейнер із молочком із резервуару з азотом, і занурюючи його у воду з температурою 25°C рівно на 30 секунд. Потім розморожене молочко використовували для запліднення протягом наступних 10-15 хвилин. У заморожених зразках рухливість сперматозоїдів також вимірювали за допомогою CASAS відразу (протягом 5 с) після розморожування.



Рисунок 3.2 – Протокол експериментів з розморожування та запліднення.

Яйцеклітини, що використовувалися, були зібрані від 5 самок і змішані в однакових кількостях для кожного дослід. 10 мл яйцеклітин, що містять приблизно 100 яйцеклітин, від кожної самки були покладені в склянки для запліднення, щоб стерти будь-який потенційний «вплив самки». Для кожного самця дві склянки яйцеклітин були запліднені розмороженим молочком. Запліднення проводилося з 5 різними співвідношеннями сперматозоїдів до яйцеклітин: $3 \cdot 10^6$; $2 \cdot 10^6$; $1.5 \cdot 10^6$; $1 \cdot 10^6$; $5 \cdot 10^5$ з 500 яйцеклітинами на кожен дослід. Для запліднення активатор Aquaboost© додавали разом з

розмороженим молочком, обережно перемішували і зберігали протягом 2 хвилин. Після цього яйцеклітини ретельно промивали, а потім розклали в окремі інкубатори.

Рівень успішності запліднення вимірювали відповідно до протоколу тестування Quattro. Рівень виживання вимірювали до моменту вилуплення, видаляючи і фіксуючи мертві ікринки 3 рази на тиждень, а також підраховуючи живі ікринки на стадії вилуплення.

3.3.3. Обробка даних

Дані про рухливість, отримані з аналізу CASA, дані про запліднення, дані про виживання не були розподілені за нормальним законом (тест Shapiro-Wilk, $p < 0,001$). Порівняння груп проводилось за допомогою непараметричних U-тестів. Для обробки даних використовувалось програмне забезпечення XLSTAT (Microsoft office©).

3.4. Результати

3.4.1. Результати запліднення «Кріо 2»

У цьому експерименті концентрація 1,5 мільйона сперматозоїдів на яйцеклітину дала найкращий показник запліднення (97% запліднених яйцеклітин). Частота запліднення при цій концентрації не показала значної різниці з концентрацією 2 мільйони сперматозоїдів на яйцеклітину (91% запліднених яйцеклітин). Однак решта зразків статистично відрізнялися і показали гірші показники запліднення: 84% для 500 000 сперматозоїдів/яйцеклітина; 89% для 1 мільйона сперматозоїдів/яйцеклітина, 86% для 3 мільйонів сперматозоїдів/яйцеклітина.

Таблиця 3.2 – Результати експерименту «Кріо 2» зі змінними концентраціями між 4 зразками кріоконсервованої сперми (середнє значення для 4 самців у різних концентраціях).

Кількість сперматозоїдів на яйцеклітину	Середнє значення запліднених яйцеклітин (4 зразки), %
500000	83,75% +/- 7,58%
1000000	88,5% +/- 8,56%
1500000	97% +/- 3,18%
2000000	91% +/- 6,13%
3000000	86% +/- 2,09%

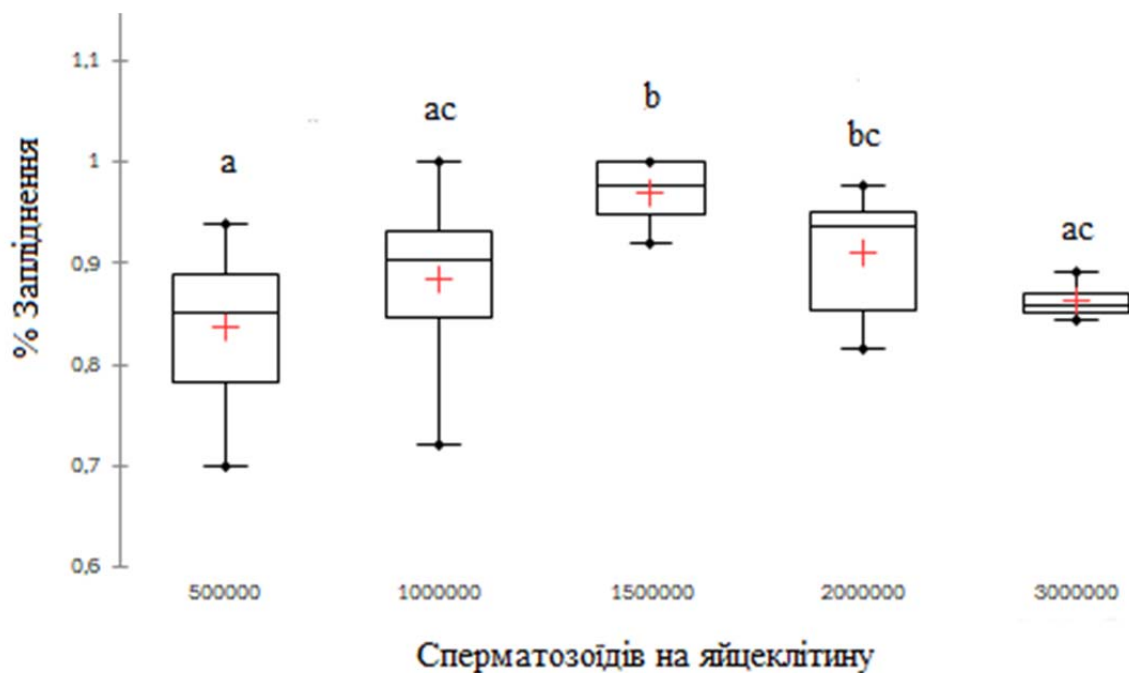


Рисунок 3.3 – Результати експерименту «Кріо 2» зі змінними концентраціями між 4 зразками кріоконсервованої сперми (коефіцієнт запліднення згідно із співвідношенням сперматозоїдів на яйцеклітину, середнє значення для 4 самців у різних концентраціях).

3.4.2. Рівень виживання до вилуплення «Кріо 2»

Таблиця 3.3 – Результати експерименту «Кріо 2» зі змінними концентраціями між 4 зразками кріоконсервованої сперми (середнє значення для 4 самців у різних концентраціях).

Кількість сперматозоїдів на яйцеклітину	Вживаність до вилуплення, %
500000	80,87% \pm 2,47%
1000000	80,62% \pm 2,06%
1500000	89,18% \pm 1,26%
2000000	82,25% \pm 3,68%
3000000	80,15% \pm 2,79

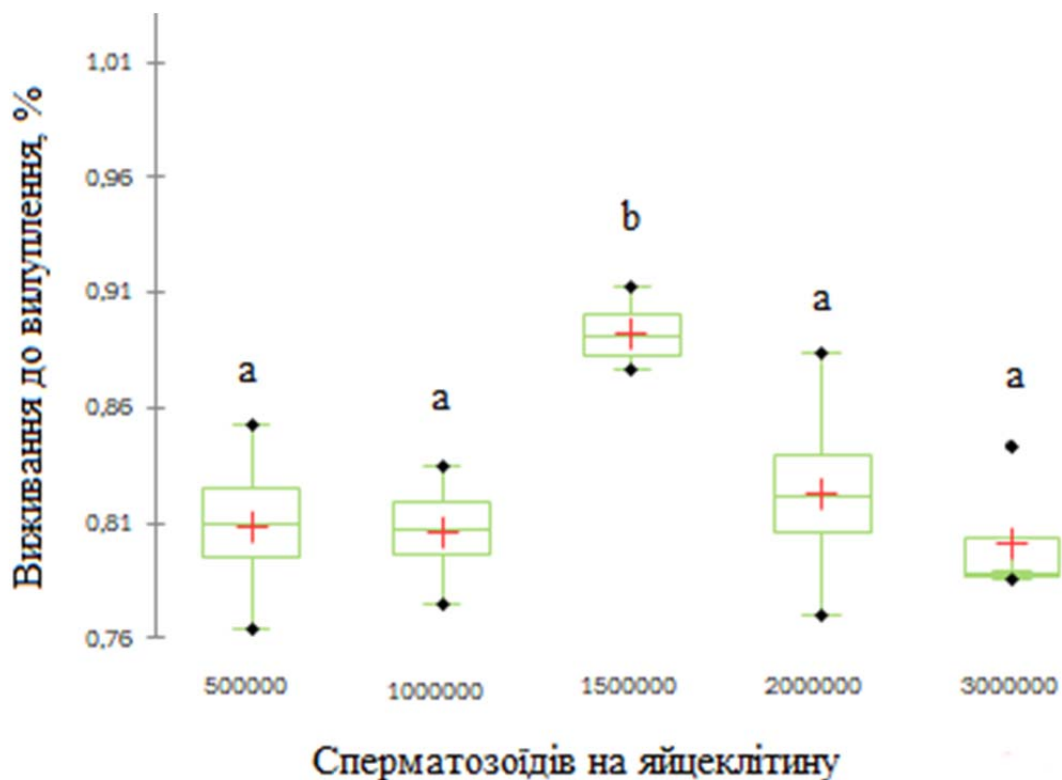


Рисунок 3.4 – Результати експерименту «Кріо 2» зі змінними концентраціями між 4 зразками кріоконсервованої сперми (коефіцієнт виживання згідно із співвідношенням сперматозоїдів на яйцеклітину, середнє значення для 4 самців у різних концентраціях).

Згідно з результатами виживання в цьому експерименті, яйцеклітини, запліднені 1,5 мільйонами сперматозоїдів на яйцеклітину, показали найкращі результати смертності (89,18% +/- 1,26%).

Решта експериментальних ікринок, запліднених зі співвідношенням 500000-1 мільйон сперматозоїдів на яйцеклітину; 2 мільйони - 3 мільйони, не показали суттєвої різниці між зразками і показали нижчий рівень виживання (80-82%), який все одно був досить високим.

3.4.3. Результати запліднення «Кріо 3»

Таблиця 3.4 – Результати експерименту «Кріо 3» зі змінними концентраціями між 4 зразками кріоконсервованої сперми (середнє значення для 4 самців у різних концентраціях).

Кількість сперматозоїдів на яйцеклітину	Середнє значення запліднених яйцеклітин,%
500000	89,73% +/-5,57%
1000000	87,70% +/-7,17
1500000	90,66% +/-6,13
2000000	95,02% +/-4,60
3000000	94,81% +/-3,25%

Згідно з цими результатами, співвідношення від 1,5 до 3 мільйонів сперматозоїдів на яйцеклітину дають найкращі показники запліднення і статистично не відрізняються: 91% запліднених яйцеклітин при співвідношенні 1,5 мільйона сперматозоїдів на яйцеклітину; 95% при співвідношенні 2 і 3 мільйони сперматозоїдів на яйцеклітину. За цими результатами не спостерігається чоловічого ефекту, що робить очевидним, що успіх запліднення залежить лише від концентрації сперматозоїдів. Проте в літературі повідомляється про неоднаковий потенціал самців [131], [132], [101].

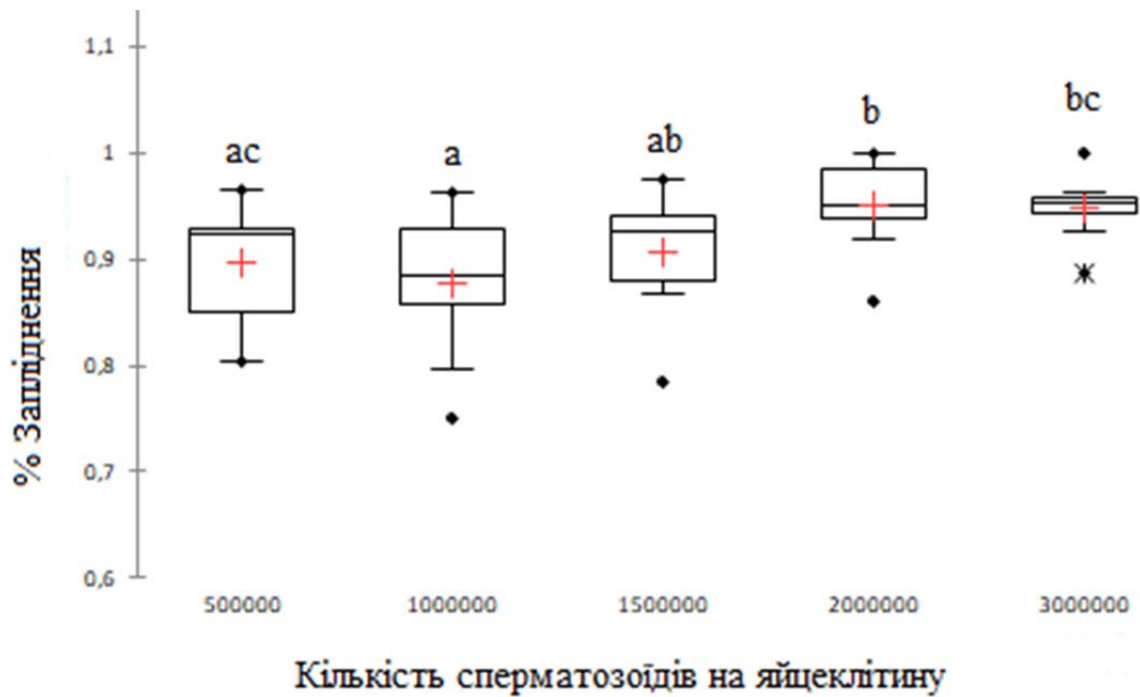


Рисунок 3.5 – Результати експерименту «Кріо 3» зі змінними концентраціями між 4 зразками кріоконсервованої сперми (коефіцієнт запліднення згідно із співвідношенням сперматозоїдів на яйцеклітину, середнє значення для 4 самців у різних концентраціях).

3.4.4. Рівень виживання до вилуплення «Кріо 3»

Таблиця 3.5 – Результати експерименту «Кріо 3» зі змінними концентраціями між 4 зразками кріоконсервованої сперми (середнє значення для 4 самців у різних концентраціях).

Кількість сперматозоїдів на яйцеклітину	Вживаність до вилуплення, %
500000	83,39% +/-2,61%
1000000	84,73% +/-4,44%
1500000	86,62% +/-2,44%
2000000	86,11% +/-3,88%
3000000	84,77% +/-3,19%

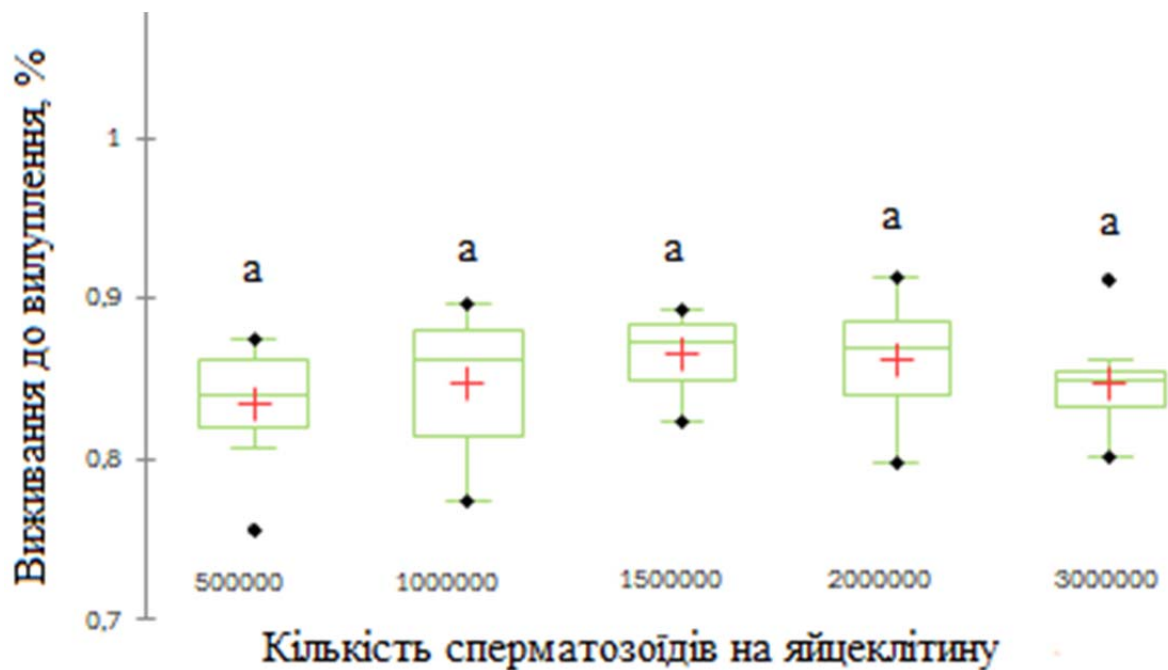


Рисунок 3.6 – Результати експерименту «Кріо 3» зі змінними концентраціями між 4 зразками кріоконсервованої сперми (коефіцієнт виживання згідно із співвідношенням сперматозоїдів на яйцеклітину, середнє значення для 4 самців у різних концентраціях).

Згідно з результатами виживання під час цього експерименту, не було виявлено суттєвої різниці між виживанням яйцеклітин, запліднених зі співвідношенням сперматозоїдів до яйцеклітини від 500 000 до 3 мільйонів сперматозоїдів на яйцеклітину. Показники виживання варіюють від 83% до 86%, що схоже на результати попереднього експерименту, але трохи вище. Ця невелика різниця може бути пов'язана з покращенням навичок розморожування і кращим засвоєнням протоколів, а також зі зміною повторюваності співвідношення сперматозоїдів/яйцеклітина.

3.5. Висновки до розділу 3

Концентрації від 1,5 до 3 мільйонів сперматозоїдів на яйцеклітину дають найкращі результати запліднення.

Концентрації з меншим співвідношенням сперматозоїдів до яйцеклітини не показали таких ефективних показників запліднення. Це узгоджується зі стандартними виробничими протоколами, що використовуються у всьому світі, які використовують 3 мільйони сперматозоїдів на яйцеклітину під час запліднення. Концентрації, які показали найкращі результати в цьому дослідженні, можуть бути використані для широкомасштабних експериментів, щоб підтвердити ефективність цього протоколу. Показники виживання були вищими за 80% у кожному зразку. Найвищий результат склав 89,18% (+/-1,26%), решта зразків не показали значних відмінностей в обох експериментах.

Для підтвердження ефективності цих протоколів у великомасштабних експериментах необхідна подальша робота, але перші результати є дуже обнадійливими для впровадження використання розмороженого молочка у виробничих протоколах.

ВИСНОВКИ

1. Протоколи Cryogenetics дозволяють досягти високої рухливості сперматозоїдів після розморожування. Результати, представлені в цих дослідженнях, показують, що нові протоколи, які застосовуються для форелі, є більш ефективними, ніж старі протоколи, описані в літературі, які не були адаптовані для форелі.
2. У дрібномасштабних дослідженнях не було виявлено різниці в успішності запліднення між партіями, заплідненими свіжим або замороженим молочком. Коли сперматозоїди заморожують, а потім розморожують, спостерігається падіння рівня рухливості, однак нижча рухливість кріоконсервованих сперматозоїдів не має жодного негативного впливу на високий успіх запліднення.
3. Концентрації від 1,5 до 3 мільйонів сперматозоїдів/яйцеклітина давали найкращі результати запліднення. Показники виживання були вищими за 80% у кожному зразку від 500 000 до 3 мільйонів сперматозоїдів на яйцеклітину і статистично не відрізнялися, за винятком найкращого результату - 89% виживання.
4. Необхідна подальша робота для підтвердження ефективності цих протоколів у великомасштабних випробуваннях, але перші результати є дуже обнадійливими для впровадження використання розмороженого молочка у виробничих протоколах.
5. В цілому, поточні результати показують відмінну ефективність і відкривають можливості підтвердити її під час подальших великомасштабних випробувань, які є необхідними. Це надихає дослідницьку команду на проведення великомасштабних експериментів і відкриває перспективу для впровадження технологій заморожування у виробництво. Це може бути дуже корисним для підтримки генетичної мінливості маточного стада, використання генетичних досягнень та ефективного використання сперми (особливо під час сезонного дефіциту

самців) для отримання сперми постійної якості під час сезонного дефіциту. Самців райдужної форелі важко розводити, і спостерігається велика смертність після 24 місяців життя. Крім того, на рибних фермах для інверсії статі використовують гормони (метилтестостерон), що є шкідливим для навколишнього середовища і викликають етичні суперечки у суспільстві. Отже, використовуючи кріоконсервацію сперми, рибні господарства могли б заощадити багато ресурсів, часу, бути впевненими, що у них є достатньо сперми для виробництва незалежно від сезону, бути більш екологічними та етичними.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

- [1] B. Jalabert and A. Fostier, *La truite arc-en-ciel De la biologie à l'élevage*. 2010.
- [2] B. Jalabert, "Particularities of reproduction and oogenesis in teleost fish compared to mammals," *Reproduction Nutrition Development*, vol. 45, no. 3. 2005. doi: 10.1051/rnd:2005019.
- [3] G. Hoitsy, A. Woynarovich, and T. Moth-Poulsen, "Guide to the small scale artificial propagation of trout," *György Hoitsy, Andras Woynarovich and Thomas Moth-Poulsen//Budapest*, 2012.
- [4] "Fishbase." [Online]. Available: <https://www.fishbase.se/search.php>
- [5] F. Le Menn, J. Cerdà, and P. J. Babin, "Ultrastructural aspects of the ontogeny and differentiation of ray-finned fish ovarian follicles," in *The Fish Oocyte: From Basic Studies to Biotechnological Applications*, 2007. doi: 10.1007/978-1-4020-6235-3_1.
- [6] E. Lubzens, G. Young, J. Bobe, and J. Cerdà, "Oogenesis in teleosts: How fish eggs are formed," *Gen Comp Endocrinol*, vol. 165, no. 3, pp. 367–389, 2010, doi: 10.1016/j.ygcen.2009.05.022.
- [7] R. A. Wallace and K. Selman, "Cellular and dynamic aspects of Oocyte growth in Teleosts," *Integr Comp Biol*, vol. 21, no. 2, 1981, doi: 10.1093/icb/21.2.325.
- [8] R. A. Wallace and K. Selman, "Ultrastructural aspects of oogenesis and oocyte growth in fish and amphibians," *J Electron Microsc Tech*, vol. 16, no. 3, 1990, doi: 10.1002/jemt.1060160302.
- [9] N. E. Henderson, "Influence of Light and Temperature on the Reproductive Cycle of the Eastern Brook Trout, *Salvelinus fontinalis* (Mitchill) ," *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, vol. 20, no. 4, 1963, doi: 10.1139/f63-061.

- [10] J. A. K. Elliott, N. R. Bromage, and J. R. C. Springate, “Changes in reproductive function of three strains of rainbow trout exposed to constant and seasonally-changing light cycles,” *Aquaculture*, vol. 43, no. 1–3, 1984, doi: 10.1016/0044-8486(84)90006-1.
- [11] B. BRETON, G. MAISSE, and E. LEMENN, “Contrôle photopériodique de la saison de reproduction en salmoniculture : une expérience pilote en Bretagne,” *Bulletin Français de Pisciculture*, no. 288, 1983, doi: 10.1051/kmae:1983013.
- [12] J. P. Wolf, S. Bulwa, D. Rodrizues, and P. Jouannet, “Human oocyte cytometry and fertilisation rate after subzonal insemination,” *Zygote*, vol. 3, no. 2, 1995, doi: 10.1017/S0967199400002471.
- [13] C. R. Tyler and J. P. Sumpter, “Oocyte growth and development in teleosts,” *Rev Fish Biol Fish*, vol. 6, no. 3, pp. 287–318, 1996, doi: 10.1007/BF00122584.
- [14] C. A. Leblanc, C. Schreck, B. K. Kristjánsson, S. Skúlason, and D. L. G. Noakes, “Egg size–related traits during the first year of growth and smolting in hatchery and wild juveniles of steelhead trout *Oncorhynchus mykiss*,” *Environ Biol Fishes*, vol. 106, no. 5, 2023, doi: 10.1007/s10641-022-01377-8.
- [15] R. Billard, “Reproduction in rainbow trout: sex differentiation, dynamics of gametogenesis, biology and preservation of gametes,” *Aquaculture*, vol. 100, no. 1–3, pp. 263–298, 1992, doi: 10.1016/0044-8486(92)90385-X.
- [16] N. Bromage *et al.*, “Broodstock management, fecundity, egg quality and the timing of egg production in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*),” *Aquaculture*, vol. 100, no. 1–3, 1992, doi: 10.1016/0044-8486(92)90355-O.
- [17] N. Bromage and R. Cumaranatunga, “Egg Production in the Rainbow Trout,” in *Recent Advances in Aquaculture*, 1988. doi: 10.1007/978-94-011-9743-4_2.

- [18] R. Patiño and C. V. Sullivan, “Ovarian follicle growth, maturation, and ovulation in teleost fish,” *Fish Physiology and Biochemistry*, vol. 26, no. 1. 2002. doi: 10.1023/A:1023311613987.
- [19] E. Lubzens, G. Young, J. Bobe, and J. Cerdà, “Oogenesis in teleosts: How fish eggs are formed,” *Gen Comp Endocrinol*, vol. 165, no. 3, pp. 367–389, 2010, doi: 10.1016/j.ygcen.2009.05.022.
- [20] K. R. Von Schalburg, M. L. Rise, G. D. Brown, W. S. Davidson, and B. F. Koop, “A comprehensive survey of the genes involved in maturation and development of the rainbow trout ovary,” *Biology of Reproduction*, vol. 72, no. 3. 2005. doi: 10.1095/biolreprod.104.034967.
- [21] K. R. Von Schalburg, S. P. McCarthy, M. L. Rise, J. C. Hutson, W. S. Davidson, and B. F. Koop, “Expression of morphogenic genes in mature ovarian and testicular tissues: Potential stem-cell niche markers and patterning factors,” *Mol Reprod Dev*, vol. 73, no. 2, 2006, doi: 10.1002/mrd.20359.
- [22] S. Brooks, C. R. Tyler, and J. P. Sumpter, “Egg quality in fish: What makes a good egg?,” *Rev Fish Biol Fish*, vol. 7, no. 4, 1997, doi: 10.1023/A:1018400130692.
- [23] R. van den Hurk and J. Peute, “Cyclic changes in the ovary of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*, with special reference to sites of steroidogenesis,” *Cell Tissue Res*, vol. 199, no. 2, 1979, doi: 10.1007/BF00236140.
- [24] H. J. Grier, M. C. Uribe, and L. R. Parenti, “Germinal epithelium, folliculogenesis, and postovulatory follicles in ovaries of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) (Teleostei, Protacanthopterygii, Salmoniformes),” *J Morphol*, vol. 268, no. 4, 2007, doi: 10.1002/jmor.10518.
- [25] B. Jalabert and A. Fostier, “The follicular sensitivity in vitro to maturation-inducing hormones in rainbow trout, *Salmo gairdneri*: Role of oestradiol-17 β ,” *Aquaculture*, vol. 43, no. 1–3, 1984, doi: 10.1016/0044-8486(84)90004-8.

- [26] S. Milla, B. Jalabert, H. Rime, P. Prunet, and J. Bobe, "Hydration of rainbow trout oocyte during meiotic maturation and in vitro regulation by 17,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one and cortisol," *Journal of Experimental Biology*, vol. 209, no. 6, 2006, doi: 10.1242/jeb.02094.
- [27] A. Fostier, B. Breton, B. Jalabert, and O. Marcuzzi, "Evolution des niveaux plasmatiques de la gonadotropine glycoprotéique et de la 17 alpha hydroxy-20 beta dihydroprogestérone au cours de la maturation et de l'ovulation chez la Truite arc-en-ciel. *Salmo gairdnerii*," *Comptes Rendus des Seances de l'Academie des Sciences - Series III*, vol. 293, no. 15, 1981.
- [28] C. Bry, "Temporal aspects of macroscopic changes in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) oocytes before ovulation and of ova fertility during the post-ovulation period; effect of treatment with 17 α -hydroxy-20 β -dihydroprogesterone," *Aquaculture*, vol. 24, no. C, 1981, doi: 10.1016/0044-8486(81)90052-1.
- [29] C. C. Mylonas, J. M. Hinshaw, and C. V. Sullivan, "GnRHa-induced ovulation of brown trout (*Salmo trutta*) and its effects on egg quality," *Aquaculture*, vol. 106, no. 3–4, 1992, doi: 10.1016/0044-8486(92)90268-P.
- [30] D. A. Hurley and K. C. Fisher, "THE STRUCTURE AND DEVELOPMENT OF THE EXTERNAL MEMBRANE IN YOUNG EGGS OF THE BROOK TROUT, *SALVELINUS FONTINALIS* (MITCHILL)," *Can J Zool*, vol. 44, no. 2, 1966, doi: 10.1139/z66-016.
- [31] W. W. Ballard, "Normal embryonic stages for salmonid fishes, based on *Salmo gairdneri* Richardson and *Salvelinus fontinalis* (Mitchill)," *Journal of Experimental Zoology*, vol. 184, no. 1, 1973, doi: 10.1002/jez.1401840103.
- [32] A. E. Knight, "The Embryonic and Larval Development of the Rainbow Trout," *Trans Am Fish Soc*, vol. 92, no. 4, 1963, doi: 10.1577/1548-8659(1963)92[344:tealdo]2.0.co;2.
- [33] Claudiane Valotaire and Frédéric Borel, "Table du développement embryonnaire de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) à 10°C en photos," *Cahier des Techniques de l'INRA*, pp. 1–6, 2017.

- [34] K. Bianchini and P. A. Wright, "Hypoxia delays hematopoiesis: Retention of embryonic hemoglobin and erythrocytes in larval rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, during chronic hypoxia exposure," *Journal of Experimental Biology*, vol. 216, no. 23, 2013, doi: 10.1242/jeb.083337.
- [35] J. Bobe and C. Labbé, "Egg and sperm quality in fish," *Gen Comp Endocrinol*, vol. 165, no. 3, pp. 535–548, 2010, doi: 10.1016/j.ygcen.2009.02.011.
- [36] S. Yu, N. Kojima, S. I. Hakomori, S. Kudo, S. Inoue, and Y. Inoue, "Binding of rainbow trout sperm to egg is mediated by strong carbohydrate-to-carbohydrate interaction between (KDN)GM3 (deaminated neuraminyl ganglioside) and Gg3-like epitope," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 99, no. 5, 2002, doi: 10.1073/pnas.052707599.
- [37] J. C. Beck, K. D. Fulcher, C. F. Beck, and J. G. Cloud, "Sperm Surface Antigen Required for Fertility: Identification on Spermatozoa of Rainbow Trout by Use of Monoclonal Antibodies," *Trans Am Fish Soc*, vol. 121, no. 3, 1992, doi: 10.1577/1548-8659(1992)121<0333:ssarff>2.3.co;2.
- [38] R. Billard, "Ultrastructure of trout spermatozoa: Changes after dilution and deep-freezing," *Cell Tissue Res*, vol. 228, no. 2, 1983, doi: 10.1007/BF00204873.
- [39] Z. Avramova, A. Uschewa, E. Stephanova, and R. Tsanev, "Trout sperm chromatin. I. Biochemical and immunological study of the protein composition.," *Eur J Cell Biol*, vol. 31, no. 1, 1983.
- [40] M. E. Christensen, J. B. Rattner, and G. H. Dixon, "Hyperacetylation of histone H4 promotes chromatin decondensation prior to histone replacement by protamines during spermatogenesis in rainbow trout," *Nucleic Acids Res*, vol. 12, no. 11, 1984, doi: 10.1093/nar/12.11.4575.
- [41] M. Morisawa, K. Suzuki, and S. Morisawa, "Effects of potassium and osmolality on spermatozoan motility of salmonid fishes.," *Journal of Experimental Biology*, vol. 107, 1983, doi: 10.1242/jeb.107.1.105.

- [42] J. Piironen and H. Hyvärinen, “Composition of the milt of some teleost fishes,” *J Fish Biol*, vol. 22, no. 3, 1983, doi: 10.1111/j.1095-8649.1983.tb04757.x.
- [43] F. Lahnsteiner, R. A. Patzner, and T. Weismann, “The testicular main ducts and the spermatic ducts in some cyprinid fishes—II. Composition of the seminal fluid,” *J Fish Biol*, vol. 44, no. 3, 1994, doi: 10.1111/j.1095-8649.1994.tb01226.x.
- [44] F. Lahnsteiner, R. A. Patzner, and T. Weismann, “Energy resources of spermatozoa of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Pisces, Teleostei),” *Reprod Nutr Dev*, vol. 33, no. 4, 1993, doi: 10.1051/rnd:19930404.
- [45] F. Lahnsteiner, N. Mansour, and B. Berger, “Seminal plasma proteins prolong the viability of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa,” *Theriogenology*, vol. 62, no. 5, 2004, doi: 10.1016/j.theriogenology.2003.12.001.
- [46] R. Billard, J. Cosson, and L. W. Crim, “Motility of fresh and aged halibut sperm,” *Aquat Living Resour*, vol. 6, no. 1, 1993, doi: 10.1051/alr:1993008.
- [47] O. Linhart, R. Billard, and J. P. Proteau, “Cryopreservation of European catfish (*Silurus glanis* L.) spermatozoa,” *Aquaculture*, vol. 115, no. 3–4, 1993, doi: 10.1016/0044-8486(93)90148-R.
- [48] J. Krol, J. Glogowski, K. Demska-Zakes, and P. Hliwa, “Quality of semen and histological analysis of testes in Eurasian perch *Perca fluviatilis* L. during a spawning period,” *Czech Journal of Animal Science*, vol. 51, no. 5, 2006, doi: 10.17221/3932-cjas.
- [49] R. K. Kowalski and B. I. Cejko, “Sperm quality in fish: Determinants and affecting factors,” *Theriogenology*, vol. 135, 2019, doi: 10.1016/j.theriogenology.2019.06.009.
- [50] S. Morisawa and M. Morisawa, “Acquisition of potential for sperm motility in rainbow trout and chum salmon,” *Journal of Experimental Biology*, vol. 126, 1986, doi: 10.1242/jeb.126.1.89.

- [51] S. Morisawa, K. Ishida, M. Okuno, and M. Morisawa, "Roles of pH and cyclic adenosine monophosphate in the acquisition of potential for sperm motility during migration from the sea to the river in chum salmon," *Mol Reprod Dev*, vol. 34, no. 4, 1993, doi: 10.1002/mrd.1080340411.
- [52] M. Koldras, M. Loir, G. Maise, and F. Le Gac, "Study of the composition of seminal fluid and of sperm motility along the genital tract, during a spawning season, in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)," *Aquat Living Resour*, vol. 9, no. 4, 1996, doi: 10.1051/alr:1996036.
- [53] S. Morisawa and M. Morisawa, "Induction of potential for sperm motility by bicarbonate and pH in rainbow trout and chum salmon.," *J Exp Biol*, vol. 136, 1988, doi: 10.1242/jeb.136.1.13.
- [54] T. Miura, K. Yamauchi, H. Takahashi, and Y. Nagahama, "The role of hormones in the acquisition of sperm motility in salmonid fish," *Journal of Experimental Zoology*, vol. 261, no. 3, 1992, doi: 10.1002/jez.1402610316.
- [55] M. Morisawa, "Cell signaling mechanisms for sperm motility," *Zoological Science*, vol. 11, no. 5, 1994.
- [56] M. Morisawa and K. Suzuki, "Osmolality and potassium ion: Their roles in initiation of sperm motility in teleosts," *Science (1979)*, vol. 210, no. 4474, 1980, doi: 10.1126/science.7444445.
- [57] F. Lahnsteiner, B. Berger, T. Weismann, and R. Patzner, "The influence of various cryoprotectants on semen quality of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) before and after cryopreservation," *Journal of Applied Ichthyology*, vol. 12, no. 2, 1996, doi: 10.1111/j.1439-0426.1996.tb00070.x.
- [58] J. Cosson, R. Billard, C. Cibert, C. Dreanno, O. Linhart, and M. Suquet, "Movements of fish sperm flagella studied by high speed videomicroscopy coupled to computer assisted image analysis," *Polskie Archiwum Hydrobiologii*, vol. 44, no. 1–2, 1997.
- [59] J. Stoss, "Fish gamete preservation and spermatozoan physiology," *Fish Physiology*, vol. 9, 1983, doi: 10.1016/S1546-5098(08)60306-4.

- [60] J. Cosson, “The ionic and osmotic factors controlling motility of fish spermatozoa,” *Aquaculture International*, vol. 12, no. 1, 2004, doi: 10.1023/B:AQUI.0000017189.44263.bc.
- [61] R. BILLARD, “Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species,” *Reprod Nutr Dev*, vol. 26, no. 4, 1986, doi: 10.1051/rnd:19860601.
- [62] S. M. H. Alavi and J. Cosson, “Sperm motility in fishes. I. Effects of temperature and pH: A review,” *Cell Biology International*, vol. 29, no. 2, 2005. doi: 10.1016/j.cellbi.2004.11.021.
- [63] M. Hajiahmadian, K. Sarvi Moghanlou, N. Agh, and F. Farrokhi Ardabili, “Semen characteristics of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following diets containing different vegetable fatty acid levels,” *Reproduction in Domestic Animals*, vol. 51, no. 6, 2016, doi:10.1111/rda.12776.
- [64] S. M. H. Alavi *et al.*, “Sperm quality in male *Barbus barbus* L. fed different diets during the spawning season,” *Fish Physiol Biochem*, vol. 35, no. 4, 2009, doi: 10.1007/s10695-009-9325-7.
- [65] M. Fenkes, J. L. Fitzpatrick, K. Ozolina, H. A. Shiels, and R. L. Nudds, “Sperm in hot water: Direct and indirect thermal challenges interact to impact on brown trout sperm quality,” *Journal of Experimental Biology*, vol. 220, no. 14, 2017, doi: 10.1242/jeb.156018.
- [66] F. Lahnsteiner and N. Mansour, “The effect of temperature on sperm motility and enzymatic activity in brown trout *Salmo trutta*, burbot *Lota lota* and grayling *Thymallus thymallus*,” *J Fish Biol*, vol. 81, no. 1, 2012, doi: 10.1111/j.1095-8649.2012.03323.x.
- [67] L. Tomasik and A. Sobociński, “Effect of salinity on motility and viability of salmonid spermatozoa,” *Acta Ichthyol Piscat*, vol. 09, no. 2, 1979, doi: 10.3750/aip1979.09.2.01.
- [68] M. Bonisławska, J. Szulc, and K. Formicki, “The effect of water salinity on the motility of spermatozoa of the brook trout, *salvelinus fontinalis* (Actinopterygii: Salmoniformes: Salmonidae),” *Acta Ichthyol Piscat*, vol. 45, no. 2, 2015, doi: 10.3750/AIP2015.45.2.04.

- [69] M. Aguilar-Juárez, G. Ruiz-Campos, and C. G. Paniagua-Chávez, “Sexual maturation and milt quality of the san Pedro Mártir trout using an artificial photoperiod,” *N Am J Aquac*, vol. 73, no. 3, 2011, doi: 10.1080/15222055.2011.595250.
- [70] M. Momin and D. Memiş, “Sperm quality analysis of normal season (NG) and out-season by photoperiod manipulation (PG) of male rainbow trout broodstock (*Oncorhynchus mykiss*),” *Fish Physiol Biochem*, vol. 44, no. 6, 2018, doi: 10.1007/s10695-018-0564-3.
- [71] C. Labbé and G. Maisse, “Influence of rainbow trout thermal acclimation on sperm cryopreservation: Relation to change in the lipid composition of the plasma membrane,” *Aquaculture*, vol. 145, no. 1–4, pp. 281–294, 1996, doi: 10.1016/S0044-8486(96)01354-3.
- [72] K. Müller, P. Müller, G. Pincemy, A. Kurz, and C. Labbe, “Characterization of sperm plasma membrane properties after cholesterol modification: Consequences for cryopreservation of rainbow trout spermatozoa,” *Biol Reprod*, vol. 78, no. 3, 2008, doi: 10.1095/biolreprod.107.064253.
- [73] C. Labbe, A. Martoriati, A. Devaux, and G. Maisse, “Effect of sperm cryopreservation on sperm DNA stability and progeny development in rainbow trout,” *Mol Reprod Dev*, vol. 60, no. 3, pp. 397–404, 2001, doi: 10.1002/mrd.1102.
- [74] J. Bobe and C. Labbé, “Egg and sperm quality in fish,” *Gen Comp Endocrinol*, vol. 165, no. 3, pp. 535–548, 2010, doi: 10.1016/j.ygcen.2009.02.011.
- [75] S. Büyükhatoğlu and W. Holtz, “Sperm output in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) - Effect of age, timing and frequency of stripping and presence of females,” *Aquaculture*, vol. 37, no. 1, 1984, doi: 10.1016/0044-8486(84)90044-9.
- [76] S. M. Baynes and A. P. Scott, “Seasonal variations in parameters of milt production and in plasma concentration of sex steroids of male rainbow trout

- (*Salmo gairdneri*),” *Gen Comp Endocrinol*, vol. 57, no. 1, 1985, doi: 10.1016/0016-6480(85)90211-4.
- [77] M. Suquet *et al.*, “The ageing phenomenon of turbot spermatozoa: Effects on morphology, motility and concentration, intracellular ATP content, fertilization, and storage capacities,” *J Fish Biol*, vol. 52, no. 1, 1998, doi: 10.1006/jfbi.1997.0556.
- [78] I. I. Valdebenito, P. C. Gallegos, and B. R. Effer, “Gamete quality in fish: Evaluation parameters and determining factors,” *Zygote*, vol. 23, no. 2, 2015, doi: 10.1017/S0967199413000506.
- [79] C. Gasparini, R. Dosselli, and J. P. Evans, “Sperm storage by males causes changes in sperm phenotype and influences the reproductive fitness of males and their sons,” *Evolution Letters*, vol. 1, no. 1, 2017. doi: 10.1002/evl3.2.
- [80] P. Conget, M. Fernández, G. Herrera, and J. J. Minguell, “Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa using programmable freezing,” *Aquaculture*, vol. 143, no. 3–4, 1996, doi: 10.1016/0044-8486(96)01275-6.
- [81] F. Lahnsteiner, “Semen cryopreservation in the Salmonidae and in the Northern pike,” *Aquac Res*, vol. 31, no. 3, pp. 245–258, 2000, doi: 10.1046/j.1365-2109.2000.00452.x.
- [82] F. Lahnsteiner, B. Berger, A. Horvath, B. Urbanyi, and T. Weismann, “Cryopreservation of spermatozoa in cyprinid fishes,” *Theriogenology*, vol. 54, no. 9, 2000, doi: 10.1016/S0093-691X(00)00469-6.
- [83] M. Gusse and P. Chevaillier, “Electron microscope evidence for the presence of globular structures in different sperm chromatins,” *Journal of Cell Biology*, vol. 87, no. 1, 1980, doi: 10.1083/jcb.87.1.280.
- [84] T. Ando and S. Watanabe, “A new method for fractionation of protamines and the amino acid sequences of salmine and three components of iridine,” *Int J Protein Res*, vol. 1, no. 3, 1969, doi: 10.1111/j.1399-3011.1969.tb01646.x.

- [85] E. Cabrita, L. Anel, and M. P. Herraéz, "Effect of external cryoprotectants as membrane stabilizers on cryopreserved rainbow trout sperm," *Theriogenology*, vol. 56, no. 4, 2001, doi: 10.1016/S0093-691X(01)00594-5.
- [86] E. Cabrita, R. Alvarez, E. Anel, and M. P. Herraéz, "The hypoosmotic swelling test performed with coulter counter: A method to assay functional integrity of sperm membrane in rainbow trout," *Anim Reprod Sci*, vol. 55, no. 3–4, 1999, doi: 10.1016/S0378-4320(99)00014-7.
- [87] R. Bellard, "Artificial insemination and gamete management in fish," *Mar Behav Physiol*, vol. 14, no. 1, 1988, doi: 10.1080/10236248809378690.
- [88] S. Büyükhatoğlu and W. Holtz, "Preservation of trout sperm in liquid or frozen state," *Aquaculture*, vol. 14, no. 1, 1978, doi: 10.1016/0044-8486(78)90139-4.
- [89] M. L. Malejac, M. Loir, and G. Maisse, "Qualité de la membrane des spermatozoïdes de truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*); relation avec l'aptitude du sperme à la congélation," *Aquat Living Resour*, vol. 3, no. 1, 1990, doi: 10.1051/alr:1990004.
- [90] C. Labbe, A. Martoriati, A. Devaux, and G. Maisse, "Effect of sperm cryopreservation on sperm DNA stability and progeny development in rainbow trout," *Mol Reprod Dev*, vol. 60, no. 3, pp. 397–404, 2001, doi: 10.1002/mrd.1102.
- [91] J. G. Alvarez and B. T. Storey, "Lipid peroxidation and the reactions of superoxide and hydrogen peroxide in mouse spermatozoa," *Biol Reprod*, vol. 30, no. 4, 1984, doi: 10.1095/biolreprod30.4.833.
- [92] J. Aitken and H. Fisher, "Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: The balance of benefit and risk," *BioEssays*, vol. 16, no. 4, 1994, doi: 10.1002/bies.950160409.
- [93] J. G. ALVAREZ and B. T. STOREY, "Evidence for Increased Lipid Peroxidative Damage and Loss of Superoxide Dismutase Activity as a Mode of Sublethal Cryodamage to Human Sperm During Cryopreservation," *J Androl*, vol. 13, no. 3, 1992, doi: 10.1002/j.1939-4640.1992.tb00306.x.

- [94] S. Lopes, A. Jurisicova, J. G. Sun, and R. F. Casper, "Reactive oxygen species: Potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa," *Human Reproduction*, vol. 13, no. 4, 1998, doi: 10.1093/humrep/13.4.896.
- [95] H. Rodriguez, M. R. Valentine, G. P. Holmquist, S. A. Akman, and J. Termini, "Mapping of peroxy radical induced damage on genomic DNA," *Biochemistry*, vol. 38, no. 50, 1999, doi: 10.1021/bi9918994.
- [96] F. Lahnsteiner, B. Berger, T. Weismann, and R. Patzner, "The influence of various cryoprotectants on semen quality of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) before and after cryopreservation," *Journal of Applied Ichthyology*, vol. 12, no. 2, 1996, doi: 10.1111/j.1439-0426.1996.tb00070.x.
- [97] V. Robles, E. Cabrita, S. Cuñado, and M. P. Herráez, "Sperm cryopreservation of sex-reversed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Parameters that affect its ability for freezing," *Aquaculture*, vol. 224, no. 1–4, 2003, doi: 10.1016/S0044-8486(03)00221-7.
- [98] S. Judycka, A. Ciereszko, S. Dobosz, T. Zalewski, and G. J. Dietrich, "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," *Gen Comp Endocrinol*, vol. 245, 2017, doi: 10.1016/j.ygcen.2016.06.016.
- [99] A. Ciereszko, G. J. Dietrich, J. Nynca, S. Dobosz, and T. Zalewski, "Cryopreservation of rainbow trout semen using a glucose-methanol extender," *Aquaculture*, vol. 420–421, 2014, doi: 10.1016/j.aquaculture.2013.11.014.
- [100] A. Ekici *et al.*, "Effects of different doses of taurine in the glucose-based extender during cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) semen," *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, vol. 26, no. 4, 2012, doi: 10.5504/bbeq.2012.0041.
- [101] I. Babiak *et al.*, "Effect of extender composition and equilibration time on fertilization ability and enzymatic activity of rainbow trout cryopreserved

- spermatozoa,” *Theriogenology*, vol. 56, no. 1, 2001, doi: 10.1016/S0093-691X(01)00553-2.
- [102] Y. Bozkurt, E. Akcay, N. Tekin, and S. Secer, “Effect of freezing techniques, extenders and cryoprotectants on the fertilization rate of frozen rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) sperm,” *Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh*, vol. 57, no. 2, 2005, doi: 10.46989/001c.20398.
- [103] S. Pérez-Cerezales, S. Martínez-Páramo, J. Beirão, and M. P. Herráez, “Evaluation of DNA damage as a quality marker for rainbow trout sperm cryopreservation and use of LDL as cryoprotectant,” *Theriogenology*, vol. 74, no. 2, 2010, doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.02.012.
- [104] R. Salte, A. Galli, U. Falaschi, K. T. Fjalestad, and R. Aleandri, “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*, vol. 231, no. 1–4, 2004, doi: 10.1016/j.aquaculture.2003.10.037.
- [105] M. J. Levanduski and J. G. Cloud, “Rainbow trout (*Salmo gairdneri*) semen: Effect of non-motile sperm on fertility,” *Aquaculture*, vol. 75, no. 1–2, 1988, doi: 10.1016/0044-8486(88)90030-0.
- [106] S. M. H. Alavi and J. Cosson, “Sperm motility in fishes. I. Effects of temperature and pH: A review,” *Cell Biology International*, vol. 29, no. 2, 2005. doi: 10.1016/j.cellbi.2004.11.021.
- [107] M. Suquet, M. H. Omnes, Y. Normant, and C. Fauvel, “Assessment of sperm concentration and motility in turbot (*Scophthalmus maximus*),” *Aquaculture*, vol. 101, no. 1–2, 1992, doi: 10.1016/0044-8486(92)90241-C.
- [108] I. J. Ochokwu and T. G. Oshoke, “Effect of Egg and Sperm Quality in Successful Fish Breeding,” *IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science Ver. II*, vol. 8, no. 8, 2015.
- [109] R. O. DAVIS and D. F. KATZ, “Operational Standards for CASA Instruments,” *J Androl*, vol. 14, no. 5, 1993, doi: 10.1002/j.1939-4640.1993.tb00407.x.

- [110] P. L. Matson, "Andrology: External quality assessment for semen analysis and sperm antibody detection: Results of a pilot scheme," *Human Reproduction*, vol. 10, no. 3, 1995, doi: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a135999.
- [111] W. V. Holt and M. J. Palomo, "Optimization of a continuous real-time computerized semen analysis system for ram sperm motility assessment, and evaluation of four methods of semen preparation," *Reprod Fertil Dev*, vol. 8, no. 2, 1996, doi: 10.1071/RD9960219.
- [112] V. Gallego and J. F. Asturiano, "Sperm motility in fish: Technical applications and perspectives through CASA-Mot systems," *Reproduction, Fertility and Development*, vol. 30, no. 6, 2018, doi: 10.1071/RD17460.
- [113] D. E. Kime *et al.*, "Use of computer assisted sperm analysis (CASA) for monitoring the effects of pollution on sperm quality of fish; application to the effects of heavy metals," *Aquatic Toxicology*, vol. 36, no. 3–4, 1996, doi: 10.1016/S0166-445X(96)00806-5.
- [114] E. Rurangwa, F. A. M. Volckaert, G. Huyskens, D. E. Kime, and F. Ollevier, "Quality control of refrigerated and cryopreserved semen using computer-assisted sperm analysis (CASA), viable staining and standardized fertilization in african catfish (*Clarias gariepinus*)," *Theriogenology*, vol. 55, no. 3, 2001, doi: 10.1016/S0093-691X(01)00441-1.
- [115] F. Martínez-Pastor, E. Cabrita, F. Soares, L. Anel, and M. T. Dinis, "Multivariate cluster analysis to study motility activation of *Solea senegalensis* spermatozoa: A model for marine teleosts," *Reproduction*, vol. 135, no. 4, 2008, doi: 10.1530/REP-07-0376.
- [116] S. J. Casselman, A. I. Schulte-Hostedde, and R. Montgomerie, "Sperm quality influences male fertilization success in walleye (*Sander vitreus*)," *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, vol. 63, no. 9, 2006, doi: 10.1139/F06-108.
- [117] V. M. Tuset, G. J. Dietrich, M. Wojtczak, M. Słowińska, J. De Monserrat, and A. Ciereszko, "Relationships between morphology, motility and

- fertilization capacity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa,” *Journal of Applied Ichthyology*, vol. 24, no. 4, 2008, doi: 10.1111/j.1439-0426.2008.01145.x.
- [118] C. C. Mylonas, A. Fostier, and S. Zanuy, “Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction,” *Gen Comp Endocrinol*, vol. 165, no. 3, 2010, doi: 10.1016/j.ygcen.2009.03.007.
- [119] I. Babiak, O. Ottesen, G. Rudolfson, and S. Johnsen, “Quantitative characteristics of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L., semen throughout the reproductive season,” *Theriogenology*, vol. 65, no. 8, 2006, doi: 10.1016/j.theriogenology.2005.09.004.
- [120] K. R. Munkittrick and R. D. Moccia, “Seasonal changes in the quality of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) semen: Effect of a delay in stripping on spermatocrit, motility, volume and seminal plasma constituents,” *Aquaculture*, vol. 64, no. 2, 1987, doi: 10.1016/0044-8486(87)90350-4.
- [121] R. M. Rideout, E. A. Trippel, and M. K. Litvak, “The development of haddock and Atlantic cod sperm cryopreservation techniques and the effect of sperm age on cryopreservation success,” *J Fish Biol*, vol. 65, no. 2, 2004, doi: 10.1111/j.0022-1112.2004.00449.x.
- [122] I. A. E. Butts, M. K. Litvak, and E. A. Trippel, “Seasonal variations in seminal plasma and sperm characteristics of wild-caught and cultivated Atlantic cod, *Gadus morhua*,” *Theriogenology*, vol. 73, no. 7, 2010, doi: 10.1016/j.theriogenology.2009.11.011.
- [123] S. M. H. Alavi, M. Psenicka, M. Rodina, T. Policar, and O. Linhart, “Changes of sperm morphology, volume, density and motility and seminal plasma composition in *Barbus barbus* (Teleostei: Cyprinidae) during the reproductive season,” *Aquat Living Resour*, vol. 21, no. 1, 2008, doi: 10.1051/alr:2008011.
- [124] K. Johnson, I. A. E. Butts, C. C. Wilson, and T. E. Pitcher, “Sperm quality of hatchery-reared lake Trout throughout the spawning season,” *N Am J Aquac*, vol. 75, no. 1, 2013, doi: 10.1080/15222055.2012.711277.

- [125] M. S. Izquierdo, H. Fernández-Palacios, and A. G. J. Tacon, “Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish,” *Aquaculture*, vol. 197, no. 1–4, 2001, doi: 10.1016/S0044-8486(01)00581-6.
- [126] N. Bromage *et al.*, “Broodstock management, fecundity, egg quality and the timing of egg production in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*),” *Aquaculture*, vol. 100, no. 1–3, 1992, doi: 10.1016/0044-8486(92)90355-O.
- [127] I. A. E. Butts *et al.*, “Impact of dietary fatty acids on muscle composition, liver lipids, milt composition and sperm performance in European eel,” *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, vol. 183, 2015, doi: 10.1016/j.cbpa.2015.01.015.
- [128] M. Hajiahmadian, K. Sarvi Moghanlou, N. Agh, and F. Farrokhi Ardabili, “Semen characteristics of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following diets containing different vegetable fatty acid levels,” *Reproduction in Domestic Animals*, vol. 51, no. 6, 2016, doi: 10.1111/rda.12776.
- [129] P. Luquet and T. Watanabe, “Interaction ‘nutrition-reproduction’ in fish,” *Fish Physiol Biochem*, vol. 2, no. 1–4, 1986, doi: 10.1007/BF02264080.
- [130] A. Ciereszko and K. Dabrowski, “Sperm quality and ascorbic acid concentration in rainbow trout semen are affected by dietary vitamin C: An across-season study,” *Biol Reprod*, vol. 52, no. 5, 1995, doi: 10.1095/biolreprod52.5.982.
- [131] S. R. Gile and M. M. Ferguson, “Factors affecting male potency in pooled gamete crosses of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*,” *Environ Biol Fishes*, vol. 42, no. 3, 1995, doi: 10.1007/BF00004920.
- [132] I. Babiak, J. Glogowski, M. Luczynski, K. Goryczko, S. Dobosz, and H. Kuzminski, “The effect of individual male potency on fertilization ability of fresh and cryopreserved milt of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum),” *Aquac Res*, vol. 29, no. 5, 1998, doi: 10.1046/j.1365-2109.1998.00197.x.