

ТОВАРНАЯ АКВАКУЛЬТУРА И ИСКУССТВЕННОЕ ВОСПРОИЗВОДСТВО ГИДРОБИОНТОВ

DOI: 10.24143/2073-5529-2019-1-83-90
УДК 57.086.13

ВЛИЯНИЕ СКОРОСТИ ЗАМОРАЖИВАНИЯ НА РЫБОВОДНЫЕ КАЧЕСТВА СПЕРМЫ ОСЕТРОВЫХ РЫБ¹

М. М. Белая¹, А. А. Красильникова^{1,2}

¹*Федеральный исследовательский центр Южный научный центр
Российской академии наук,
Ростов-на-Дону, Российская Федерация*

²*Астраханский государственный технический университет,
Астрахань, Российская Федерация*

Разработка методики криоконсервации, которая обеспечит надежную защиту целостности клеточных органелл после процессов замораживания-оттаивания и наличие необходимого запаса энергетических веществ, запускающих процесс обмена веществ в клетках и тканях после двойного температурного шока, позволяет достигнуть значительного прогресса в долгосрочном хранении клеток. Рассматриваются вопросы низкотемпературного консервирования спермы осетровых рыб. Материалом для исследований служили репродуктивные клетки русского осетра (*Acipenser gueldenstaedtii* Brandt & Ratzeburg, 1833) и стерляди (*Acipenser ruthenus* Linnaeus, 1758), полученные на осетровых рыбоводных заводах Астраханской области и Береговой научно-экспедиционной базы «Кагальник» Ростовской области в период нерестовой кампании. Цель работы – установление оптимальных скоростей замораживания при криоконсервации спермы осетровых рыб, обеспечивающих сохранение структурных компонентов репродуктивных клеток. Установлено, что скорость замораживания является видоспецифичной. Наилучшей скоростью замораживания для спермы русского осетра – как по активности, так и по времени жизни сперматозоидов после размораживания – оказалась скорость 3 °С/мин. При проведении работ со спермой стерляди меньшие повреждения после замораживания-оттаивания происходили при скорости заморозки 10 °С/мин. Скорость 3 °С/мин для спермы стерляди оказалась менее эффективной. Ступенчатый режим замораживания показал еще более низкий результат в обоих случаях. Однако качество дефростированной спермы не стало ниже рыбоводных показателей при всех трех исследуемых скоростях, что говорит о возможности использования всех указанных скоростей замораживания спермы осетровых в зависимости от различных условий консервации.

Ключевые слова: клетка, криоконсервация, криоповреждения, скорости замораживания, осетровые, сперма.

Для цитирования: Белая М. М., Красильникова А. А. Влияние скорости замораживания на рыбоводные качества спермы осетровых рыб // Вестник Астраханского государственного технического университета. Серия: Рыбное хозяйство. 2019. № 1. С. 83–90. DOI: 10.24143/2073-5529-2019-1-83-90.

Введение

В настоящее время низкотемпературное консервирование является одним из наиболее доступных и приемлемых способов долгосрочного хранения клеток [1–5].

При анализе устойчивости и повреждения в результате замораживания живых систем и других биологических объектов большое значение придается характеру кристаллизации в них

¹ Работы выполнены с использованием Биоресурсной коллекции редких и исчезающих видов рыб ЮНЦ РАН № 73602 при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-016-00208.

воды. Благодаря применению различных методов микроскопии, микрокиносъемки и рентгеноструктурного анализа достигнут значительный прогресс в изучении явлений кристаллизации жидкостей в организме и различных растворов – как содержащих, так и не содержащих органические вещества.

Очевидно, что в основе успеха криоконсервации лежит разработка такой методики (а впоследствии и технологии), которая сможет обеспечить:

- достаточно надежную защиту целостности клеточных органелл после процессов замораживания-оттаивания;
- необходимый запас энергетических веществ, обеспечивающих начало обменных процессов в клетках и тканях после двойного температурного шока.

Состояние проблемы

В процессе криоконсервирования клетки подвергаются воздействию целого комплекса стрессовых факторов, которые вызывают структурные и функциональные изменения различных субклеточных систем. Данные процессы могут развиваться на этапе, предшествующем замораживанию, в зоне положительных температур в присутствии криопротекторов, а также под влиянием охлаждения и(или) отогрева. Это относится и к таким важным приемам, как режимы замораживания и оттаивания образцов спермы, которые в большей степени обеспечивают сохранность клеток [6, 7].

Образование вне- и внутриклеточного льда является основной причиной повреждений клеток при охлаждении [8–13].

Анализируя механизмы криповреждений на различных уровнях биологической организации, можно прийти к заключению, что в основе отмирания живых структур после воздействия на них глубокого холода лежат необратимые криолитические изменения отдельных компонентов клетки, участвующих в ее структурно-функциональной организации и что наиболее чувствительны к криповреждениям биомембраны [14]. Возможными причинами криповреждений клеток могут быть также диспропорции активностей внутриклеточных ферментов, разбалансировка энергетических механизмов и необратимые сдвиги в механизмах транскрипции и трансляции. Однако соотношение этих процессов в клетке при охлаждении, равно как и степень их обратимости после замораживания-отогрева, остаются малоизученными.

Физико-химическое состояние мембран во многом определяет течение следующих важных процессов в клетке: биосинтез белка, нуклеиновых кислот и липидов, синтез и расход высокоэнергетических субстратов, транспорт веществ и утилизация различных промежуточных продуктов метаболизма [15].

Существенная роль в обеспечении жизнедеятельности клетки принадлежит митохондриям, которые осуществляют реакции окисления-восстановления, сопряженные с генерацией и аккумуляцией энергии, а также лизосомам, которые регулируют ряд ферментативных процессов [16]. Некоторые исследователи считают, что основной причиной гибели клеток во время их замораживания является именно криоразрушение митохондрий и лизосом [17, 18].

Низкие температуры вызывают существенные физико-химические перестройки липидных компонентов мембраны. В частности, это сопровождается фазовыми переходами липидов, их латеральным разделением в плоскости бислоя и образованием специфических закристаллизованных липидных доменов. Эти процессы нарушают функционирование мембраносвязанных ферментов, что в первую очередь отражается на кинетике каталитических белков, регулирующих активный транспорт ионов и биомолекул. Возникающие при этом нарушения могут изменить ионную асимметрию за счет увеличения (либо уменьшения) мембранной проницаемости [19, 20].

Неорганические компоненты и вода, входящие в состав мембраны, также оказывают существенное влияние на ее функционирование [21].

Результаты исследований структур клеток и их органелл свидетельствуют о том, что влияние глубокой заморозки может затронуть любые из их составляющих, что является немаловажным препятствием для сохранения целостности клеток и тканей при криоконсервации.

Неотъемлемый этап технологического процесса низкотемпературного консервирования биологических объектов – фазовый переход «вода – лед» – обуславливает возникновение целой цепочки повреждающих факторов, к которым, прежде всего, следует отнести дегидратацию и внутриклеточную кристаллизацию. Оптимальная скорость охлаждения, специфичная для конкретного типа клеток, обеспечивает баланс трансмембранного массообмена «клетка – окружающая среда», в результате которого обезвоживание клеток, с одной стороны, является

достаточным, чтобы исключить вероятность внутриклеточного льдообразования, а с другой – не достигает критического уровня, приводящего к неизбежному повреждению клеток. Существенную роль в этом процессе играют особенности строения плазматических мембран клеток, лимитирующих водный поток [22].

Целью настоящего исследования являлось установление оптимальных скоростей замораживания при криоконсервации спермы осетровых рыб, обеспечивающих сохранение структурных компонентов репродуктивных клеток.

Материалы и методы исследований

Материалом для исследований служили репродуктивные клетки русского осетра (*Acipenser gueldenstaedtii* Brandt&Ratzeburg, 1833) и стерляди (*Acipenser ruthenus* Linnaeus, 1758), полученные на осетровых рыбоводных заводах Астраханской области и Береговой научно-экспедиционной базе «Кагальник» Ростовской области в период нерестовой кампании.

Качество спермы осетровых рыб на всех этапах процесса криоконсервации определяли по принятой методике [23]. Согласно этой методике качество партии спермы оценивают по количеству спермиев в 1 мл материала (тыс. шт.), по количеству подвижных сперматозоидов от общего числа (в %) и по времени активности сперматозоидов по 5-балльной шкале Г. М. Персова (1953) [24] с помощью микроскопа и видеоокуляра. Исходя из результатов ранее проведенных исследований, в массив этих косвенных показателей был введен еще один – время жизни спермиев после их активации [25]. Здесь качество биологического материала оценивали по времени с момента активации до полной остановки последнего сперматозоида в поле зрения микроскопа.

Время подвижности регистрировали с помощью секундомера от начала движения до момента снижения активности сперматозоидов и до полной их остановки. Для криоконсервации использовали сперму активностью 4 и 5 баллов.

Криоконсервацию репродуктивных клеток проводили по разработанной ранее методике с использованием наиболее оптимальной криосреды [26, 27].

Использовали специальное устройство, позволяющее проводить замораживание в автоматическом режиме по заданным значениям – криофризер.

Сущность методики замораживания заключается в следующем. Замораживание биообъекта в парах азота происходит от начальной температуры до эвтектической. При достижении температуры значения криоскопической начинается этап кристаллообразования льда. Когда процесс кристаллообразования заканчивается, а температура по всему объему пробирки с биообъектом достигает эвтектической температуры, пробирку с биообъектом погружают в жидкий азот, продолжая ее замораживание до конечной температуры $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. После этого пробирку с биообъектом оставляют в жидком азоте для длительного хранения.

Из серии экспериментальных работ выбраны наиболее оптимальные скорости замораживания спермы осетровых рыб.

Проведено исследование следующих скоростей замораживания: $3\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ и ступенчатый режим ($6\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ в течение 6 мин, $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ в течение 4 мин, затем образцы погружали в жидкий азот).

Размораживание спермы проводили на водяной бане при температуре $38\text{--}40\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Опыты проводили в трехкратной повторности, данные подвергли статистической обработке по Г. Ф. Лакину (1973) [28] и Ю. П. Адлер (1969) [29].

Результаты

В первой серии экспериментов работы проводились со спермой русского осетра. Результаты представлены в табл. 1.

Таблица 1

Исследование режимов замораживания спермы русского осетра

Показатель	$3\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин}$		$10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин}$		Ступенчатый режим	
	Активность, %	Время жизни, с	Активность, %	Время жизни, с	Активность, %	Время жизни, с
Нативная	$97 \pm 0,15$	$450 \pm 0,50$	$97 \pm 0,15$	$450 \pm 0,50$	$97 \pm 0,15$	$450 \pm 0,50$
После эквilibрации	$89 \pm 0,24$	$400 \pm 0,60$	$70 \pm 0,12$	$200 \pm 0,51$	$53 \pm 0,33$	$120 \pm 0,38$
Дефростированная	$75 \pm 0,11$	$360 \pm 0,42$	$60 \pm 0,23$	$130 \pm 0,14$	$40 \pm 0,12$	$70 \pm 0,22$

На рис. 1 представлены результаты влияния различных режимов замораживания на качество дефростированной спермы русского осетра.

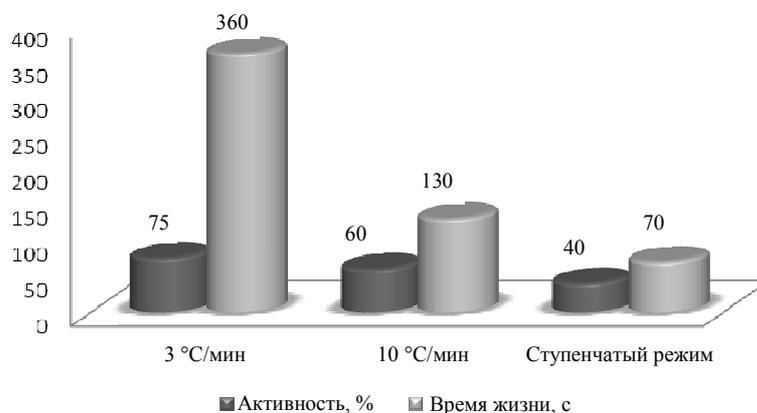


Рис. 1. Влияние скоростей замораживания на качество дефростированной спермы русского осетра

Как видно из рис. 1, наилучшей скоростью замораживания для спермы русского осетра оказалась скорость 3 °C/мин, как по активности, так и по времени жизни сперматозоидов после размораживания. Остальные режимы замораживания показали результаты хуже, однако необходимо учесть, что все три исследуемые скорости не снизили качество дефростированной спермы ниже рыбоводных показателей. Таким образом, все указанные скорости замораживания могут быть использованы при криоконсервации спермы этого вида рыб, в зависимости от тех или иных условий консервации.

Аналогичные эксперименты проведены для стерляди. Результаты влияния режимов замораживания на репродуктивные качества спермы представлены в табл. 2, на рис. 2.

Таблица 2

Исследование режимов замораживания спермы стерляди

Показатель	3 °C/мин		10 °C/мин		Ступенчатый режим	
	Активность, %	Время жизни, с	Активность, %	Время жизни, с	Активность, %	Время жизни, с
Нативная	95 ± 0,21	300 ± 0,32	95 ± 0,21	300 ± 0,32	95 ± 0,21	300 ± 0,32
После эквilibрации	77 ± 0,17	250 ± 0,40	85 ± 0,15	270 ± 0,24	50 ± 0,16	100 ± 0,31
Дефростированная	65 ± 0,15	200 ± 0,22	80 ± 0,18	250 ± 0,19	30 ± 0,11	60 ± 0,13

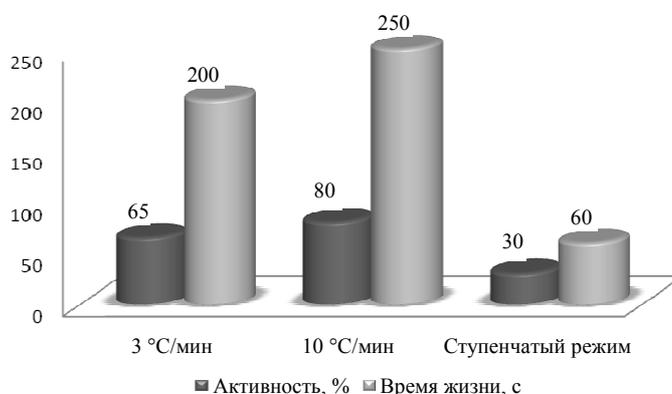


Рис. 2. Влияние скоростей замораживания на качество дефростированной спермы стерляди

При проведении работ со спермой стерляди меньшие повреждения после замораживания-оттаивания происходили при скорости заморозки 10 °С/мин, в то время как при тех же режимах и сравнительно высоком качестве спермы для русского осетра оптимальной явилась скорость 3 °С/мин. Скорость 3 °С/мин для спермы стерляди оказалась несколько хуже. Ступенчатый режим замораживания оказался значительно хуже в обоих случаях.

Выводы

К основным факторам криповреждений относят кристаллизацию вне- и внутриклеточной водной среды. Кристаллы в твердой фазе воды имеют не стационарный характер, а изменяются на ряде значений температур, меняя форму и размер, поэтому разрушения внутриклеточных структур имеют многоступенчатый характер.

Установлено, что этих разрушений можно избежать, изменяя скорости замораживания и оттаивания объектов.

Для осетровых рыб из испытываемых скоростей замораживания наиболее приемлемыми являются 3 °С/мин для русского осетра и 10 °С/мин для стерляди.

Полученные результаты указывают на то, что выбор скоростного режима замораживания спермы осетровых рыб является видоспецифичным.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Матишов Г. Г., Пономарев С. В., Баканева Ю. М., Болонина Н. В., Грозеску Ю. Н., Кокоза А. А., Распопов В. М., Пономарева Е. Н., Федоровых Ю. В., Лагуткина Л. Ю., Белая М. М., Бахарева А. А., Красильникова А. А. Справочник рыбовода. Инновационные технологии аквакультуры юга России / под ред. С. В. Пономарева. Ростов н/Д: Изд-во ЮНЦ РАН, 2013. 224 с.
2. Пономарева Е. Н., Тихомиров А. М., Богатырева М. М., Красильникова А. А. Криоконсервация репродуктивного материала рыб: разработ. Юж. науч. центра Рос. акад. наук // Современные рыбохозяйственные и экологические проблемы Азово-Черноморского региона: материалы VII Междунар. конф. (Керчь, 20–23 июня 2012 г.). Керчь: ЮгНИРО, 2012. С. 55–58.
3. Пономарева Е. Н., Красильникова А. А., Тихомиров А. М., Фирсова А. В. Новые биотехнологические методы криоконсервации репродуктивных клеток осетровых видов рыб // Юг России: экология, развитие. 2016. Т. 11. № 1. С. 59–68.
4. Пономарева Е. Н., Красильникова А. А., Фирсова А. В., Белая М. М. Криоконсервация репродуктивных клеток рыб: история и перспективы // Рыбное хозяйство. 2017. № 4. С. 85–88.
5. Красильникова А. А., Тихомиров А. М. Получение жизнеспособной молоди русского осетра с применением криоконсервированной спермы и оценка поведенческих реакций криопотомства // Сельскохозяйственная биология. 2018. Т. 53. № 4. С. 762–768.
6. Красильникова А. А., Тихомиров А. М. Объем замораживаемого образца как один из факторов выживаемости сперматозоидов осетровых видов рыб при криоконсервации // Естественные науки. 2014. № 2. С. 62–69.
7. Красильникова А. А., Тихомиров А. М. Корреляция объемов эндоцеллюлярного протектора в криозащитных средах и внутриклеточной жидкости сперматозоидов осетровых рыб // Естественные науки. 2015. № 3 (52). С. 105–111.
8. Mazur P. Causes of injury in frozen and thawed cells // Fed. Proc. 1965. V. 24. P. 175.
9. Pegg D. E. Ice crystals in tissues and organs // The Biophysics of Organ Cryopreservation. D. E. Pegg, A. M. Karow Jr. (Eds.). Plenum Publishing Corporation. 1978. P. 117–136.
10. Mazur P., Rall W. F., Rigopoulos N. The relative contributions of the fraction of unfrozen water and of salt concentration to the survival of slowly frozen human erythrocytes // Biophys. J. 1981. V. 36. P. 653.
11. Toner M., Cravalho E. G., Stachecki J., Fitzgerald T., Tompkins R. G., Yarmuch M. L., Armant D. R. Nonequilibrium freezing of one-cell mouse embryos // Biophys. J. 1993. V. 64. P. 1908–1921.
12. Seki S., Mazur P. The temperature and type of intracellular ice formation in preimplantation mouse embryos as a function of the developmental stage // Biol. Reprod. 2010. V. 82 (6). P. 1198–1205.
13. Spindler R., Rosenhahn B., Hofmann N., Glasmacher B. Video analysis of osmotic cell response during cryopreservation // Cryobiology. 2012. V. 64 (3). P. 250–260.
14. Белоус А. М., Бондаренко Т. П., Бондаренко В. А. Молекулярные механизмы криповреждений мембранных структур // Биохимия и криомедицина. 1979. Вып. 5. С. 3–13.
15. Белоус А. М., Бондаренко В. А. Структурные изменения биологических мембран при охлаждении. Киев: Наукова думка, 1982. 255 с.
16. Поликар А., Беси М. Элементы патологии клетки. М.: Мир, 1970. 348 с.
17. Пушкарь Н. С., Полякова А. И., Цуцаева А. А. Низкотемпературная консервация лимфоцитов // Проблемы гематологии и переливания крови. 1974. № 7. С. 23–26.

18. Скорняков Б. А., Осташко Ф. И. Нарушения ультраструктуры спермиев при низкотемпературной консервации // Криобиология и криомедицина. 1975. Вып. 1. С. 97–101.
19. Hajos F., Csilag A., Kalman M. The morphology of microtubules incubated synaptosomes // Exp. Brain. Res. 1979. N. 2. P. 387–393.
20. Merzhan H. T. Absence of unfrozen freezable water in rapidly frozen red cells // Cryobiology. 1970. N. 4–6. P. 252–255.
21. Александров В. Я., Арронет Н. И., Денько Е. И. Влияние тяжелой воды (D₂O) на устойчивость растительных и животных клеток, клеточных моделей и белка к некоторым денатурационным воздействиям // Цитология. 1959. № 1. С. 679–691.
22. Чернобай Н. А., Гурина Т. М., Пахомов А. В. Криозащитная эффективность ряда криопротекторов в зависимости от скорости охлаждения // Проблемы криобиологии. 2011. Т. 21. № 3. С. 273–279.
23. Цветкова Л. И., Савушкина С. И., Титарева Л. Н., Докина О. Б., Пронина Н. Д. Методическое пособие по криоконсервации спермы карпа, лососевых и осетровых видов рыб. М.: ВНИИПРХ, 1997. 11 с.
24. Персов Г. М. Дозирование спермиев как способ управления оплодотворением яйцеклеток осетровых // Докл. АН СССР. 1953. Т. 90. № 6. С. 1183–1185.
25. Тихомиров А. М. Результаты криоконсервации сперматозоидов себрюги с использованием разных криопротекторов // Консервация генетических ресурсов: материалы XVI совещ. Пушино: ИБК РАН, 2002. С. 56–61.
26. Богатырева М. М. Оптимизация методов криоконсервации спермы для сохранения генофонда осетровых рыб: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Астрахань, 2010. 20 с.
27. Красильникова А. А. Совершенствование процесса криоконсервации репродуктивных клеток самцов рыб: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Астрахань, 2015. 24 с.
28. Лакин Г. Ф. Биометрия: учеб. пособие. М.: Высш. шк., 1973. 343 с.
29. Адлер Ю. П. Введение в планирование эксперимента. М.: Металлургия, 1969. 155 с.

Статья поступила в редакцию 21.01.2019

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Белая Мария Михайловна – Россия, 344006, Ростов-на-Дону; Федеральный исследовательский центр Южный научный центр Российской академии наук; канд. биол. наук; научный сотрудник; mashabogat@gmail.com.

Красильникова Александра Андриановна – Россия, 344006, Ростов-на-Дону; Федеральный исследовательский центр Южный научный центр Российской академии наук; канд. биол. наук; старший научный сотрудник; Россия, 414056, Астрахань; Астраханский государственный технический университет; научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории «Биотехнологии сохранения и воспроизводства ценных видов рыб»; alexandra.kras@yandex.ru.



IMPACT OF FREEZING SPEED ON BREEDING QUALITIES OF STURGEON SPERM

M. M. Belaya¹, A. A. Krasilnikova^{1,2}

¹*Southern Scientific Center, Russian Academy of Sciences,
Rostov-on-Don, Russian Federation*

²*Astrakhan State Technical University,
Astrakhan, Russian Federation*

Abstract. The article describes the methods of cryopreservation which provides the reliable protection of cell organelles integrity after freezing-defrosting processes, as well as the needed supply of organic substances generating metabolic process in cells and tissues after a double temperature shock, and helps to achieve a significant progress in the cell long-term storage. There are considered the aspects of low temperature preservation of sturgeon sperm. Reproductive cells of Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii* Brandt & Ratzeburg, 1833) and sterlet (*Acipenser ruthenus* Linnaeus, 1758) obtained at sturgeon hatcheries of the Astrakhan region and the research-expeditionary base “Kagalnik” in the Rostov region during spawning campaign served as the material

for research. The purpose of the work was to establish optimal freezing rates during sturgeon sperm cryopreservation process that could ensure saving structural components of reproductive cells. It has been found that the freezing rate is species-specific. The best freezing speed for Russian sturgeon sperm proved to be 3°C/min. When experimenting with sterlet sperm there was registered less damage after freezing and defrosting at 10°C/min. Freezing speed 3°C/min was found less effective for sterlet sperm. Staged freezing process showed worse results in both cases. However, the quality of defrosted sperm didn't get lower the fish breeding standards in all three studied speeds, which justifies sturgeon sperm freezing at all three rates subject to different conditions of preservation.

Key words: cell, cryopreservation, cryoinjury, freezing rates, sturgeon, sperm.

For citation: Belaya M. M., Krasilnikova A. A. Impact of freezing speed on breeding qualities of sturgeon sperm. *Vestnik of Astrakhan State Technical University. Series: Fishing Industry*. 2019;1:83-90. (In Russ.) DOI: 10.24143/2073-5529-2019-1-83-90.

REFERENCES

1. Matishov G. G., Ponomarev S. V., Bakaneva Iu. M., Bolonina N. V., Grozesku Iu. N., Kokoza A. A., Raspopov V. M., Ponomareva E. N., Fedorovykh Iu. V., Lagutkina L. Iu., Belaia M. M., Bakhareva A. A., Krasil'nikova A. A. *Spravochnik rybovoda. Innovatsionnye tekhnologii akvakul'tury iuga Rossii* [Fish breeder's reference book. Innovation aquaculture technologies of the south of Russia]. Pod redaktsiei S. V. Ponomareva. Rostov-na-Donu, Izd-vo IuNTs RAN, 2013. 224 p.
2. Ponomareva E. N., Tikhomirov A. M., Bogatyreva M. M., Krasil'nikova A. A. Kriokonservatsiia reproduktivnogo materiala ryb: razrabotki Iuzhnogo nauchnogo tsentra Rossiiskoi akademii nauk [Cryopreservation of reproductive fish material: development of the Southern Research Centre of the Russian Academy of Sciences]. *Sovremennye rybokhoziaistvennye i ekologicheskie problemy Azovo-Chernomorskogo regiona: materialy VII Mezhdunarodnoi konferentsii (Kerch', 20–23 iyunia 2012 g.)*. Kerch', IugNIRO, 2012. Pp. 55-58.
3. Ponomareva E. N., Krasil'nikova A. A., Tikhomirov A. M., Firsova A. V. Novye biotekhnologicheskie metody kriokonservatsii reproduktivnykh kletok osetrovyykh vidov ryb [Modern biotechnological methods of cryopreservation of sturgeon reproductive cells]. *Iug Rossii: ekologiia, razvitie*, 2016, vol. 11, no. 1, pp. 59-68.
4. Ponomareva E. N., Krasil'nikova A. A., Firsova A. V., Belaia M. M. Kriokonservatsiia reproduktivnykh kletok ryb: istoriia i perspektivy [Cryopreservation of fish reproductive cells: history and future]. *Rybnoe khoziaistvo*, 2017, no. 4, pp. 85-88.
5. Krasil'nikova A. A., Tikhomirov A. M. Poluchenie zhiznesposobnoi molodi russkogo osetra s primeneniem kriokonservirovannoi spermy i otsenka povedencheskikh reaktsii kriopotomstva [Receiving viable Russian sturgeon juveniles from cryopreserved sperm and evaluating behavioral reactions of cryo-offsprings]. *Sel'skokhoziaistvennaia biologiia*, 2018, vol. 53, no. 4, pp. 762-768.
6. Krasil'nikova A. A., Tikhomirov A. M. Ob'em zamorazhivaemogo obraztsa kak odin iz faktorov vyzhivaemosti spermatozoidov osetrovyykh vidov ryb pri kriokonservatsii [Amount of a frozen sample as a factor of sturgeon spermatozooids survival under cryopreservation]. *Estestvennye nauki*, 2014, no. 2, pp. 62-69.
7. Krasil'nikova A. A., Tikhomirov A. M. Korreliatsiia ob'emov endotselliuliarnogo protektora v kriozashchitnykh sredakh i vnutrikletochnoi zhidkosti spermatozoidov osetrovyykh ryb [Correlation of volumes of endocellular protector in cryoprotective environments and endocellular liquid of sturgeon spermatozooids]. *Estestvennye nauki*, 2015, no. 3 (52), pp. 105-111.
8. Mazur P. Causes of injury in frozen and thawed cells. *Fed. Proc.*, 1965, vol. 24, pp. 175.
9. Pegg D. E. Ice crystals in tissues and organs. *The Biophysics of Organ Cryopreservation*. D. E. Pegg, A. M. Karow Jr. (Eds.). Plenum Publishing Corporation, 1978, pp. 117-136.
10. Mazur P., Rall W. F., Rigopoulos N. The relative contributions of the fraction of unfrozen water and of salt concentration to the survival of slowly frozen human erythrocytes. *Biophys. J.*, 1981, vol. 36, pp. 653.
11. Toner M., Cravalho E. G., Stachecki J., Fitzgerald T., Tompkins R. G., Yarmuch M. L., Armant D. R. Nonequilibrium freezing of one-cell mouse embryos. *Biophys. J.*, 1993, vol. 64, pp. 1908-1921.
12. Seki S., Mazur P. The temperature and type of intracellular ice formation in preimplantation mouse embryos as a function of the developmental stage. *Biol. Reprod.*, 2010, vol. 82 (6), pp. 1198-1205.
13. Spindler R., Rosenhahn B., Hofmann N., Glasmacher B. Video analysis of osmotic cell response during cryopreservation. *Cryobiology*, 2012, vol. 64 (3), pp. 250-260.
14. Belous A. M., Bondarenko T. P., Bondarenko V. A. Molekuliarnye mekhanizmy kriopovrezhdenii membrannykh struktur [Molecular mechanisms of cryoinjuries of membrane structures]. *Biokhimiia i kriomeditsina*, 1979, iss. 5, pp. 3-13.
15. Belous A. M., Bondarenko V. A. *Strukturnye izmeneniia biologicheskikh membran pri okhlazhdenii* [Structural changes of biological membranes under freezing]. Kiev, Naukova dumka Publ., 1982. 255 p.

16. Polikar A., Besi M. *Elementy patologii kletki* [Pathological elements of a cell]. Moscow, Mir Publ., 1970. 348 p.
17. Pushkar' N. S., Poliakova A. I., Tsutsaeva A. A. Nizkotemperaturnaia konservatsiia limfotsitov [Low temperature preservation of lymphocytes]. *Problemy gematologii i perelivaniia krovi*, 1974, no. 7, pp. 23-26.
18. Skorniakov B. A., Ostashko F. I. Narusheniia ul'trastruktury spermiev pri nizkotemperaturnoi konservatsii [Injuries in sperm ultrastructure under low temperature preservation]. *Kriobiologiya i kriomeditsina*, 1975, iss. 1, pp. 97-101.
19. Hajos F., Csilag A., Kalman M. The morphology of microtubules incubated synaptosomes. *Exp. Brain Res.*, 1979, no. 2, pp. 387-393.
20. Meruman N. T. Absence of unfrozen freezable water in rapidly frozen red sells. *Cryobiology*, 1970, no. 4-6, pp. 252-255.
21. Aleksandrov V. Ia., Arronet N. I., Den'ko E. I. Vliianie tiazheloi vody (D2O) na ustoichivost' rastitel'nykh i zhivotnykh kletok, kletochnykh modelei i belka k nekotorym denaturatsionnym vozdeistviyam [Influence of heavy water (D2O) on resistivity of plantcells and zooblasts, cell modules and protein to some denaturation impacts]. *Tsitologiya*, 1959, no. 1, pp. 679-691.
22. Chernobai N. A., Gurina T. M., Pakhomov A. V. Kriozashchitnaia effektivnost' riada krioprotektorov v zavisimosti ot skorosti okhlazhdeniia [Cryoprotective efficiency of different cryoprotectors relative to freezing speed]. *Problemy kriobiologii*, 2011, vol. 21, no. 3, pp. 273-279.
23. Tsvetkova L. I., Savushkina S. I., Titareva L. N., Dokina O. B., Pronina N. D. *Metodicheskoe posobie po kriokonservatsii spermy karpa, lososevykh i osetrovykh vidov ryb* [Study guide on cryopreservation of carp, salmon and sturgeon species sperm]. Moscow, VNIIPRKh, 1997. 11 p.
24. Persov G. M. Dozirovanie spermiev kak sposob upravleniia oplodotvoreniiem iaitsekletok osetrovykh [Dozing sperms as a method to control sturgeon ovum fertilization]. *Doklady AN SSSR*, 1953, vol. 90, no. 6, pp. 1183-1185.
25. Tikhomirov A. M. Rezul'taty kriokonservatsii spermatozoidov sevriugi s ispol'zovaniem raznykh krioprotektorov [Results of cryopreservation of stellate sturgeon spermatozooids using different cryoprotectors]. *Konservatsiia geneticheskikh resursov: materialy KhVI soveshchaniia*. Pushchino, IBK RAN, 2002. Pp. 56-61.
26. Bogatyreva M. M. *Optimizatsiia metodov kriokonservatsii spermy dlia sokhraneniia genofonda osetrovykh ryb. Avtoreferat dis. kand. biol. nauk* [Optimization of sperm cryopreservation methods to save sturgeon gene pool]. Astrakhan', 2010. 20 p.
27. Krasil'nikova A. A. *Sovershenstvovanie protsessa kriokonservatsii reproduktivnykh kletok samtsov ryb. Avtoreferat dis. kand. biol. nauk* [Improving cryopreservation process of fish male reproductive cells]. Astrakhan', 2015. 24 p.
28. Lakin G. F. *Biometriia: uchebnoe posobie* [Biometrics: teaching aid]. Moscow, Vysshiaia shkola Publ., 1973. 343 p.
29. Adler Iu. P. *Vvedenie v planirovanie eksperimenta* [Introduction into experiment planning]. Moscow, Metallurgiya Publ., 1969. 155 p.

The article submitted to the editors 21.01.2019

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Belaya Maria Mikhailovna – Russia, 344006, Rostov-on-Don; Federal Research Centre Southern Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences; Candidate of Biology; Researcher; mashabogat@gmail.com.

Krasilnikova Alexandra Andrianovna – Russia, 344006, Rostov-on-Don; Federal Research Centre Southern Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences; Candidate of Biology; Senior Researcher; Russia, 414056, Astrakhan; Astrakhan State Technical University; Researcher of the Laboratory of Biotechnologies of Preserving and Reproducing Valuable Fish Species; alexandra.kras@yandex.ru.

