

9. Kamel, T. M. M. (1996). Effect of tyrosine supplementation on the fertility of Egyptian balady goats. M.Sc. Fac. Agric Zagazig Univ. (Banha), Egypt. [<http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=EG9702155>].
10. Rae, R. C. and Ingalls, J. R. (1984). Lactational response of dairy cows to oral administration of L-Tyrosine. J. Dairy sci., 67: 1430-1438. [<http://sci-hub.cc/http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030284814587>].
11. Sevi, A. M., Albenzio, R., Marino, A., and Muscio, A. (2004). Effects of lambing season and stage of lactation on ewe milk quality. Small Ruminant Research, 51(3): 251-259. [<http://sci-hub.cc/http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0921448803001962>].
12. Cownie, Y. 1990: Current technologies for synchronization and artificial insemination of sheep. In: Reproductive physiology of merino sheep. C.M. Oldham, C.M., Martin, G.B., Gartin and Purvis, University of Western Australia, 1990, p. 207.
13. Harper, H. A., Rod-Well, V. W. and Mayes (1980). Review of physiological chemistry 17<sup>th</sup> edition. Long Medical Publications, Middle East Edition. 265-272. [https://www.vanaraamat.ee/H\\_A\\_Harper\\_V\\_W\\_Rodwell\\_P\\_A\\_Mayes\\_Review\\_of\\_Physiological\\_Chemistry\\_Lange\\_Medical\\_Publ\\_16575-58.htm](https://www.vanaraamat.ee/H_A_Harper_V_W_Rodwell_P_A_Mayes_Review_of_Physiological_Chemistry_Lange_Medical_Publ_16575-58.htm)
14. Samad M. A., Haque M. M., Shah M. K., Islam M. R., Mia M. C. (2014). Evaluation of TSH, T4 and T3 in human serum: standardization on normal individuals American Journal of Modern Physics 2013; 2(4): 202-207
15. Wikipedia, (2009). Tyrosine. The GNU Free Documentation License. Wikipedia® is a registered trademark of the Wikimedia Foundation, Inc., a U.S. registered 501(c) (3) taxdeductible nonprofit charity. <https://en.wikipedia.org/wiki/Tyrosine>

УДК [57.086.13]:[639.3.034]:[53.096]

### **ПОДБОР ТЕМПЕРАТУРНЫХ РЕЖИМОВ ЗАМОРАЖИВАНИЯ ПРИ КРИОКОНСЕРВАЦИИ ЯЙЦЕКЛЕТОК БЕЛОРЫБИЦЫ<sup>1</sup>**

*Ангелина Валерьевна Фирсова*, аспирант, Астраханский государственный технический университет, Российская Федерация, 414056, г. Астрахань, ул. Татищева, 16, [firsovaangelina1991@mail.ru](mailto:firsovaangelina1991@mail.ru)

Сохранение генетического разнообразия ценных видов рыб является одной из основных задач современной аквакультуры. В настоящее время использование методов низкотемпературного консервирования остается одним из наиболее привлекательных и быстроразвивающихся направлений сохранения редких исчезающих видов. Для сохранения генофонда ценных видов рыб широко применяется метод глубокой заморозки их спермы. Но до сих пор не решен вопрос с криоконсервацией икры рыб. Большое значение при криоконсервации клеток имеет скорость снижения температуры. Целью работы явилось определить оптимальный температурный режим замораживания при криоконсервации яйцеклеток белорыбицы. Материалом служила икра белорыбицы. Изучено действие на икру белорыбицы двух режимов замораживания – сверхбыстрого и медленного. При использовании метода сверхбыстрой заморозки 33% яйцеклеток после дефростации оказались с поврежденной оболочкой. Оттаивание икры, консервированной методом медленной заморозки, показало, что яйцеклетки внешне целые, лишь единичные икринки с поврежденной оболочкой. В обоих вариантах в яйцеклетках произошли внутренние перестройки. В результате исследований было выявлено, что криоконсервация икры белорыбицы методом

---

<sup>1</sup> Работа выполнена в рамках проекта «Разработка технических средств, биотехнологий выращивания нетрадиционных видов рыб и беспозвоночных для прогресса аквакультуры Южного и Северо-Западного федеральных округов России» (соглашение № 14.607.21.0163 от 03.10.2016, уникальный идентификатор RFMEFI60716X0163). (The work was carried out within the framework of the project "Development of technical facilities, biotechnologies for the cultivation of non-traditional fish and invertebrates for aquaculture progress in the Southern and North-Western federal districts of Russia" (agreement No. 14.607.21.0163 dated 03.10.2016, unique identifier RFMEFI60716X0163).)

медленного замораживания позволяет получить большее количество неповрежденных яйцеклеток после оттаивания.

**Ключевые слова:** сохранение генофонда, яйцеклетка, половые продукты рыб, криопротектор, белорыбца, криоконсервация, режим замораживания

## SELECTION OF THE TEMPERATURE REGIMES OF FREEZING DURING CRYOPRESERVATION OF INCONNU OOCYTES

*Firsova Angelina V.*, postgraduate student, Astrakhan State Technical University, 16 Tatisheva Str., Astrakhan, 414056, Russian Federation, firsovaangelina1991@mail.ru

Preservation of valuable fish species genetic diversity is one of the main aims of modern aquaculture. At present, the use of low temperature preservation methods remains one of the most attractive and fast-growing ways of rare and endangered species conservation. The method of deep freezing of valuable fish sperm is applied for gene pool preserving today. However, the issue of eggs preservation doesn't have solution. The importance of cryopreservation of cells has a rate of decrease in temperature. The aim of this work was to determine the optimum temperature of freezing during cryopreservation of inconnu oocytes. The material of investigation was inconnu eggs. The effect on the eggs of inconnu from the two modes of freezing – fast and slow was studied. 33% of oocytes after thawing had a damaged shell when using the method of ultrafast freezing. Thawing eggs, frosting by the slow freezing showed that eggs externally whole, only a few eggs with a damaged shell. In both cases, the eggs have an internal adjustment. As a result of studies it was found that cryopreservation of inconnu eggs by the method of slow freezing allows you to obtain a greater number of intact oocytes after thawing.

**Keywords:** gene pool conservation, oocytes, sexual products of fishes, cryoprotectors, inconnu, cryopreservation, regime of freezing

В настоящий момент использование методов низкотемпературного консервирования остается привлекательным и быстроразвивающимся направлением сохранения редких исчезающих видов. Глубокое замораживание яйцеклеток и эмбрионов рыб является одной из центральных задач в области криобиологии этого класса животных [1].

Скорость замораживания при криоконсервации клеток имеет важное значение для получения ожидаемого результата. Установлено, что когда охлаждение происходит достаточно медленно, клетки могут быстро терять воду за счет осмоса [2]. С другой стороны, если охлаждение происходит слишком быстро, внеклеточный раствор уменьшается быстрее, чем внутриклеточный, в результате чего последний в конечном итоге образуют внутриклеточные кристаллы льда, оказывающиеся смертельными для клеток [3].

В связи с вышеизложенным целью исследований явилось определить наиболее подходящий метод криоконсервации икры белорыбца – сверхбыстрый или медленный.

Работы проводили на Александровском рыбноводном заводе в Астраханской области в ноябре 2016 г. Материалом для исследований служила икра белорыбца от двух самок. В качестве криопротектора использовали смесь триглицеридов. Медленное замораживание проводили со скоростью 2°/мин до  $t = -70$  °C с дальнейшим погружением в жидкий азот ( $t = -196$  °C).

Получение икры у белорыбца проводили методом отцеживания. Яйцеклетки перемешивали с криопротектором и помещали в ампулы Эппендорфа с дальнейшим их размещением в стаканы для сосуда Дьюара.

Для выполнения криоконсервации икры по методике медленного замораживания использовали электронный термометр, термопару которого прикрепляли к стакану с пробами. С помощью секундомера фиксировали время и следили за скоростью понижения температуры (рис. 1). Стакан с пробами медленно погружали в сосуд Дьюара с жидким азотом с такой скоростью, чтобы понижение температуры не превышало 2 градуса в минуту.



Рис. 1. Термометр с прикрепленной к стакану термопарой и секундомер

Криоконсервацию икры белорыбицы по методике сверхбыстрого замораживания выполняли путем быстрого погружения стакана с пробами в жидкий азот (1500 градусов в минуту).

Оттаивание икры от самки №1, криоконсервированной с использованием смеси триглицеридов в качестве криопротектора методом сверхбыстрой заморозки, показало, что 1/3 часть яйцеклеток после размораживания оказались с поврежденной оболочкой. При увеличении видно, что в яйцеклетках произошли внутренние перестройки – жировые и желточные вакуоли слились (рис. 2а), в отличие от нативной икры, у которой вакуоли заполняют всю клетку равномерно (рис. 2б). Данный результат был получен и на икре от самки № 2.

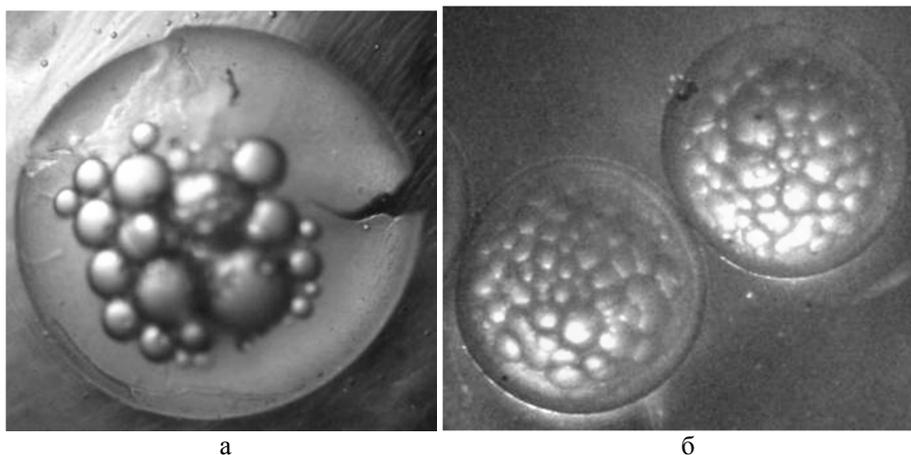


Рис. 2. Яйцеклетка белорыбицы с поврежденной оболочкой и внутренними перестройками после криоконсервации методом сверхбыстрой заморозки (а) и нативная икра белорыбицы (б)

Оттаивание икры от самки № 1, консервированной с использованием смеси триглицеридов в качестве криопротектора методом медленной заморозки, показало, что яйцеклетки внешне целые, лишь единичные икринки с поврежденной оболочкой. При увеличении видно, что у всех яйцеклеток произошли внутренние перестройки (рис. 3). Но у единичных икринок эти перестройки на начальных стадиях. Данный результат был получен и на икре от самки № 2.

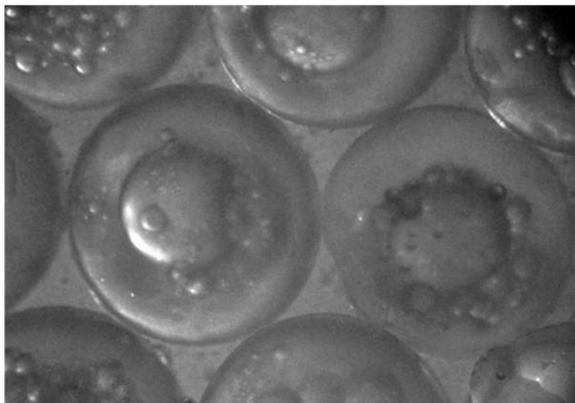


Рис. 3. Яйцеклетки белорыбицы после криоконсервации медленным методом

Таким образом, проведенный эксперимент показал, что криоконсервация икры белорыбицы методом медленного замораживания позволяет получить большее количество внешне неповрежденных яйцеклеток после оттаивания.

Вероятно, для получения ожидаемого результата криоконсервацию нативной икры белорыбицы рекомендуется проводить методом медленного замораживания.

В связи с тем, что эксперимент был проведен с использованием лишь двух самок, необходимо провести дальнейшие исследования в этом направлении.

#### **Список литературы**

1. **Пономарева Е. Н.** Криоконсервация репродуктивных клеток рыб: история и перспективы / Е.Н. Пономарева, А.А. Красильникова, А.В. Фирсова, М.М.Белая // Рыбное хозяйство, 2017. - №4. – С.85-88.
2. **Meryman H. T.** Freezing injury from “solution effect” and its prevention by natural or artificial cryoprotectant / H.T. Meryman, R.T. Williams, M.S.J. Douglas // *Cryobiology*, 1977. - № 14(3). – P. 287-302.
3. **Zhang T.** Low-temperature preservation of fish gonad cells and oocytes. In: Badin PJ, Cerdà J, Lubzens E. (ed.) *The fish oocytes: from basic studies to biotechnological applications* / T. Zhang, D.M. Rawson, I. Pekarsky, I. Blais, E. Lubzens // New York: Springer, 2007. - P.411-436.

#### **References**

1. Ponomareva E.N., Krasil'nikova A.A., Firsova A.V., Belaja M.M. Kriokonservacija reproduktivnyh kletok ryb: istorija i perspektivy [Cryopreservation of fish reproductive cells: history and prospects]. *Rybnoe hozjajstvo [Fisheries]*, 2017, no 4, pp.85-88.
2. Meryman H.T., Williams R.T., Douglas M.S.J. Freezing injury from “solution effect” and its prevention by natural or artificial cryoprotectant. *Cryobiology*, 1977. no 14(3), pp. 287-302.
3. Zhang T., Rawson D.M., Pekarsky I., Blais I., Lubzens E. Low-temperature preservation of fish gonad cells and oocytes. In: Badin PJ, Cerdà J, Lubzens E. (ed.) *The fish oocytes: from basic studies to biotechnological applications*. New York, Springer, 2007, pp.411-436.