

УДК 593.95:57.086.13

С. Кампос*, Е. Паредес, Х. Тронкосо

Чи можливо подовжити життєздатність яйцеклітин морського їжака за умов гіпотермічного зберігання?

UDC 593.95:57.086.13

S. Campos*, E. Paredes, J. Troncoso

Can Sea Urchin Eggs Shelf-Life Be Extended by Cold Storage?

Ключові слова: морський їжак, яйцеклітина, кріоконсервування, гіпотермічне зберігання.

Key words: sea urchin, eggs, cryopreservation, cold storage.

Кріоконсервування біологічних об'єктів тваринного походження найчастіше застосовувалося для розведення великої рогатої худоби, а також для збереження тварин, які знаходяться під загрозою зникнення [5, 6]. Лише в 70-х роках минулого століття з'явилися перші публікації щодо використання цих технологій до водних організмів, а в 90-х роках кріоконсервуванню гамет, інших клітин, а також тканин морських та прісноводних організмів вже була присвячена велика кількість робіт [1, 8].

Останнім часом кріоконсервування широко використовується в аквакультурі, програмах генетичної селекції та збереження морських ресурсів, зокрема і для забезпечення доступності цих матеріалів для досліджень, використання в тестах на екоотоксичність, збереження природної різноманітності незалежно від сезонного репродуктивного циклу тварин. Наразі є певні успіхи у кріоконсервуванні гамет, ембріонів і личинок морських безхребетних [4, 10]. Однак питання кріоконсервування яйцеклітин гідробіонтів на сьогодні залишається невирішеним.

Морських їжаків розглядають як модельний об'єкт для досліджень у галузі репродукції і біології розвитку, а саме: для дослідження взаємодії сперматозоїдів і яйцеклітин, ранньої диференціації клітин, різних стадій розвитку личинок, а також для вивчення процесів апоптозу [3, 9]. Завдяки чутливості гамет і ембріонів морських їжаків та їхніх личинок на ранніх стадіях розвитку до забруднювальних речовин у морській воді (навіть у низьких концентраціях) ці тварини широко застосовуються в екоотоксикології. До сьогодні не вдалося вирішити проблему кріоконсервування яй-

Cryopreservation has been applied to animals almost exclusively towards cattle and endangered animals [5, 6]. It was not until the 70's that we found studies applied to aquatic organisms and in the 90's a mass of research on cryopreservation of gametes, and other cells and tissues of marine and freshwater organisms was accomplished [1, 8].

Recently cryopreservation has been applied in aquaculture production, genetic selection programs and conservation in marine environments. Through this technique, genetic resources are available for research, toxicity tests, or conservation whenever this material is needed, regardless of the seasonal reproductive circle of the animal. Gametes, embryos and larvae of marine invertebrates have been cryopreserved with different levels of success through the years [4, 10]. However, oocyte cryopreservation of aquatic organisms is still under research.

Sea urchins are considered as model organisms to study the larvae biology and different development events, reproduction and early cell differentiation, sperm-oocyte interaction and apoptosis [3, 9]. They have also been considerably used in ecotoxicology due to gamete and early stages sensitivity to pollutants in seawater, even at low concentrations. Cryopreservation of sea urchin eggs is yet to be successfully achieved as is well known that the cell is very sensitive and easily damaged by the freezing process [8]. Eggs have been shown to be more challenging to cryopreserve due to quite a few reasons: large size and consequently their low surface area to volume ratio, high water and lipid content, low permeability and high sensitivity to chemicals in water.

Центр морських досліджень CIM, Університет Віго, Група ECOCOST, Відділення екології та біології тварин, Віго, Іспанія

Centro de Investigación Marítima CIM, Universidade de Vigo, Grupo ECOCOST, Dept. Ecología e Bioloxía Animal, Vigo, Spain

*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52
електронна пошта: sara.campos.rosende@uvigo.es

*To whom correspondence should be addressed:

23, Pereyaslavka str., Kharkiv, Ukraine 61016;
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952
e-mail: sara.campos.rosende@uvigo.es

Надійшла 17.06.2021

Прийнята до друку 14.12.2021

Received 17, June, 2021

Accepted 14, December, 2021

© 2022 S. Campos, et al. Published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

цеклітин морського їжака, зокрема через їхній великий розмір і, як наслідок, через низьке співвідношення площі поверхні до об'єму, високий вміст води та ліпідів, низьку проникність і високу чутливість до вмісту різних речовин у воді [8].

Мета дослідження — оцінка можливості зберігання яйцеклітин морських їжаків за гіпотермічних умов без заморожування для подовження строку їх життєздатності.

Яйцеклітини морського їжака *Paracentrotus lividus* використовували для вивчення впливу низької температури на їхню життєздатність у морській воді з різними концентраціями Ca^{2+} у присутності кріопротекторів. Відомо, що іони Ca^{2+} беруть участь у заплідненні та активації клітин [11]. До того ж припускається, що іони кальцію відповідальні за функціональні наслідки пошкодження плазматичної мембрани [2, 12]. При цьому, як і в дослідженнях на рибах [13], кріопротектори додавали для перевірки здатності їх до захисту клітин від холододових пошкоджень.

Яйцеклітини виділяли зі статевозрілих морських їжаків *P. lividus*, яких вирощували у неволі, потім гамети витримували при 4°C протягом 5, 20, 40 хв та 1, 2, 4, 24 годин із використанням штучної морської води (ШМВ) з різною концентрацією Ca^{2+} (100, 75, 50, 25, 0% від початкової концентрації у ШМВ). Штучну морську воду готували з внесенням солей у концентраціях і порядку додавання, зазначених у таблиці, у 70% від бажаного кінцевого об'єму розчину [7]. Після цього його безперервно перемішували щонайменше протягом години для збалансування карбонатної системи. Потім розчин доводили до потрібного об'єму (1 л) шляхом додавання води і вимірювали фізико-хімічні параметри: рН ($8,0 \pm 0,2$) і солоність ($34 \pm 0,5$) ‰.

Розчини різних найбільш поширених кріопротекторів (диметилсульфоксид (ДМСО), етиленгліколь (ЕГ) і пропіленгліколь (ПГ)), приготовані у фільтрованій морській воді (ФМВ; фільтрована через сітку 0,22 мкм і опромінена ультрафіолетом в УФА-діапазоні), у кінцевій концентрації 1 М одразу додавали до розчину ШМВ, в якому зберігалися яйцеклітини. Після закінчення експозиції при 4°C (5, 20, 40 хв та 1, 2, 4, 24 години) яйцеклітини відфільтровували, переносили в ФМВ, запліднювали та інкубували в пластикових контейнерах об'ємом 20 мл при 18°C протягом 48 годин. Після цього ембріони фіксували формальдегідом і підраховували відсоток ембріонів, які розвиваються, по відношенню до загальної кількості яйцеклітин.

Показано, що після додавання ЕГ при 5-хвилинній експозиції і 4°C кількість ембріонів, які

Порядок додавання та концентрація солей для виготовлення 1 л штучної морської води [7]

Order and quantity of salts needed to make 1 L of artificial sea water [7]

Послідовність додавання Order	Сіль Salt	Кількість, г/л Amount, g/L
1	NaF	0.003
2	SrCl ₂ 6H ₂ O	0.024
3	Na ₂ B ₄ O ₇ 10 H ₂ O	0.0475
4	KBr	0.100
5	KCl	0.700
6	CaCl ₂ 2 H ₂ O	1.47
7	Na ₂ SO ₄	4.00
8	MgCl ₂ 6H ₂ O	10.78
9	NaCl	23.50
10	NaHCO ₃	0.200

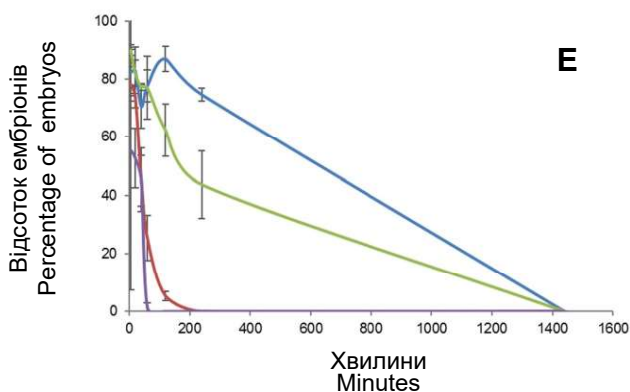
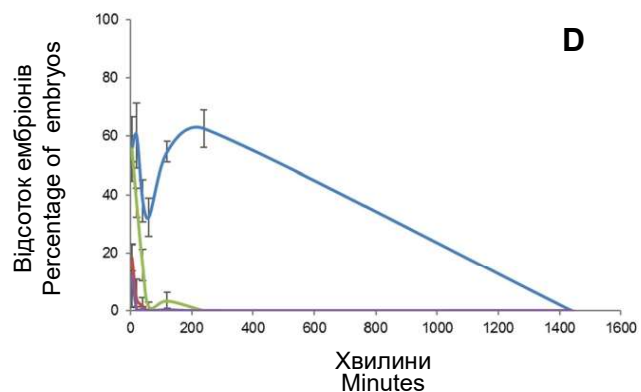
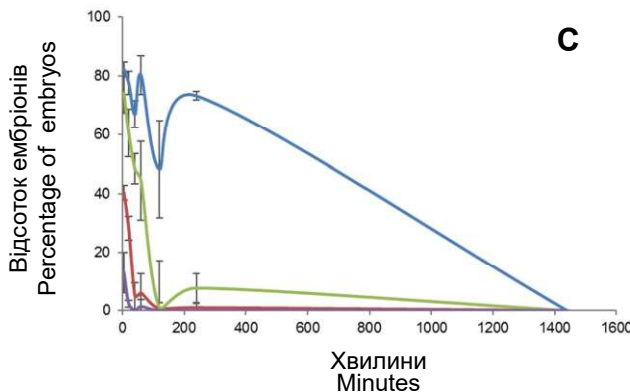
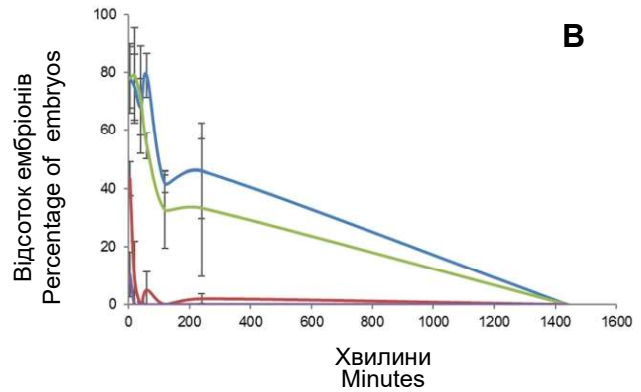
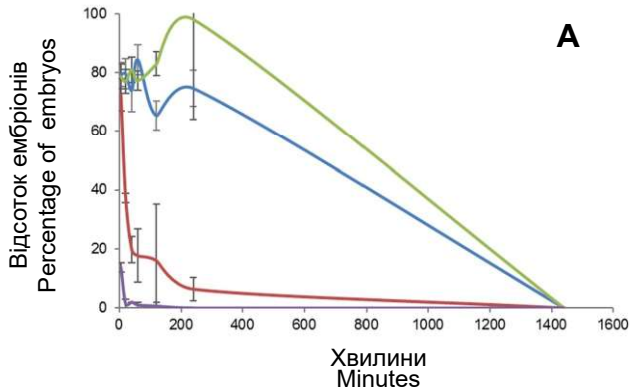
The aim of this study was to see if sea urchin oocytes can be kept at low temperatures without freezing to extend their viability.

Sea urchin *Paracentrotus lividus* eggs were used to see the effects of low temperature in seawater with different Ca^{2+} concentrations on the viability of these cells in the presence of several cryoprotecting agents (CPAs). Ca^{2+} ions take part in fertilization and cell activation events [11] as well as calcium ions have been proposed as mediators of the functional consequences of plasma membrane injury [2, 12], and CPAs were added in order to test if they could protect the cells against chilling injury as it has been studied with fish [13].

Eggs were collected from mature sea urchins *P. lividus* reared in captivity. The gametes were kept at 4°C for 5', 20', 40', 1 hr, 2 hrs, 4 hrs and 24 hrs using artificial seawater (ASW) with decreasing concentrations of Ca^{2+} (100%, 75%, 50%, 25%, 0% of initial concentration in ASW). ASW was made by adding the salts in the quantity and order indicated in table in 70% of the desired final volume [7]. The solution was kept stirring continuously for at least 1 hour to balance the carbonate system. Then, it was even to the desired volume, 1 L in this case, and measured the physicochemical parameters, these were: рН (8.0 ± 0.2) and salinity (34 ± 0.5 ‰).

розвиваються, складала 80%, ДМСО — ~60% та ПГ — ~15%. За умов збільшення тривалості холодової експозиції понад годину кількість ембріонів, які розвиваються, зменшувалася до нуля після 24 годин експозиції. При цьому зниження концентрації Ca^{2+} також впливало на зменшення кількості ембріонів, що розвиваються (рисунок).

Also, 1M final concentration of different CPAs prepared with Filtered Sea Water (FSW, filtered through 0.22 μm mesh and UVA radiated) (dimethyl sulfoxide (DMSO), ethylene glycol (EG) and propylene glycol (PG), the most used ones in cryopreservation studies) was added in 1 step to the solution of ASW containing the eggs before cold storage. Once the



Відсоток ембріонів, які розвиваються за умов застосування штучної морської води зі 100% (A), 75% (B), 50% (C), 25% (D), 0% (E) Ca^{2+} та різних криопротекторів: контроль — синя лінія, ДМСО — червона лінія, ЕГ — зелена лінія, ПГ — фіолетова лінія.

Percentage of development through time for artificial seawater with 100% (A), 75% (B), 50% (C), 25% (D), 0% (E) Ca^{2+} and different CPAs: control – blue line, DMSO – red line, EG – green line, PG – purple line.

Таким чином, результати цього дослідження показали, що гіпотермічне зберігання в поєднанні з використанням різних криопротекторів і Ca^{2+} в декількох концентраціях впливає на яйцеклітини морського їжака. Застосування ШМВ із низькими концентраціями Ca^{2+} та присутність криопротекторів не запобігає виникненню пошкоджень клітин

exposure time (5', 20', 40', 1 hr, 2 hrs, 4 hrs and 24 hrs) to 4°C had passed, they were filtered, transferred to Filtered Sea Water, fertilized and incubated in 20 ml plastic vessels at 18°C for 48 hours. After 48 hrs, the embryos were fixed with formaldehyde and the developing embryo rate (percentage of developing eggs out of total eggs number) was measured.

Results have shown that up to 80% of the developing embryo rate was reached when using EG and 5 minutes of cold exposure at 4°C, followed by DMSO (~60%) and PG (~15% developing embryo rate) after

під час зберігання, що супроводжується зниженням їх життєздатності. Отже, яйцеклітини морського їжака можливо утримувати за вищеписаних умов лише протягом короткого часу (не довше години). При цьому яйцеклітини морського їжака можуть зберігатися у ФМВ без додавання будь-яких інших речовин за кімнатної температури (18–20°C) протягом 8 годин і утримувати високий рівень життєздатності, тобто використання низьких позитивних температур не збільшує термін їх зберігання.

Література

1. Asturiano JF, Cabrita E, Horváth Á. Progress, challenges and perspectives on fish gamete cryopreservation: a mini-review. *Gen Comp Endocrinol.* 2017; 245: 69–76.
2. Farber JL. The role of calcium ions in toxic cell injury. *Environmental health perspectives*, 1990; 84, 107–11.
3. Giudice G. The sea urchin embryo: a developmental biological system. Springer Science & Business Media; 2012. 248p.
4. Gwo JC. Cryopreservation of oyster (*Crassostrea gigas*) embryos. *Theriogenology.* 1995; 43(7): 1163–74.
5. Leibo SP, Loskutoff NM. Cryobiology of *in vitro*-derived bovine embryos. *Theriogenology.* 1993; 39 (1): 81–94.
6. Leibo SP, Songsasen N. Cryopreservation of gametes and embryos of nondomestic species, *Theriogenology.* 2002; 57 (1): 303–26.
7. Lorenzo JI, Nieto O, Beiras R. Effect of humic acids on speciation and toxicity of copper to *Paracentrotus lividus* larvae in seawater. *Aquat Toxicol.* 2002; 58(1–2): 27–41.
8. Martínez-Páramo S, Horváth Á, Labbé C, *et al.* Cryobanking of aquatic species. *Aquaculture.* 2017; 472: 156–77.
9. Paredes E. Biobanking of a marine invertebrate model organism: The sea urchin. *J Mar Sci Eng.* 2016 January 22 [Cited 17.06.2021]; 4(1): 7. Available from: <https://www.mdpi.com/2077-1312/4/1/7/htm>
10. Ribeiro MB, Furley T, Spago FR, Paredes E. First steps towards *Echinometra lucunter* embryo cryopreservation. *Cryobiology.* 2018; 80: 51–4.
11. Santella L, Lim D, Moccia F. Calcium and fertilization: the beginning of life. *Trends in biochemical sciences.* 2004; 29(8): 400–8.
12. Vogel SS, Smith RM, Baibakov B, *et al.* Calcium influx is required for endocytotic membrane retrieval. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1999; 96(9): 5019–24.
13. Zhang T, Rosendo EP. Importance of studying chilling injury in cryopreservation of fish gametes. *Cryobiology.* 2020; 97: 278–9.

48 h post-fertilization. On the other hand, an exposure time at 4°C longer than 1 hr resulted in a drop of the percentage of development down to zero after 24 hours. The decreasing concentrations of Ca²⁺ also seemed to cause an effect as a slightly decreased in development was observed (figure).

This study showed that low temperatures, different type of cryoprotectants and different concentrations of Ca²⁺ in combination affect sea urchin eggs. Using ASW with lower concentrations of Ca²⁺ do not protect against chilling injury, neither does the presence of CPAs without affecting their viability. So it seems that we can only maintain them for a very short period of time (no longer than 1hr) under these conditions and not affect their viability. Sea urchin eggs can be kept in FSW without the addition of any substances at room temperature (18–20°C) for 8 h and still be perfectly viable, which means that using low temperatures above 0°C do not increase their shelf-life.

References

1. Asturiano JF, Cabrita E, Horváth Á. Progress, challenges and perspectives on fish gamete cryopreservation: a mini-review. *Gen Comp Endocrinol.* 2017; 245: 69–76.
2. Farber JL. The role of calcium ions in toxic cell injury. *Environmental health perspectives*, 1990; 84, 107–11.
3. Giudice G. The sea urchin embryo: a developmental biological system. Springer Science & Business Media; 2012. 248 p.
4. Gwo JC. Cryopreservation of oyster (*Crassostrea gigas*) embryos. *Theriogenology.* 1995; 43(7): 1163–74.
5. Leibo SP, Loskutoff NM. Cryobiology of *in vitro*-derived bovine embryos. *Theriogenology.* 1993; 39 (1): 81–94.
6. Leibo SP, Songsasen N. Cryopreservation of gametes and embryos of nondomestic species, *Theriogenology.* 2002; 57 (1): 303–26.
7. Lorenzo JI, Nieto O, Beiras R. Effect of humic acids on speciation and toxicity of copper to *Paracentrotus lividus* larvae in seawater. *Aquat Toxicol.* 2002; 58(1–2): 27–41.
8. Martínez-Páramo S, Horváth Á, Labbé C, *et al.* Cryobanking of aquatic species. *Aquaculture.* 2017; 472: 156–77.
9. Paredes E. Biobanking of a marine invertebrate model organism: The sea urchin. *J Mar Sci Eng.* 2016 January 22 [Cited 17.06.2021]; 4(1): 7. Available from: <https://www.mdpi.com/2077-1312/4/1/7/htm>
10. Ribeiro MB, Furley T, Spago FR, Paredes E. First steps towards *Echinometra lucunter* embryo cryopreservation. *Cryobiology.* 2018; 80: 51–4.
11. Santella L, Lim D, Moccia F. Calcium and fertilization: the beginning of life. *Trends in biochemical sciences.* 2004; 29(8): 400–8.
12. Vogel SS, Smith RM, Baibakov B, *et al.* Calcium influx is required for endocytotic membrane retrieval. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1999; 96(9), 5019–24.
13. Zhang T, Rosendo EP. Importance of studying chilling injury in cryopreservation of fish gametes. *Cryobiology.* 2020; 97: 278–9.