

Выживаемость эмбрионов лягуса (*Colisa Lalia*, Hamilton–Buchanan, 1822) после инкубации в криозащитных средах

UDC 547.42:591.3

К.В. МИКСОН*, Е.Ф. КОПЕЙКА, Т.П. ЛИННИК

Survival of Dwarf Gourami (*Colisa Lalia*, Hamilton–Buchanan, 1822) Embryos After Incubation in Cryoprotective Media

В работе изучали влияние криопротекторов на выживаемость эмбрионов *Colisa lalia* на стадии развития перед выклевом. Показано, что состав криозащитной среды и температура инкубации оказывают статистически значимое влияние на развитие эмбрионов; 30-минутная инкубация эмбрионов при температуре 2°C как в контроле, так и в криозащитных средах приводит к значительным тератогенным изменениям в ходе дальнейшего онтогенеза; инкубация эмбрионов при 28°C в криозащитных средах, содержащих 1 М сахарозы и 1,32 М этиленгликоля, не оказывает статистически значимого негативного влияния на выживаемость и появление аномально развивающихся эмбрионов; включение в состав криозащитных сред таких криопротекторов, как ацетилэтаноламид, N,N-диметилформамид, формамид в концентрациях 0,96, 0,8 и 1,87М соответственно, при 15-минутной инкубации приводит к повышению смертности эмбрионов и поэтому их использование для разработки методов криоконсервирования эмбрионов рыб требует дальнейших исследований.

Ключевые слова: эмбрионы рыб, *Colisa lalia*, криопротекторы, амиды.

Вивчали вплив криопротекторів на виживаність ембріонів *Colisa lalia* на стадії розвитку перед викльовуванням. Показано, що склад криозахисного середовища і температура інкубації статистично значно впливають на розвиток ембріонів; 30-хвилинна інкубація ембріонів при 2°C як в контролі, так і в криозахисних середовищах приводить до значних тератогенних змін в процесі подальшого онтогенезу; інкубація ембріонів при 28°C в криозахисних середовищах, які містять 1 М сахарози і 1,32 М етиленгліколю, не має значного негативного впливу на виживаність і появу ембріонів, які аномально розвиваються. Додавання до криозахисних середовищ таких криопротекторів, як ацетилетаноламід, N,N-диметилформамід, формамід в концентраціях 0,96; 0,8; 1,87 М відповідно, протягом 15-хвилинної інкубації збільшує смертність ембріонів, тому для розробки методів криоконсервування ембріонів рыб необхідні подальші дослідження.

Ключові слова: ембріони рыб, *Colisa lalia*, криопротектори, амід.

The influence of cryoprotectants on survival rate of *Calisa lalia* at stage before hatching was studied. It was found that the composition and incubation temperature significantly influenced the embryonic development; incubation for 30 minutes at 2°C led to significant teratogenic alterations in ontogenesis of both control and cryoprotectant-treated experimental groups as well; incubation of embryos at 28°C with cryoprotective media, containing 1 M sucrose and 1.32 M ethylene glycol did not lead to significant decrease in survival rate and appearance of abnormally developing embryos; embryos incubation for 15 min with N-acetyl ethanolamide, N,N-dimethylformamide and formamide in concentration of 0.96, 0.8 and 1.87M, correspondingly led to the increase of mortality level and therefore the use of these cryoprotectants necessitated an additional study.

Key-words: fish embryos, *Colisa lalia*, cryoprotectants, amides.

До настоящего времени задача криоконсервирования яйцеклеток и эмбрионов рыб не решена [8, 18]. Основными причинами этого являются большие размеры яйцеклеток, высокая гетерогенность внутриклеточных структур, низкая проницаемость мембран и большой объем желточного мешка эмбрионов [20]. Насыщение криозащитными средами и дегидратация биологических объектов – существенный этап криоконсервирования, однако, несмотря на большое количество работ, посвященных подготовке к криоконсервированию эмбрионов и ооцитов пресноводных рыб [4, 6], до настоящего времени поиск эффективных криозащитных сред остается актуальной задачей.

Основными модельными объектами, на которых проводились эксперименты по подготовке эмбрионов рыб к замораживанию, служили эмбрионы *Brachidanio rerio* [10, 13, 14], *Carassius auratus* [17], *Cyprinus carpio* [7, 9, 21], у которых диаметр оплодотворенной икринки соответствовал 1,2–2,5 мм. В ходе экспериментов была показана низкая выживаемость эмбрионов при обработке их такими криопротекторами, как диметилсульфоксид (ДМСО), метанол (МЕ), глицерин (Гл) и их комбинациями [5, 10, 17]. В связи с низкой проницаемостью хориона и эмбриональных мембран увеличивается время инкубации эмбрионов в криозащитных средах, что приводит к их гибели

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, г. Харьков

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

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:
ул. Перейславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-31-26, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта: cryo@online.kharkov.ua

* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereiaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 3126, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

еще до замораживания вследствие токсичности криопротекторов [4, 19].

Для уменьшения времени контакта эмбрионов с криопротекторами повышали проницаемость хориона, используя аквапорин [11] выбирали стадии развития эмбрионов с наибольшей проницаемостью [21] и подбирали подходящие температурные условия насыщения [13, 21]. Однако эмбрионы при замораживании погибали от внутриклеточной кристаллизации [13].

Учитывая, что скорость насыщения эмбрионов рыб криопротекторами зависит от их поверхностно-объемных характеристик, определяемых наружным диаметром икринок [12, 13], нам представляется перспективным использование в исследованиях более мелких объектов, например эмбрионов *C. lalia*.

Мы предположили, что эмбрионы *C. lalia*, развивающиеся в икринке диаметром 0,6–0,7 мм, имеющей маленькое перивителлиновое пространство, могут быстрее насыщаться криопротектором, чем более крупные эмбрионы рыб.

Наиболее устойчивые стадии развития эмбрионов к токсичности криопротекторов – стадии с наименьшим содержанием желтка и более однородными структурами эмбриональных клеток [4].

Цель данной работы – изучение влияния криопротекторов на выживаемость эмбрионов *C. lalia* на стадии развития перед выклевом.

Материалы и методы

Работу выполняли на эмбрионах лягушки (*Colisa lalia*, Hamilton–Buchanan, 1822). Оплодотворенную икру получали от половозрелых особей при естественном нересте в условиях *ex situ*. Производителей отбирали из общей стаи. Самцов и самок содержали отдельно в стеклянных аквариумах емкостью 40 л при контролируемой температуре 28°C. Подготовленных для нереста производителей отсаживали попарно в нерестовые

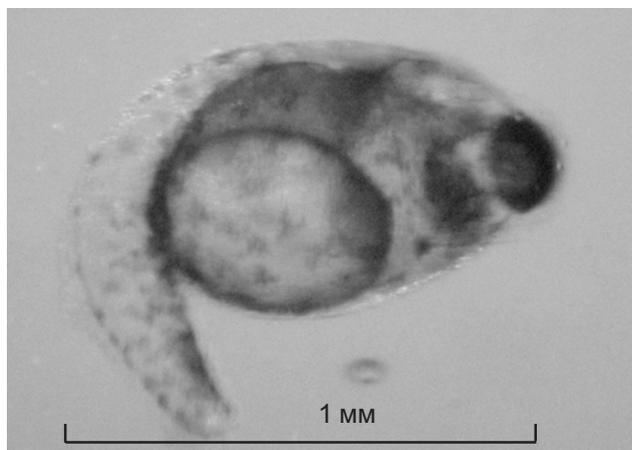


Рис. 1. Эмбрион *C. lalia* на стадии развития 28 ч (перед выклевом, хорион удален).

емкости объемом 10 л. Качество подготовленных производителей определяли визуально. Нерест, как правило, происходил на вторые сутки после отсаживания производителей в нерестовые емкости. Это время необходимо самцу для постройки гнезда. Для контроля эмбрионы на разных стадиях развития отбирали микропипеткой и их развитие оценивали визуально с помощью микроскопа МБС-9.

В экспериментах использовали эмбрионы на стадии развития 28 ч (рис. 1).

Для определения влияния на развитие и выживаемость эмбрионов применяли 8 криопротекторов: сахароза (Сах), этиленгликоль (ЭГ), ацетамид (АА), N,N-диметилацетамид (ДМАЦ), ацетилморфолин (АЦМОР), ацетилэтаноламид (АЭА), N,N-диметилформамид (ДМФА), формамид (ФА).

Эмбрионы (15–20 штук) переносили в 0,5 мл 1М раствора Сах на 10 мин, после чего к этому раствору добавляли 40 мкл ЭГ и выдерживали их еще 5 мин. Затем эмбрионы помещали на шугу льда, к ним добавляли 30 мкл АА или 40 мкл одного из исследуемых криопротекторов и выдерживали в полученных криозащитных растворах в течение 15 мин.

Таким образом, конечная концентрация криопротекторов составляла 1М Сах (рис. 2. I, J), 1,32М ЭГ (рис. 2. А, В, С, D, Е, F, G, H) и 0,94, 0,8, 0,64, 0,8, 0,96 и 1,87М для растворов, содержащих АА (рис. 2. А), ДМАЦ (рис. 2. В), АЦМОР (рис. 2. С), АЭА (рис. 2. D), ДМФА (рис. 2. Е) и ФА (рис. 2. F) соответственно.

После этого эмбрионы 3-кратно отмывали водой комнатной температуры (20°C) и помещали в воду с оптимальными условиями инкубации (28°C).

Для определения влияния криозащитных сред в экспериментах подсчитывали количество выживших и аномально развивающихся эмбрионов. После чего по общему количеству эмбрионов рассчитывали процент выживших и аномально развивающихся эмбрионов.

Эмбриональное и постэмбриональное развитие оценивали визуально в течение 3-х суток в условиях оптимального содержания до перехода предличинок на активное питание.

Статистический анализ результатов проводили с помощью компьютерной программы “Statistica” [2]. Статистическую значимость различий в экспериментальных группах определяли методом ANOVA (тест Дункана, $p < 0,05$). На рис. 2 и 3 результаты представлены как среднее \pm стандартная ошибка с указанием статистически значимых различий между экспериментальными группами.

Результаты и обсуждение

Для достижения витрификации, которая в настоящее время является наиболее перспективным направлением в криобиологических исследованиях

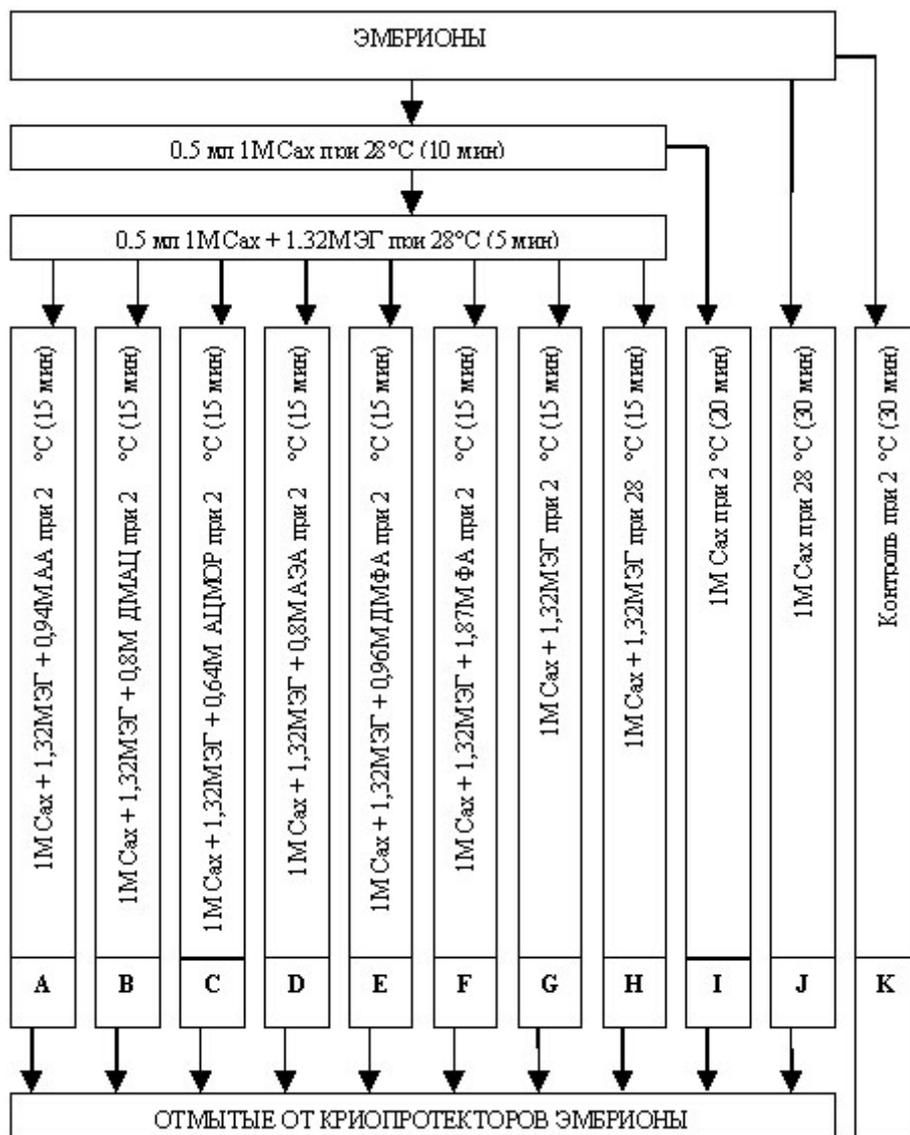


Рис. 2. Общая схема эксперимента.

на эмбрионах рыб, необходимо использовать высокие концентрации криопротекторов [12]. Поэтому в наших исследованиях использовались высокие концентрации веществ, обладающих криозащитными свойствами.

На рис. 3 представлены результаты выживаемости эмбрионов в криозащитных средах при различных температурах. Установлено, что наибольший процент выживших эмбрионов при инкубации с температурой 2°C наблюдался при их обработке криопротекторами АА $82,72 \pm 1,31$ (рис. 3. А); АЦМОР $82,97 \pm 9,7$ (рис. 3. С); Сах+ЭГ $91,17 \pm 2,35$ (рис. 3. G) и Сах $94,9 \pm 2,0$ (рис. 3. I).

Криопротекторы АЭА (рис. 3. D), ДМФА (рис. 3. E), ФА (рис. 3. F) в комбинациях с Сах (рис. 3. I) и Сах + ЭГ (рис. 3. G) оказались наиболее токсичными для эмбрионов, в то время как использование криопротекторов АА (рис. 3. А) и АЦМОР

(рис. 3, С) не приводило к статистически значимому увеличению показателя смертности.

Мы считаем, что для определения криозащитных сред можно использовать Сах (рис. 2, 3. J) и ЭГ в комбинации с Сах (рис. 2, 3. H). Выживаемость при данных концентрациях в оптимальных температурных условиях инкубации (28°C) составляет $94,3 \pm 2,4\%$ в отличие от метанола (1–3 М) в комбинациях с Сах (0,5 М). В данном случае максимальная выживаемость составляла $55 \pm 5\%$ [3]. При обработке эмбрионов этими же криопротекторами (рис. 2, 3. G, I) при температуре 2°C в течение последующих 15 мин статистически значимых отличий не установлено ($94,9 \pm 2,0$ и $91,17 \pm 2,28$) по сравнению с эмбрионами, инкубированными при 28°C ($96,53 \pm 1,95$ и $94,3 \pm 2,4$).

Выживаемость эмбрионов в контроле, инкубируемых 30 мин при температуре 2°C, составляла 100%.

Для дальнейшего изучения влияния криозащитных сред на постэмбриональное развитие эмбрионы содер-

жались в течение 3-х суток в оптимальных условиях до перехода предличинок на активное питание. При этом учитывалось появление аномальных признаков развития (рис. 4).

Для снижения токсичного влияния криопротекторов на эмбрионы в процессе их обработки температуру инкубации временно (на 15 мин) понижали до 2°C [15, 16].

Во время инкубации эмбрионов в растворах 1М Сах и 1,32 М ЭГ в течение 30 мин при оптимальной температуре (28°C) статистически значимых отличий, влияющих на тератогенные изменения в ходе дальнейшего постэмбрионального развития, не выявлено (рис. 5. J, H). Добавление в криозащитные среды таких криопротекторов, как А, В, С, Е вызвало серьезные отклонения в постэмбриональном развитии $50,81 \pm 5,42$, $52,42 \pm 12,38$, $65,97 \pm 11,03$ и $47,27 \pm 4,1\%$ соответственно.

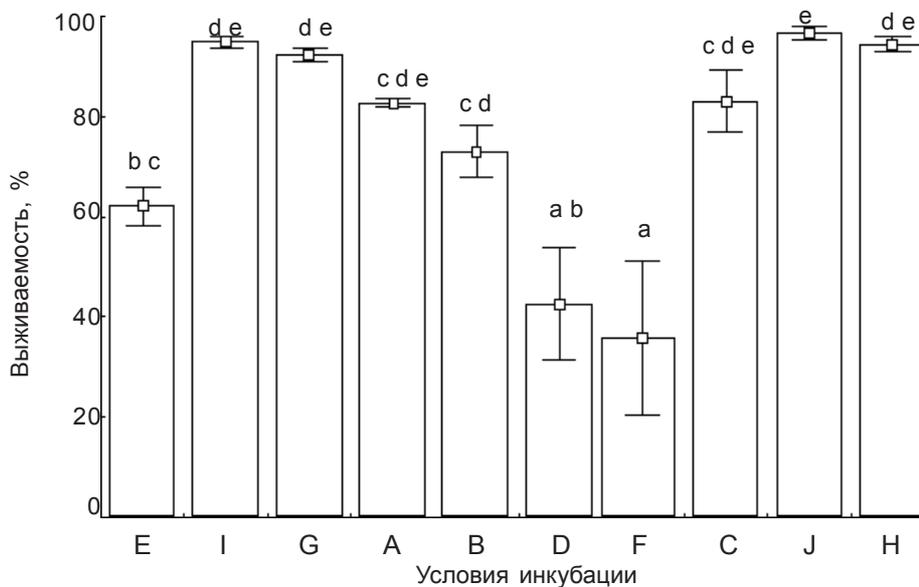


Рис. 3. Выживаемость эмбрионов *C. lalia* после инкубации в криозащитных средах при различных температурах. Статистически значимые различия наблюдались у групп, не содержащих одинаковые символы (ANOVA, тест Дункана, $p < 0,05$, $n=5$). \perp – среднее \pm ст. ошибка; \square – среднее.

Выживаемость эмбрионов при обработке их криозащитными средами 1М Сах и 1,32М ЭГ (рис. 3. G, I) достаточно высокая, но при охлаждении до 2°C наблюдаются значительные отклонения от нормального развития (рис. 5. G, I). Мы предполагаем, что на аномальное развитие повлияло также охлаждение эмбрионов во время инкубации в криозащитных средах. О видоспецифической чувствительности эмбрионов к охлаждению сообщалось ранее в работах [12, 15].

Криопротекторные свойства амидов на эмбрионах рыб в настоящее время не исследованы. Мы изучили влияние амидов в связи с их высокой проницаемостью, которая была показана на клетках другого типа – спермиях петухов [1]. Таким образом, представленные в работе результаты по токсическому действию этой группы криопротекторов являются новыми.

Полученные в работе данные позволяют сделать выводы о том, что не только токсичность криопротекторов, но и временное охлаждение существенно влияют на дальнейшие условия инкубации эмбрионов *C. lalia* и являются определяющими при поиске метода криоконсервирования.

Выводы

Состав криозащитной среды и температура инкубации оказывают статистически значимое влияние на развитие эмбрионов *C. lalia*.

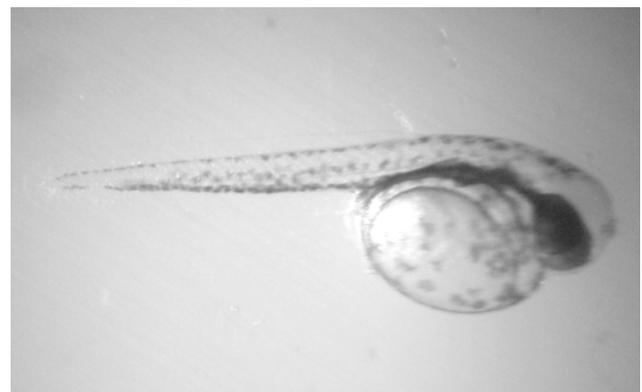
Инкубация эмбрионов *C. lalia* в течение 30 мин при температуре 2°C как в контроле, так и в криозащитных средах приводит к значительным тератогенным изменениям при дальнейшем онтогенезе.

Инкубация эмбрионов *C. lalia* при 28°C в криозащитных средах, содержащих 1М Сах и 1,32М ЭГ, в течение 30 мин не оказывает статистически значимых негативных влияний на выживаемость и появление аномально развивающихся эмбрионов.

Включение в состав криозащитных сред таких криопротекторов, как АЭА, ДМФА, ФА в концентрациях 0,96, 0,8 и 1,87 М соответственно в течение 15 мин увеличивает смертность эмбрионов после инкубации, поэтому их использование для разработки методов криоконсервирования эмбрионов рыб требует дальней-

ших исследований.

Полученные результаты важны при определении состава криозащитных сред для криокон-



a



б

Рис. 4. Фотографии эмбрионов *C. lalia* на стадии развития 40 ч: а – нормальное развитие (28°C); б – аномальное развитие после охлаждения в течение 30 мин (К) при 2°C.

сервирования эмбрионов пресноводных рыб.

Дальнейшие исследования по криоконсервированию эмбрионов рыб необходимо проводить с учетом оптимальных температур инкубации и использованием наименее токсичных криопротекторов, входящих в состав криозащитных сред.

Литература

1. Линник Т.П., Бизикина О.В. Криоконсервирование спермы петухов. II. Криопротекторная активность амидов и диолов // Пробл. криобиологии.– 2001.– №4.– С. 43–51.
2. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ Statistica.– М.: МедиаСфера, 2002.– 312 с.
3. Ahammad M.M., Bhattacharyya D., Jana B.B. Effect of different concentrations of cryoprotectant and extender on the hatching of indian major carp embryos (*Labeo rohita*, *Catla catla*, and *Cirrhinus mrigala*) stored at low temperature // Cryobiology.– 1998.– Vol. 37, N4.– P. 318–324.
4. Bart A.N. New approaches in cryopreservation of fish embryos / In: Cryopreservation in Aquatic Species. Ed. by T.R. Tiersch, P.M. Mazik.– Baton Rouge, USA: The World Aquaculture Society, 2000.– P. 179–187.
5. Beirao J., Robles V., Herraes M.P. et al. Cryoprotectant microinjection toxicity and chilling sensitivity in gilthead seabream (*Sparus aurata*) embryos // Aquaculture.– 2006.– Vol. 261, N3.– P. 897–903.
6. Blaxter J.H.S. Development: Eggs and larve / In: Fish Physiology. Ed. by W.S. Hoar, D.J. Randall.– New York: Academic Press, 1955.– Vol. III.– P. 177–253.
7. Calvi S.L., Maise G. Cryopreservation of carp (*Cyprinus carpio*) blastomers // Aquat. Living Resour.– 1999.– Vol. 12, N1.– P. 71–74.
8. Ding F.H., Xiao Z.Z., Li J. Preliminary studies on the vitrification of red sea bream (*Pagrus major*) embryos // Theriogenology.– 2007.– Vol. 68, N5.– P. 702–708.
9. Dinnyes A., Urbanyi B., Baranyai B., Magyary I. Chilling sensitivity of carp (*Cyprinus carpio*) embryos at different development stages in the presence or absence of cryoprotectants: work in progress // Theriogenology.– 1998.– Vol. 50, N1.– P. 1–13.
10. Hagedorn M., Peterson A., Mazur P., Kleinhans F.W. High ice nucleation temperature of zebrafish embryos: slow-freezing is not an option // Cryobiology.– 2004.– Vol. 49, N2.– P. 181–189.
11. Hagedorn M., Lance S.L., Fonseca D.M. et al. Altering fish embryos with aquaporin-3: an essential step toward successful cryopreservation // Biol. Reprod.– 2002.– Vol. 67, N3.– P. 961–966.
12. Hagedorn M., Kleinhans F.W. Problems and prospects in cryopreservation of fish embryos / In: Cryopreservation in Aquatic Species. Ed. by T.R. Tiersch, P.M. Mazik.– Baton Rouge, USA: The World Aquaculture Society, 2000.– P. 161–178.
13. Hagedorn M., Kleinhans F.W., Wildt D.E., Rall W.F. Chilling sensitivity and cryoprotectant permeability of dechorionated zebrafish embryos, *Brachydanio rerio* // Cryobiology.– 1997, N3.– Vol. 34.– P. 251–263.
14. Hagedorn M., Hsu E.W., Pilatus U. et al. Magnetic resonance microscopy and spectroscopy reveal kinetics of cryoprotectant permeation in a multicompartiment biological system // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.– 1996.– Vol. 93.– P. 7454–7459.
15. Isayeva A., Zhang T., Rawson D.M. Studies on chilling sensitivity of zebra-fish (*Danio rerio*) oocytes // Cryobiology.– 2004.– Vol. 49, N2.– P. 114–122.
16. Liu X.H., Zhang T., Rawson D.M. Effect of cooling rate and partial removal of yolk on the chilling injury in zebrafish (*Danio rerio*) embryos // Theriogenology.– 2001.– Vol. 55, N8.– P. 1719–1731.
17. Liu K.C., Chou T.C., Lin H.D. Cryosurvival of goldfish embryo after subzero freezing // Aquat. Living Resour.– 1993.– Vol. 6, N1.– P. 63–66.
18. Lubzens E., Pekarsky I., Blais I. Cryopreservation of Fish Oocytes: Can this be Achieved? / The First International Workshop on the Biology of Fish Sperm.– Vodnany, Czech Republic, 2007.– P. 60.
19. Robles V., Cabrera E., Fletcher G.L. et al. Vitrification assays with embryos from a cold tolerant sub-arctic fish species // Theriogenology.– 2005.– Vol. 64.– N 7.– P. 1633–1646.
20. Zhang T.T. Cryopreservation of Gametes and Embryos of Aquatic Species / In: Life in the Frozen State. Ed. by B.J. Fuller, N. Lane, E.E. Benson.– London: CRC Press, 2004.– P. 415–436.
21. Zhang X.S., Zhao L., Hua T.C. et al. A study on the cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio*) embryos // Cryo-Letters.– 1989.– Vol. 10.– P. 271–278.

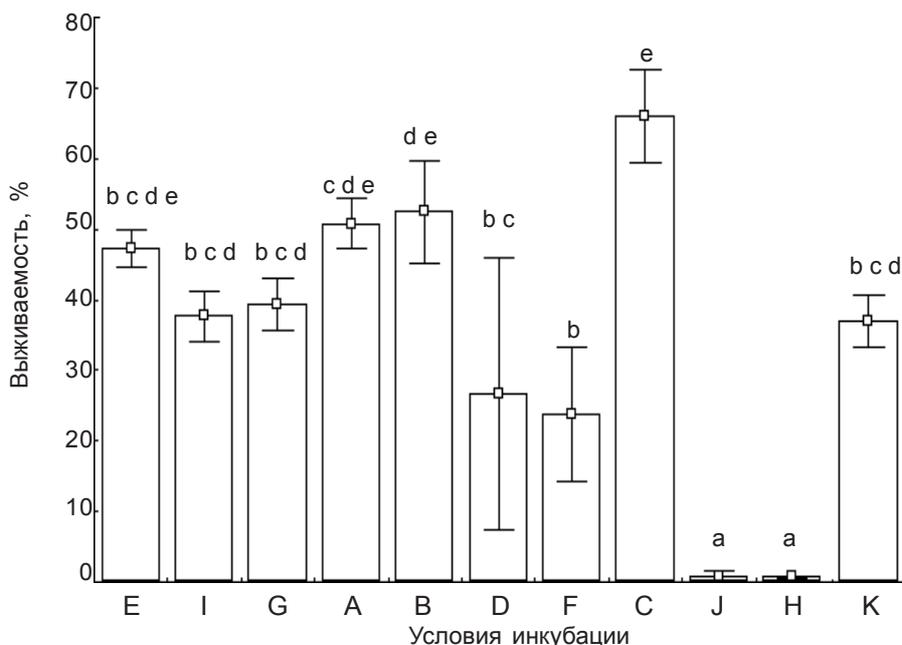


Рис. 5. Аномальное развитие эмбрионов *C. lalia* после инкубации в криозащитных средах при различных температурах. Статистически значимые различия наблюдались для групп, не имеющих одинаковых символов (ANOVA, тест Дункана, $p < 0,05$, $n=5$). \bar{x} – среднее \pm ст. ошибка; \square – среднее.

Поступила 28.08.2008