

Влияние растворов криопротекторов на выживаемость эмбрионов карася

К.Б. МИКСОН, В.В. ЧЕРЕПАНОВ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Effect of Cryoprotectant Solutions on Survival of Crucian Carp Embryos

K.B. MIKSON, V.V. CHEREPANOV

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

Подготовка биообъекта к замораживанию включает экспозицию в криозащитных средах, содержащих как проникающие, так и непроникающие компоненты. Криопротекторы добавляют в среду, где проводится инкубация эмбрионов на этапе, предшествующем глубокому охлаждению, что может нарушать осмотическое равновесие в системе «клетка – окружающий раствор», а также оказывать токсичное воздействие.

Цель исследования – оценить влияние криопротекторов на эмбрионы карася, что позволит рекомендовать их для введения в состав многокомпонентной криозащитной среды.

Эксперименты проводили на эмбрионах карася (*Carassius auratus gibelio* Bloch, 1783) на стадии развития, соответствующей образованию 32–64 сомитов. Процедуру гонадотропной инъекции самкам и самцам, а также получение половых продуктов и осеменение осуществляли в соответствии с рекомендациями рыбоводных хозяйств. Инкубацию эмбрионов проводили в чашках Петри по 100–150 шт в каждой при температуре $(18–21,5) \pm 0,1^\circ\text{C}$. Оценка состояния эмбрионов на всех стадиях развития определяли визуально с помощью микроскопа МБС-9 в соответствии с картами эмбрионального развития. За эмбрионами в исследуемых группах и контроле наблюдали до стадии выклева. В экспериментах исследовалось влияние растворов криопротекторов 1,2-пропандиола (1,2-ПД), 1,3-пропандиола (1,3-ПД), 1,3-бутандиола (1,3-БД), 1,4-бутандиола (1,4-БД), диметилсульфоксида (ДМСО), 1,2-диметаоксиэтана (ДМОЭ), глицерина, этиленгликоля (ЭГ), метанола, полиэтиленоксида (ПЭО-1500) и раствора сахарозы с 10%-й концентрацией в течение 60 мин на выживаемость эмбрионов карася на стадии развития 32–64 бластомеров.

Было установлено, что растворы глицерина, метанола и ДМОЭ значительно снижают уровень выживаемости эмбрионов карася ($13,6 \pm 2,7$; $28,8 \pm 4,6$ и $26,25 \pm 4,2\%$ соответственно) по сравнению с контролем. Выживаемость эмбрионов в растворах сахарозы и криопротекторов 1,2-ПД, 1,3-ПД не имеет статистически значимых отличий от контроля ($79,7 \pm 5,7$; $70,1 \pm 6,7$, $68 \pm 7,0$ и 90% соответственно) и могут быть непосредственно использованы в криозащитных средах. Растворы криопротекторов 1,3-БД, 1,4-БД, ЭГ, ПЭО-1500 не имеют статистически значимых отличий от перечисленных выше растворов ($57,1 \pm 4,3$; $50,3 \pm 6,1$; $61,3 \pm 6,3$ и $57,9 \pm 4,9\%$ соответственно) и также могут быть рекомендованы после соответствующих исследований влияния их концентраций на выживаемость.

Таким образом, полученные данные показывают возможность дальнейшего использования растворов сахарозы, 1,2-ПД, 1,3-ПД, 1,3-БД, 1,4-БД, ЭГ, ПЭО-1500 в различных комбинациях, как базовых, при создании комплексных криозащитных сред.

Preparing a biological object to freezing involves exposure in cryoprotective media containing both penetrating and non-penetrating components. Cryoprotectants are added to the medium for incubation of embryos at the stage prior to deep cooling, that can disorder an osmotic balance in the 'cell-environment' system as well as affect toxically.

The research aim was to evaluate the effect of cryoprotectants on crucian carp embryos to choose multi-component cryoprotective media composition.

Experiments were carried-out in crucian carp (*Carassius auratus gibelio* Bloch, 1783) embryos at the stage of development corresponding to the formation of 32–64 somites. The procedure of gonadotropic injection to males and females, as well as obtaining of reproductive products and insemination were performed in accordance with fish-breeding recommendations. Embryos were incubated in Petri dishes by 100–150 embryos in each at $(18–21.5) \pm 0.1^\circ\text{C}$. The embryos at all stages of development were visually assessed using microscope MBS-9 in accordance with the maps of embryonic development. Embryos in the studied and control groups were observed up to the stage of hatching. In the experiments, the influence of 60 min exposure in solutions of cryoprotectants 1,2-propane diol (1,2-PD), 1,3-propane diol (1,3-PD), 1,3-butane diol (1,3-BD), 1,4-butane diol (1,4-BD), dimethyl sulfoxide (DMSO), 1,2-dimethoxyethane (DMOE), glycerol, ethylene glycol (EG), methanol, polyethylene oxide (PEO-1500) and sucrose solution with 10% concentration on survival of crucian carp embryos at development stage of 32–64 blastomeres.

It was found that solutions of glycerol, methanol and DMOE significantly reduced the survival rate of crucian carp embryos (13.6 ± 2.7 ; 28.8 ± 4.6 and $26.25 \pm 4.2\%$, respectively) if compared with the control. Survival rate of embryos in the solutions of sucrose and cryoprotectants 1,2-PD, 1,3-PD has no statistically significant differences from the control (79.7 ± 5.7 ; 70.1 ± 6.7 , 68 and $90 \pm 7.0\%$ respectively), *i. e.* they can be used as the cryoprotective media component. Cryoprotective solutions of 1,3-BD, 1,4-BD, EG, PEO-1500 do not have statistically significant differences from the above solutions (57.1 ± 4.3 ; 50.3 ± 6.1 ; 61.3 ± 6.3 and $57.9 \pm 4.9\%$, respectively) and may also be recommended after appropriate studies of the effect of their concentrations on a survival.

Thus, the data indicate the possibility of future use of the solutions of sucrose, 1,2-PD, 1,3-PD, 1,3-BD, 1,4-BD, EG, PEO-1500 in various combinations, as components to develop combined cryoprotective media.