УДК 597.554.3-131.7:547.569.2

К.Б. Миксон, Е.Ф. Копейка*, Т.П. Линник

Условия витрификации эмбрионов вьюна (*Misgurnus fossilis*) в криозащитных средах

UDC 597.554.3-131.7:547.569.2

K.B. Mikson, E.F. Kopeika*, T.P. Linnik

Conditions for Loach (*Misgurnus fossilis*) Embryo Vitrification in Cryoprotective Media

Исследовали устойчивость эмбрионов вьюна (*Misgurnus fossilis*) к воздействию 5 криозащитных сред и определяли условия их витрификации. Полученные экспериментальные данные показали, что на стадии развития, соответствующей началу пульсации сердца, наибольшее количество витрифицированных эмбрионов (до 100%) было при инкубировании 30 мин в криозащитной среде, состоящей из 30% сахарозы, 10% этиленгликоля, 3% полиэтиленоксида 1500 и 20% 1,2-пропандиола. Температура витрификации эмбрионов вьюна на этой стадии развития была в диапазоне –80...–176°С.

Ключевые слова: эмбрионы, вьюн (*Misgurnus fossilis*), криозащитная среда, витрификация.

Досліджували стійкість ембріонів в'юна (*Misgurnus fossilis*) до дії 5 кріозахисних середовищ і визначали умови їх вітрифікації. Отримані експериментальні дані показали, що на стадії розвитку, яка відповідає початку пульсації серця, найбільша кількість вітрифікованих ембріонів (до 100%) була при 30-хвилинній обробці їх кріозахисним середовищем, яке складається з 30% сахарози, 10% етиленгліколю, 3% поліетиленоксиду 1500 і 20% 1,2-пропандіолу. Температура вітрифікації ембріонів в'юна на цій стадії розвитку була в діапазоні –80...–176°С.

Ключові слова: ембріони, в'юн (*Misgurnus fossilis*), кріозахисне середовище, вітрифікація.

Resistance of loach (*Misgurnus fossilis*) embryos to the effect of 5 cryoprotective media was investigated and the conditions of their vitrification were determined. The obtained experimental data demonstrated, that at a developmental stage, corresponding to the heart beating onset, the highest number of vitrified embryos (up to 100%) was observed during 30 min incubation within a cryoprotective medium, consisting of 30% sucrose, 10% ethylene glycol, 3% polyethylene oxide – 1500 and 20% 1,2-propane diol. Vitrification temperature of loach embryos at this developmental stage was within –80...–176°C range.

Key-words: embryos, mud loach (*Misgurnus fossilis*), cryoprotectant medium, vitrification.

Решение проблемы криоконсервирования ооцитов и эмбрионов рыб позволит создать страховые запасы гамет и эмбрионов ценных и промысловых видов рыб, а также предотвратить их исчезновение в результате массовых эпизоотий [7]. Особенно это важно для редких и исчезающих видов [11]. Большую пользу результаты исследований могут принести в селекции промысловых видов, при получении товарной личинки в любое время года независимо от их нерестовых периодов.

Однако до настоящего времени методы криоконсервирования эмбрионов рыб не разработаны [15, 28, 30] из-за крупных размеров яйцеклеток, сложно устроенного комплекса, состоящего из эмбриональных клеток и желточного мешка, низкой проницаемости мембран и чувствительности эмбрионов к переохлаждению [19, 21]. Попытки заморозить эмбрионы рыб традиционными методами в средах с низкими концентрациями криопротекторов и низкими скоростями охлаждения не дали надежных результатов [18]. Поэтому большинство

Solving the problem of fish oocyte and embryo cryopreservation will enable creating the reserve stocks for gametes and embryos of useful and target fish species, as well as preventing their endangered state because of mass epizootic diseases [7]. This is of a special importance for rare and endangered species [11]. Research results may be of great benefit in selecting the target species, when procuring market larva at any season independently on their spawning periods.

However the methods for fish embryo cryopreservation have still remained undeveloped [15, 28, 30] because of a big size of oocytes, a complicated way of complex organisation, consisting of embryonic cells and yolk sac, low membrane permeability and embryo sensitivity to overcooling [19, 21]. The attempts to freeze fish embryos using the standard methods in the media with low cryoprotective concentrations and low cooling rates did not provide the reliable results [18]. Therefore the applying of vitrification procedure is considered to be perspective by most researchers [24, 27].

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

* *Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:* ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.:+38 (057) 373-19-31, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта: cryo@online.kharkov.ua

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

* *To whom correspondence should be addressed:* 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.:+380 57 373 1931, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

исследователей считают перспективным применение процедур витрификации [24, 27].

Использование сред с высокой концентрацией криопротекторов и последующей витрификацией эмбрионов солоноводных рыб позволило получить после размораживания 32% жизнеспособных эмбрионов ложного палтуса [9] и 2,13% желтой камбалы [26]. Однако эмбрионы пресноводных рыб менее устойчивы к экстремальным факторам криоконсервирования [9, 26]. Поэтому для эмбрионов каждого вида рыб необходимо определять как криозащитную среду, так и условия их витрификации.

Цель данной работы – определение состава криозащитной среды и режимов охлаждения, позволяющих витрифицировать эмбрионы вьюна на стадии развития 35 (начало пульсации сердца).

Материалы и методы

Половозрелых особей вьюна (*Misgurnus fossilis* L. 1758) возрастом от 4 до 6 лет отлавливали из мест их природного обитания во время ледостава, сортировали по полу и содержали раздельно при 4–5°С в пластиковых контейнерах с отстоянной водопроводной водой. Перед проведением экспериментов температуру повышали до 21°С [1]. В каждом эксперименте при повторах (n = 5) было использовано 3 самки и 5 самцов.

Эмбрионы были получены по методу, модифицированному Нейфахом [4]. После инъекции хорионического гонадотропина (самкам по 300 ед., самцам по 100 ед.) производителей помещали в пластиковые контейнеры с отстоянной водопроводной водой объемом 10 л и содержали при температуре 21°С. Созревание наступало через 30–36 ч. Икру каждой самки осеменяли смесью измельченных семенников от нескольких самцов и распределяли по чашкам Петри примерно по 200 штук для последующей инкубации в воде при температуре 21°С, pH 7,2, dGH 6,7 мг-экв/л. Воду меняли три раза в сутки. Погибшие и остановившиеся в развитии эмбрионы удаляли. Оценку развивающихся эмбрионов проводили согласно картам эмбрионального развития [1]. Развивающиеся эмбрионы, которые находились на стадии развития, соответствующей началу пульсации сердца, отбирали при каждом повторе от трех самок. Эмбрионы освобождали от наружных оболочек гидравлическим ударом без повреждений.

В каждой серии эмбрионы от трех самок (20 штук) подвергали обработке криозащитными средами (таблица) с интервалом в 5 мин в течение 25–60 мин для установления времени выживания.

Using the media with high cryoprotective concentration and following embryo vitrification of saltwater fish species enabled to obtain after freeze-thawing 32 and 2.13% of viable embryos of flounder [9] and Alaska plaice [26], correspondingly. However the freshwater fish embryos are less resistant to extreme cryopreservation factors [9, 26]. Therefore for embryos of each species it is necessary to determine both cryoprotective medium and conditions for their vitrification.

This research was aimed to determine the composition of cryoprotective medium and cooling regimens, allowing to vitrify loach embryo at the developmental stage 35 (heart beating onset).

Materials and methods

Mature loach (*Misgurnus fossilis* L. 1758) species aged from 4 to 6 years were caught from their natural habitats during freeze-up, sex-graded and kept separately at 4–5°C in plastic containers with settled tap water. Prior to experiment performance we rise temperature up to 21°C [1]. In each experiment with the repeats (n = 5) we used 3 females and 5 males.

Embryos were procured according to the method, modified by Neifakh [4]. After injecting chorionic gonadotropin (by 300 and 100 units for females and males, correspondingly) the spawners were placed into 10 l plastic containers with settled water and kept at 21°C. Maturation occurred in 30–36 hrs. Each female eggs were inseminated by the mixture of testes from several males and distributed by Petri dishes approximately by 200 pieces for following incubation in water at 21°C, pH 7.2, dGH 6.7 mg-eq/l. Water was changed thrice a day. Died and stopped in their development embryos were removed. Developing embryos were estimated according to the embryonic development maps [1]. Embryos in progress, being at the develop-

Состав криозащитных сред
Composition of cryoprotective media

Среда Medium	Содержание вещества, % Substance content,%				
	Сахароза Sucrose	ПЭО-1500 PEO-1500	ЭГ EG	1,2-ПД 1,2-PD	МАЦ MAC
C1	30	3	7,5	20	2,5
C2	7,3	2,15	7,5	–	–
C3	8	2,2	10	–	–
C4	30	3	10	20	–
C5	30	3	10	–	–

Примечание: ПЭО-1500 – полиэтиленоксид с м. м. 1500; ЭГ – этиленгликоль; 1,2-ПД – 1,2-пропандиол; МАЦ – метилацетамид.

Notes: PEO-1500 – polyethylene oxide with molecular weight 1500; EG – ethylene glycol; 1,2-PD – 1,2-propane diol; MAC – methyl acetamide.

За развитием отмытых эмбрионов наблюдали до стадии свободно плавающей личинки.

Для замораживания эмбрионы отбирали микропипеткой поштучно с общим объемом криозащитной среды 15–20 мкл и накапывали на охлажденную медную пластину, размещенную в парах жидкого азота. Витрифицированные эмбрионы в каждой среде определяли визуально по степени прозрачности.

Статистический анализ проводили с помощью пакета прикладных программ STATISTICA. Для определения статистически значимых различий по выживаемости в сравниваемых группах эмбрионов использовали тесты Тюки и Манна-Уитни. Статистически значимыми отличия считали при $p < 0,05$. Результаты представляли в виде среднего ± стандартная ошибка. Все величины преобразовывали в *arcsin* для приведения полученных данных к нормальному распределению.

Результаты и обсуждение

Эмбрионы костистых рыб развиваются быстро, и их устойчивость к криопротекторам и переохлаждению изменяется неравномерно, что некоторые авторы [17, 29] связывают с асинхронностью деления клеток на разных стадиях развития. Количество желтка на поздних стадиях развития значительно снижается в связи с интенсивным эндогенным питанием, а оболочки хориона разрыхляются [1], что позволяет уменьшить время эквилибрации в криозащитных средах. Чтобы достичь состояния витрификации при замораживании эмбрионов вьюна на стадии развития 35 использовали высокие концентрации криозащитных сред.

В связи с низкой проницаемостью эмбриональных мембран необходимо увеличивать время инкубации эмбрионов в криозащитных средах, что могло привести к их гибели еще до замораживания вследствие токсичности криопротекторов [7, 26]. Поэтому на первом этапе исследований определяли динамику гибели эмбрионов в зависимости от времени эквилибрации с криозащитными средами.

Было установлено, что при инкубации эмбрионов в криозащитных средах в течение 25 мин показатель уровня выживаемости не имел статистически значимых различий с контрольными группами (тест Манна-Уитни, $p < 0,05$) (рис. 1).

При инкубации эмбрионов в течение 30 мин наблюдалось несущественное снижение уровня их выживаемости во всех криозащитных средах. После инкубации в криозащитных средах в течение 30–35 мин сердце перестает пульсировать, но у отмытых эмбрионов впоследствии восстанавливалось биение сердца и сохранялась способность к развитию. Увеличение времени инкубации эмбрионального стадия, соответствующей началу сердцебиения, отбирали в каждой повторности от трех самок. Наружные эмбриональные оболочки удаляли гидравлическим шоком без повреждений.

В каждой серии эмбрионы трех самок (20 штук) обрабатывали криозащитными средами (табл.) с интервалом 5 мин в течение 25–60 мин для установления времени выживания.

Development of washed-out embryos was observed up to the stage of free swimming larvae.

For freezing the embryos were selected with micropipette by the piece with 15–20 ml total volume of cryoprotective medium and pipetted on a cooled copper plate, placed in liquid nitrogen vapour. Vitrified embryos in each medium were visually detected by the clarity degree.

Statistical processing was done using the "Statistica" software. In order to determine the statically significant differences on the survival rate in embryo groups under comparison we used the Tukey's and Mann-Whitney's tests. Statistically significant values were calculated at $p < 0.05$. Results were presented as a mean ± standard error. All values were transformed in arcsin to bring the obtained data into the normal distribution.

Results and discussion

Bony fish embryos develop rapidly and their resistance to cryoprotectants and overcooling changes in a nonuniform way, that is believed by some authors [17, 29] to be associated with cell mitosis at different developmental stages. At late developmental stages the yolk amount considerably reduces due to an intensive endogenous nutrition and the chorion membranes are getting loosed [1], allowing to reduce the equilibration time in cryoprotective media. To achieve the vitrification state during loach embryo freezing at developmental stage 35 we used high concentrated cryoprotective media.

Due to a low permeability of embryonic membranes it is necessary to increase the incubation time for embryos in cryoprotective media, that might result in their death even before freezing because of cryoprotective toxicity [7, 26]. Therefore at the first stage of research we determined the dynamics of embryo death depending on equilibration time with cryoprotective media.

During 25 min incubation of embryos in cryoprotective media the index of survival level was established to have no statistically significant differences with the control groups (Mann-Whitney's test, $p < 0.05$) (Fig. 1).

During 30 min embryo's incubation a slight decrease in their survival level was observed in all the cryoprotective media. After incubating in cryoprotective media within 30–35 min, heart stops beating, but in washed embryos heart beatings recovered and the capability for development was kept.

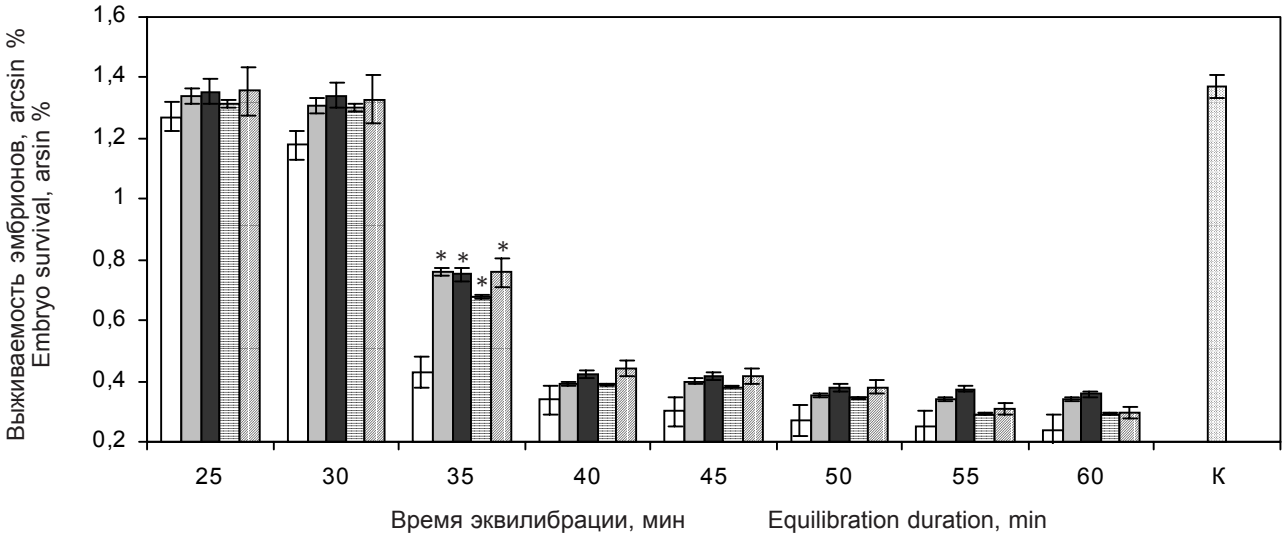

Рис. 1. Выживаемость эмбрионов вьюна (среднее ± стандартная ошибка) в зависимости от времени инкубации в криозащитных средах (n = 5): □ – C1; ▒ – C2; ■ – C3; ▤ – C4; ▨ – C5;K – контроль;* – статистические различия между значениями для времени инкубации, $p < 0,05$

Fig. 1. Loach embryo survival (mean ± standard error) depending on incubation time in cryoprotective media (n = 5): □ – C1; ▒ – C2; ■ – C3; ▤ – C4; ▨ – C5; K is control; * – statistically significant differences between values for equilibration time, $p < 0.05$,

рионов от 40 до 60 мин приводило к высокой смертности, что нецелесообразно при проведении замораживания, т. е. оптимальное время эквилибрации составляет 30–35 мин.

Мы использовали в криозащитных средах криопротекторы 1,2-пропандиол (1,2-ПД) и полиэтиленоксид с м. м. 1500 (ПЭО-1500) потому, что эти криопротекторы в составе криозащитных сред для эмбрионов других карповых были отмечены как малотоксичные [29]. Добавление в криозащитные среды С1 и С4 криопротекторов 1,2-ПД и ПЭО-1500 не оказало отрицательного воздействия на выживаемость эмбрионов при инкубировании в течение 35 мин, несмотря на то, что в С1 выживаемость наименьшая, а в С4 – наибольшая.

Было установлено, что метилацетамид (МАЦ) обладает высокой проницаемостью и не оказывает существенного влияния на выживаемость сперматозоидов птиц [2], но в наших экспериментах он оказал негативное влияние на выживаемость эмбрионов вьюна при увеличении времени инкубации свыше 15 мин, что согласуется с [12]. В среде С1 с присутствием криопротектора МАЦ установлен самый низкий уровень выживаемости. Однако нами было показано, что увеличение содержания сахарозы в криозащитных средах способно в некоторой степени снизить токсичность остальных криопротекторов и нейтрализовать их негативное влияние. Это согласуется с результатами [23].

Эффект влияния самок на выживаемость эмбрионов наблюдался во всех экспериментальных группах (рис. 2).

Были установлены различия по уровню выживаемости между группами эмбрионов, полученных

Rise in incubation time for embryos to 40–60 min resulted in a high mortality rate, that was not expedient during freezing and the optimal equilibration time was 30–35 min.

We used 1,2-propane diol (1,2-PD) and polyethylene oxide with molecular weight of 1500 (PEO-1500) in cryoprotective media because of their low-toxicity as part of cryoprotective media for embryos of other carp species [29]. Adding 1,2-PD and PEO-1500 into C1 and C4 cryoprotective media had no negative effect on embryo survival during 35 min incubation, despite the fact, that the lowest and highest survivals were in C1 and C4, correspondingly.

Methyl acetamide (MAC) was established to have a high permeability and no significant effect on bird spermatozoa survival [2], but in our experiments it negatively affected the index for loach embryo when increasing incubation time over 15 min, that correlated to the data, reported in the paper [12]. In C1 medium with MAC presence there was established the lowest survival level. However we demonstrated a sucrose content increase in cryoprotective media as capable to reduce in some extent the toxicity of the rest cryoprotectants and neutralise their negative effect. This correlates with the result [23].

The effect of female influence on embryo survival was observed in all the experimental groups (Fig. 2).

Differences on survival level between embryo groups, obtained from different females, were established. Statistically significant differences were defined between the 2nd and 3rd females. The same effect was found in the paper [12, 22]. Differences in embryo survival of different females the authors explained by those in fish physiological state and its embryos as well.

от разных самок. Статистически значимые различия были определены между 2-й и 3-й самками. Подобный эффект был описан в [3, 22]. Различия в выживаемости эмбрионов разных самок авторы объяснили различиями в физиологическом состоянии рыб, и, следовательно, их эмбрионов.

Эмбрионы, обработанные в течение 30 мин криозащитными средами, замораживали для определения оптимальной витрифицирующей среды. Измерение температуры медной пластины с помощью термопары показало, что диапазон температур, в котором происходит витрификация, –80... –176°С. При более высоких температурах замораживания не наблюдалось стеклования объектов, а при температуре замораживания ниже –176°С не удавалось зафиксировать стеклование, так как капля раствора с эмбрионом разрушалась.

При замораживании определялся наибольший процент витрифицированных эмбрионов (рис. 3).

Установлено, что эмбрионы вьюна имеют высокую устойчивость к воздействию криопротекторов на стадиях развития 23–35 (образование зачатков глаз – начало пульсации сердца) [3]. Для каждого вида рыб эти стадии индивидуальны, и у большинства исследованных находятся в диапазоне между стадией развития, соответствующей поздней гаструле и началу биения сердца [16, 31, 32]. Однако эмбрионы вьюна на стадии развития 23 имеют большое количество желтка, который может препятствовать их витрификации [20]. На более поздних стадиях развития желточный мешок меньше. Кроме того, мы предположили, что на стадии 35 проницаемость эмбриональных мембран выше, что поможет осуществить дегидратацию эмбрионов и насыщение их криозащитными средами. Наши результаты согласуются с результатами Robles *et al.* [26, 27] об устойчивости эмбрионов на поздних стадиях развития к переохлаждению, токсичности криопротекторов и механическим повреждениям.

В наших экспериментах невитрифицированные эмбрионы были белого цвета, что указывает на присутствие межклеточных и внутриклеточных кристаллов льда у эмбриона или желточного мешка.

Было установлено, что лучшей средой, в которой наблюдался наибольший процент витрифицированных эмбрионов, является среда С4, состоящая из 30% сахарозы + 10% этиленгликоля (ЭГ) + 3% ПЭО-1500 и 20% 1,2-ПД.

После витрифицирования эмбрионы погружали в жидкий азот и сохраняли в течение 60 мин, отогревали эмбрионы в чашках Петри объемом 40 мл с водой при температуре 22°С. Для удаления криопротекторов троекратно меняли воду. В дальнейшем эмбрионы инкубировались при температуре

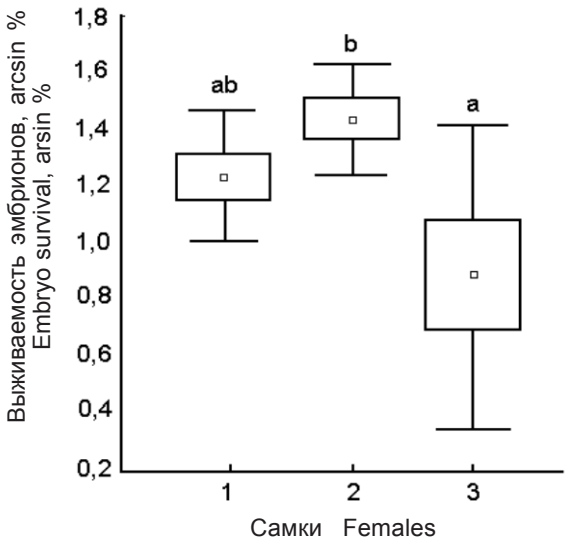

Рис. 2. Выживаемость эмбрионов разных самок после инкубирования в криозащитных средах. Статистически значимые различия существуют между группами, не имеющими одинаковых символов (тест Тюки, $p < 0,05$, n=5): ⊥ – стандартное отклонение; ▭ – стандартная ошибка; □ – среднее.

Fig. 2. Survival of embryos from different females after incubating in cryoprotective media. Statistically significant differences exist between the groups without equal symbols (Tukey's test, $p<0.05$, n = 5): ⊥ – standard deviation; ▭ – standard error; □ – is mean.

Embryos treated with cryoprotective media for 30 min were frozen to determine the optimal vitrifying medium. Measuring temperature of copper plate using thermocouple has shown the temperature range, where vitrification occurs, to be –80...–176°C. Under higher freezing temperatures no objects' vitrification was observed, but under those, lower than –176°C the vitrification could not be fixed because of the destruction of embryo-contained solution drop with .

During freezing there was determined the highest percentage of vitrified embryos (Fig. 3).

Loach embryos were established to be high resistant to cryoprotective effect at developmental stages 23-35 (eye bud formation – heart beating onset) [3]. For each fish species these stages are individual and in the most researches they are within the range between developmental stage, corresponding to the late gastrula and heart beating onset [16, 31, 32]. However the loach embryos at the developmental stage 23 have a big amount of yolk, which may prevent their vitrification [20]. At later developmental stages the yolk sac is smaller. In addition, we believed that at the stage 35 the permeability of embryonic membranes was higher, assisting in realising embryo dehydration and their saturation with cryoprotective media. Our results correlate with those of Robles *et al.* [26, 27] on embryo resistance at later developmental stages to overcooling, cryoprotective toxicity and mechanical damages.

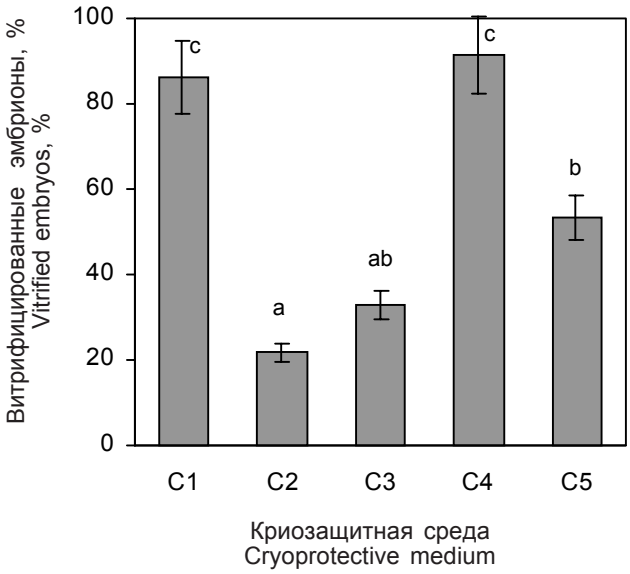

Рис. 3. Витрификация эмбрионов после 30 мин эквилибрации в 5 криозащитных средах. Статистически значимые различия определены между группами, не имеющими одинаковых символов (тест Тюки, $p < 0,05$, среднее ± стандартная ошибка, n = 5).

Fig. 3. Embryo vitrification after 30 min equilibration in 5 cryoprotective media. Statistically significant differences were determined between the groups without equal symbols (Tukey's test, $p < 0.05$, mean ± standard error, n = 5).

20°C. Видимых морфологических изменений у размороженных эмбрионов в сравнении с контрольными группами не установлено, но отсутствовало биение сердца.

Статистически значимые отличия в показателях уровня гибели эмбрионов установлены после 6 ч инкубации (~ 20%) ($p < 0,05$). Через 14 ч инкубации после оттаивания во всех случаях (n = 5) эмбрионы погибали (100%), что выражалось в побелении эмбрионов, указывающее на некротизацию тканевых структур (рис. 4).

Для эмбрионов морского карася на стадии развития, соответствующей началу биения сердца, установлено, что с увеличением концентрации криозащитной среды повышается процент витрифицированных эмбрионов [12]. При использовании криозащитной среды, состоящей из 20,5% диметилсульфоксида + 15,5% ацетамида + 10% пропиленгликоля + 6% пропиленэтиленгликоля был получен относительно высокий процент витрифицированных эмбрионов (> 40%). Но уровень смертности резко возрастал с увеличением времени эквилибрации (более 15 мин) в этой среде. После размораживания все эмбрионы погибали. Они белели или имели повреждения в виде разбухания, деструктуризации оболочек и др.

При замораживании эмбрионов ложного палтуса в криозащитных средах с различными комби-

In our experiments the non-vitrified embryos were white, suggesting the presence of inter- and intracellular ice crystals in embryos or yolk sac.

It was established that the best medium with observed highest percentage of vitrified embryos was the medium C4, consisting of 30% sucrose + 10% ethylene glycol (EG) + 3% PEO-1500 and 20% 1,2-PD.

After vitrifying the embryos were immersed into liquid nitrogen and preserved within 60 min, then thawed in 40 ml Petri dishes with water at 22°C. Water was thrice changed for cryoprotectant removing. Further embryos were incubated at 20°C. No visible morphological changes in frozen-thawed embryos compared to the control groups were revealed, but heart beating was absent.

Statistically significant differences in the indices of embryo death level were found out 6 hrs later incubation (20%) ($p < 0.05$). After 14 hrs incubation following thawing in all the cases (n = 5) the embryos died (100%), that was manifested in embryo whitening, pointing to the tissue structure nectrotisation (Fig. 4).

For red sea bream embryos at the developmental stage, corresponding to the heart beating onset, there was established, that with an increase in cryoprotective medium concentration the percentage of vitrified embryos augmented [12]. When using cryoprotective medium, comprising 20.5% dimethyl sufoxide +15.5% acetamide + 10% propylene glycol + 6% propylene ethylene glycol, quite a high percentage of vitrified embryos (> 40%) was obtained. However the mortality level sharply increased with a rise in equilibration time (more than 15 min) in this medium. After freeze-

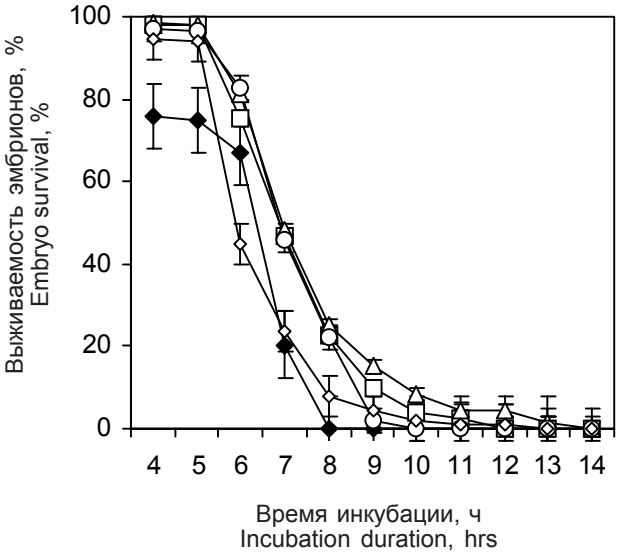

Рис. 4. Выживаемость эмбрионов вьюна после оттаивания (n = 5), среднее ± стандартное отклонение: ◆ – n 1; □ – n 2; △ – n 3; ○ – n 4; ◇ – n 5.

Fig. 4. Loach embryo survival after thawing (n = 5), mean ± standard deviation: ◆ – n 1; □ – n 2; △ – n 3; ○ – n 4; ◇ – n 5.

нациями метанола, глицерина и пропиленгликоля отмечался высокий процент витрификации (85–95%) [9]. При этом был получен высокий показатель уровня выживаемости эмбрионов (до 32%) при оттаивании. Эмбрионы наблюдались в течение 90 ч, что составило время от момента оттаивания до гибели последнего.

Однако в сообщении [13] указывается на недостатки этого метода. Повторный эксперимент, проведенный при тех же условиях, показал низкий уровень витрифицированных эмбрионов. При дальнейшем охлаждении часть их белела, что указывало на присутствие критического объема кристаллической фазы, а при отогреве все эмбрионы белели.

При замораживании эмбрионов линя в указанных криозащитных средах при тех же условиях (в экспериментах использовано свыше 5000 эмбрионов) [14] результаты соответствовали данным [13]. Это объяснялось тем, что эмбрионы пресноводных рыб менее устойчивы к высоким концентрациям криопротекторов, чем эмбрионы морских, которые имеют природную резистентность к гипертоническим растворам [10, 26].

В работе [26] использовали криозащитные среды, состоящие из комбинаций метанола, пропандиола и этиленгликоля, в которых 0,92–2,13% эмбрионов желтой камбалы определены как морфологически интактные в течение первого часа после оттаивания, но они не развивались и затем все погибали.

Таким образом, в нашей работе получен устойчивый высокий уровень витрифицирования эмбрионов вьюна (91,3 ± 18,7%), что позволяет говорить о необходимости продолжения исследований в данном направлении.

Мы предполагаем, что гибель эмбрионов после отогрева была обусловлена различными причинами. Во-первых, возможно существовали микроповреждения, вызванные криозащитными средами, и дальнейшее охлаждение отрицательно сказывалось на компенсаторных реакциях [6, 8]. Во-вторых, при охлаждении вероятно возникали микроскопические центры кристаллизации, что приводило к рекристаллизационным процессам, вызывающим механические повреждения отдельных клеток при оттаивании [18]. В-третьих, повреждения мембранных структур были связаны с индивидуальной чувствительностью биологического объекта [5, 25] или были использованы неоптимальные режимы оттаивания [7].

Выводы

В результате проведенных исследований определена лучшая среда для витрифицирования эмбрионов вьюна на стадии пульсации сердца сос-

thawing all embryos died. They whitened and had swelling-like damages, membrane destructurisation etc.

When freezing Japanese flounder's embryos within cryoprotective media with different combinations of methanol, glycerol and propylene glycol there was observed a high percentage of vitrification (85–95%) [9]. At the same time there was obtained a high index of embryo survival level (up to 20%) during thawing. Embryos were observed during 90 hrs, that made the time from the moment of thawing to the death of last one.

However this method's disadvantages are reported in the paper [13]. Repeated experiment, performed under the same conditions showed a low level of vitrified embryos. During following cooling a part of them whitened, that pointed to the presence of critical volume of crystal phase, but under thawing all embryos whitened.

During freezing of common tench embryos in the mentioned cryoprotective media under the same conditions (over 5,000 embryos were used in the experiments) [14], the results corresponded to the data, reported in the paper [13]. This was explained by the fact, that freshwater fish embryos were less resistant to high concentrations of cryoprotectants, than those of seawater ones, which had a natural resistance to hypertonic solutions [10, 26].

In the paper [26] there were applied cryoprotective media, consisting of methanol, propanediol and ethylene glycol combinations, where 0.92–2.12% Alaska plaice embryos were determined as morphologically intact within the first hour after thawing, but they did not develop and then all died.

Thus, in our research we obtained a stable high rate (91.3 ± 18.7%) of vitrified loach embryos (despite freshwater species), that enabled concluding about a right way in studying fish embryo freezing.

We assume embryo death after thawing as stipulated by different causes. First, microdamages of chemical character, caused by cryoprotective media, might occur and further cooling negatively affected the compensatory reactions [6, 8]. Secondly, there was a probable formation of microscopic centers of crystallisation, resulting in recrystallisation microprocesses, causing mechanical damages of single cells during thawing [18]. Thirdly, the damages of membrane structures were associated to an individual sensitivity of biological object [5, 25] or non-optimal regimens of thawing were used [7].

Conclusions

As a result of the research performed there was determined the best medium for loach embryo vitrification at heart beating stage, consisting of 30% sucrose, 10% EG, 3% PEO-1500 and 20% 1,2-PD.

Freezing regimen, enabling to achieve 91.3 ± 18.7% embryo vitrification was determined.

тоящая из 30% сахарозы, 10% ЭГ, 3% ПЭО-1500 и 20% 1,2-ПД.

Определен режим замораживания, позволяющий достичь 91,3 ± 8,7% витрификации эмбрионов.

Установлено, что выживаемость эмбрионов в криозащитных средах зависит от индивидуальных особенностей особей, от которых были получены клетки.

Литература

1. *Костомарова А.А.* Вьюн *Misgurnus fossilis* L. // Объекты биологии развития.– М.: Наука, 1975.– С. 308–323.
2. *Линник Т.П., Бизикина О.В.* Криоконсервирование спермы петухов. II. Криопротекторная активность амидов и диолов // Пробл. криобиологии.– 2001.– №4.– С. 43–51.
3. *Миксон К.Б., Копейка Е.Ф., Ишков Г.С.* Влияние компонентов криозащитной среды на эмбрионы вьюна (*Misgurnus fossilis*, L.1758) // Ветеринарна медицина: Міжвідомчий тематичний збірник.– 2008.– Вип. 89.– С. 271–274.
4. *Нейфах А.А.* Использование метода радиоактивной инактивации ядер для исследования их функций в раннем развитии рыб // Журн. общей биол.– 1959.– №20.– С. 202-213.
5. *Пушкарь Н.С., Шрагo М.И., Белоус А.М., Калугин Ю.В.* Криопротекторы.– Киев: Наук. думка, 1978.– 204 с.
6. *Ahammad M.M., Bhattacharyya D., Banerjee R.D., Bandyopadhyay P.K.* Toxicity of protectants to embryos of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) after cold storage at different storage time periods // Cell Preservation Technology.– 2004.– Vol. 2, N3.– P. 227–233.
7. *Bart A.N.* New approaches in cryopreservation of fish embryos / Cryopreservation in Aquatic Species. The World Aquaculture Society.– Louisiana: Baton Rouge, 2000.– P. 179–187.
8. *Cabrita E., Robles V., Chereguini O., Real M. et al.* Toxicity of different permeable and non-permeable cryoprotectants on turbot embryos (*Scophthalmus maximus*) // Cryobiology.– 2002.– Vol. 45, N3.– P. 261.
9. *Chen S.L., Tian Y.S.* Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos by vitrification // Theriogenology.– 2004.– Vol. 63, N4.– P. 1207–1219.
10. *Chen S.L.* Progress and prospect of cryopreservation of fish gametes and embryos // J. Fish China.– 2002.– Vol. 26, N2.– P. 161–168.
11. *Cryopreservation in aquatic species* / Eds: T.R. Tiersch and P.M. Mazik.– Baton Rouge: The World Aquaculture Society, 2000.– 441 p.
12. *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.
13. *Edashige K., Valdez D.M., Hara T. et al.* Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos are difficult to cryopreserve by vitrification // Cryobiology.– 2006.– Vol. 53, N1.– P. 96–106.
14. *El-Battawy K.A., Linhart O.* Preleminary studies on cryopreservation of common tench (*Tinca tinca*) embryos (Work in progress) // Journal of Fisheries International.– 2008.– Vol. 3, N1.– P. 12–18.
15. *Gwo J.C.* Cryopreservation of eggs and embryos from aquatic organisms / Cryopreservation in Aquatic Species. The World Aquaculture Society.– Louisiana: Baton Rouge, 2000.– P. 211–229.
16. *Haga Y.* On the subzero temperature preservation of fertilised eggs of rainbow trout // Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.– 1982.– Vol. 48, N11.– P. 1569–1572.

Embryo survival in cryoprotective media was established as dependent on individual peculiarities of females.

References

1. *Kostomarova A.A.* Loach *Misgurnus fossilis* L. // Objects of developmental biology.– Moscow: Nauka, 1975.– P. 308–323.
2. *Linnik T.P., Bizikina O.V.* Fowl sperm cryopreservation. II. Amide and diol cryoprotective activity // Problems of Cryobiology.– 2001.– N4.– P. 43–51.
3. *Mikson K.B., Kopeika E.F., Ishkov G.S.* Effect of components of cryoprotective media on loach embryos (*Missgurnus fossilis*, L. 1758) // Veterinarnaya meditsina: Interdepartmental Thematic Collection.– 2008.– Issue 89.– P. 271–274.
4. *Neifakh A.A.* Usage of method of radioactive inactivation of nuclei for studying their function in early development of fish // Zhurn. Obschey Biologii.– 1959.– N20.– P. 202–213.
5. *Pushkar N.S., Shrago M.I., Belous A.M., Kalugin Yu.V.* Cryoprotectants.– Kiev: Nauk. dumka, 1978.– 204 p.
6. *Ahammad M.M., Bhattacharyya D., Banerjee R.D., Bandyopadhyay P.K.* Toxicity of protectants to embryos of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) after cold storage at different storage time periods // Cell Preservation Technology.– 2004.– Vol. 2, N3.– P. 227–233.
7. *Bart A.N.* New approaches in cryopreservation of fish embryos / Cryopreservation in Aquatic Species. The World Aquaculture Society.– Louisiana: Baton Rouge, 2000.– P. 179–187.
8. *Cabrita E., Robles V., Chereguini O., Real M. et al.* Toxicity of different permeable and non-permeable cryoprotectants on turbot embryos (*Scophthalmus maximus*) // Cryobiology.– 2002.– Vol. 45, N3.– P. 261.
9. *Chen S.L., Tian Y.S.* Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos by vitrification // Theriogenology.– 2004.– Vol. 63, N4.– P. 1207–1219.
10. *Chen S.L.* Progress and prospect of cryopreservation of fish gametes and embryos // J. Fish China.– 2002.– Vol. 26, N2.– P. 161–168.
11. *Cryopreservation in aquatic species* / Eds: T.R. Tiersch and P.M. Mazik.– Baton Rouge: The World Aquaculture Society, 2000.– 441 p.
12. *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.
13. *Edashige K., Valdez D.M., Hara T. et al.* Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos are difficult to cryopreserve by vitrification // Cryobiology.– 2006.– Vol. 53, N1.– P. 96–106.
14. *El-Battawy K.A., Linhart O.* Preleminary studies on cryopreservation of common tench (*Tinca tinca*) embryos (Work in progress) // Journal of Fisheries International.– 2008.– Vol. 3, N1.– P. 12–18.
15. *Gwo J.C.* Cryopreservation of eggs and embryos from aquatic organisms / Cryopreservation in Aquatic Species. The World Aquaculture Society.– Louisiana: Baton Rouge, 2000.– P. 211–229.
16. *Haga Y.* On the subzero temperature preservation of fertilised eggs of rainbow trout // Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.– 1982.– Vol. 48, N11.– P. 1569–1572.
17. *Hagedorn M., Kleinhans F.W.* Problems and prospects in cryopreservation of fish embryos / Cryopreservation in Aquatic Species. The World Aquaculture Society.– Louisiana: Baton Rouge, 2000.– P. 161–178.
18. *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.

17. *Hagedorn M., Kleinhans F.W.* Problems and prospects in cryopreservation of fish embryos / Cryopreservation in Aquatic Species. The World Aquaculture Society.– Louisiana: Baton Rouge, 2000.– P. 161–178.
18. *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.
19. *Hagedorn M., Kleinhans F.W., Wildt D.E. et al.* Chilling sensitivity and cryoprotectant permeability of dechorionated zebrafish embryos, *Brachydanio rerio* // Cryobiology.– 1997.– Vol. 34, N3.– P. 251–263.
20. *Hagedorn M., Hsu E.W., Pilatus U. et al.* Magnetic resonance microscopy and spectroscopy reveal kinetics of cryoprotectant permeation in a multicompartment biological system // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.– 1996.– Vol. 93, 15.– P. 7454–7459.
21. *Isaeva A., Zhang T., Rawson D.M.* Studies sensitivity of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes // Cryobiology.– 2004.– Vol. 49, N2.– P. 114–122.
22. *Kopeika J., Kopeika E., Zhang T. et al.* Effect of DNA repair inhibitor (3-aminobenzamide) on genetic stability of loach (*Misgurnus fossilis*) embryos derived from cryopreserved sperm // Theriogenology.– 2004.– Vol. 69, N9.– P. 1661–1673.
23. *Kuleshova L.L., MacFarlane D.R., Trounson A.O., Shaw J.M.* Sugar exert a major influence on the vitrification properties of ethylene glycol-based solutions and have low toxity to embryos and oocytes // Cryobiology.– 1999.– Vol. 38, N2.– P. 119–130.
24. *Liu K.C., Chou T.C., Lin H.D.* Cryosurvival of goldfish embryo after subzero freezing // Aquatic Living Resources.– 1993.– Vol. 6, N3.– P. 63–66.
25. *Meryman H.T.* Osmotic stress as a mechanism of freezing injury // Cryobiology.– 1971.– Vol. 8, N5.– P. 489–500.
26. *Robles V., Cabrita E., Fletcher G.L. et al.* Vitrification assays with embryos from a cold tolerant sub-arctic fish species // Teriogenology.– 2005.– Vol. 64, N7.– P. 1633–1646.
27. *Robles V., Cabrita E., Real M. et al.* Vitrification of turbot embryos: preliminary assays // Cryobiology.– 2003.– Vol. 47, N1.– P. 30–39.
28. *Tian Y.S., Chen S.L., Yan A.S. et al.* Studies on vitrification method of sea perch (*Lateolabrax japonicus*) embryos // Acta Zoologica Sinica.– 2003.– N49.– P. 843–850.
29. *Zhang T.T.* Cryopreservation of gametes and embryos of aquatic species // Life in the Frozen State / Ed. by B. Fuller, E. Benson, N. Lane.– Luton: CRC Press LLC, 2004.– P. 415–436.
30. *Zhang T.T., Rawson D.M.* Feasibility studies on vitrification of intact zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos // Cryobiology.– 1996.– Vol. 33, N1.– P. 1–13.
31. *Zhang T.T., Rawson D.M., Morris G.J.* Cryopreservation of pre-hatch embryos of zebrafish (*Brachydanio rerio)* // Aquatic Living Resources– 1993.– Vol. 6, N2.– P. 145–153.
32. *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.

Поступила 19.05.2009
Рецензент И.Ф. Коваленко

19. *Hagedorn M., Kleinhans F.W., Wildt D.E. et al.* Chilling sensitivity and cryoprotectant permeability of dechorionated zebrafish embryos, *Brachydanio rerio* // Cryobiology.– 1997.– Vol. 34, N3.– P. 251–263.
20. *Hagedorn M., Hsu E.W., Pilatus U. et al.* Magnetic resonance microscopy and spectroscopy reveal kinetics of cryoprotectant permeation in a multicompartment biological system // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.– 1996.– Vol. 93, N15.– P. 7454–7459.
21. *Isaeva A., Zhang T., Rawson D.M.* Studies sensitivity of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes // Cryobiology.– 2004.– Vol. 49, N2.– P. 114–122.
22. *Kopeika J., Kopeika E., Zhang T. et al.* Effect of DNA repair inhibitor (3-aminobenzamide) on genetic stability of loach (*Misgurnus fossilis*) embryos derived from cryopreserved sperm // Theriogenology.– 2004.– Vol. 69, N9.– P. 1661–1673.
23. *Kuleshova L.L., MacFarlane D.R., Trounson A.O., Shaw J.M.* Sugar exert a major influence on the vitrification properties of ethylene glycol-based solutions and have low toxity to embryos and oocytes // Cryobiology.– 1999.– Vol. 38, N2.– P. 119–130.
24. *Liu K.C., Chou T.C., Lin H.D.* Cryosurvival of goldfish embryo after subzero freezing // Aquatic Living Resources.– 1993.– Vol. 6, N3.– P. 63–66.
25. *Meryman H.T.* Osmotic stress as a mechanism of freezing injury // Cryobiology.– 1971.– Vol. 8, N5.– P. 489–500.
26. *Robles V., Cabrita E., Fletcher G.L. et al.* Vitrification assays with embryos from a cold tolerant sub-arctic fish species // Teriogenology.– 2005.– Vol. 64, N7.– P. 1633–1646.
27. *Robles V., Cabrita E., Real M. et al.* Vitrification of turbot embryos: preliminary assays // Cryobiology.– 2003.– Vol. 47, N1.– P. 30–39.
28. *Tian Y.S., Chen S.L., Yan A.S. et al.* Studies on vitrification method of sea perch (*Lateolabrax japonicus*) embryos // Acta Zoologica Sinica.– 2003.– N49.– P. 843–850.
29. *Zhang T.T.* Cryopreservation of gametes and embryos of aquatic species // Life in the Frozen State / Ed. by B. Fuller, E. Benson, N. Lane.– Luton: CRC Press LLC, 2004.– P. 415–436.
30. *Zhang T.T., Rawson D.M.* Feasibility studies on vitrification of intact zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos // Cryobiology.– 1996.– Vol. 33, N1.– P. 1–13.
31. *Zhang T.T., Rawson D.M., Morris G.J.* Cryopreservation of pre-hatch embryos of zebrafish (*Brachydanio rerio)* // Aquatic Living Resources– 1993.– Vol. 6, N2.– P. 145–153.
32. *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.

Accepted in 19.05.2009