

Влияние микроинъекций криопротекторов на выживаемость эмбрионов вьюна *Misgurnus fossilis* L., 1758

UDC 547.569.2:597.554.3 – 131.7

K.B. MIKSON*, YE. F. KOPEYKA, V.I. GRISCHENKO

Effect of Microinjection of Cryoprotective Agents on Survival of *Misgurnus Fossilis* L. Loach Embryos, 1758

Исследовали выживаемость эмбрионов вьюна на стадии поздней бластулы после микроинъекции криопротекторов ДМСО, ПЭО-100, ПЭО-1500 и формамида (ФА) в область перивителлинового пространства (ПП) и желточного мешка (ЖМ). Установлено, что при введении ДМСО, ПЭО-100 и ПЭО-1500 в концентрациях 10, 50 и 95% в область ПП и при последующей 30-минутной инкубации в 0,88 и 0,29 М сахарозе уровень выживаемости снижался: 58,4–48,5, 74,4–53,9 и 79,63–59,6% соответственно. У ФА уровень выживаемости при тех же условиях снижался с 7 до 3,6%. При введении ПЭО-100 и ПЭО-1500 в концентрациях 10, 50 и 95% в область ЖМ при 30-минутной инкубации в 0,88 и 0,29 М сахарозе уровень выживаемости не имел статистически значимых отличий и был выше, чем при введении ДМСО и ФА.

Ключевые слова: эмбрион, вьюн (*Misgurnus fossilis* L.), микроинъекция, криопротекторы.

Досліджували виживаність ембріонів в'юна на стадії пізньої бластули після мікроін'єкції криопротекторів ДМСО, ПЕО-100, ПЕО-1500 і формаміду (ФА) в зону перивітелінового простору (ПП) та жовткового мішка (ЖМ). Встановлено, що при введенні ДМСО, ПЕО-100 і ПЕО-1500 в концентраціях 10, 50 і 95% в зону ПП і при подальшій 30-хвилинній інкубації в 0,88 і 0,29 М сахарозі рівень виживаності знижувався: 58,4–48,5, 74,4–53,9 і 79,63–59,6% відповідно. У ФА рівень виживаності за тих же умов знижувався з 7 до 3,6%. При введенні ПЕО-100 і ПЕО-1500 в концентраціях 10, 50 і 95% в зону ЖМ і при 30-хвилинній інкубації в 0,88 і 0,29 М сахарозі рівень виживаності не мав статистично значних відмінностей і був вище, ніж при введенні ДМСО і ФА.

Ключові слова: ембріон, в'юн (*Misgurnus fossilis* L.), мікроін'єкція, криопротектори.

Investigated survival rate of loach embryos at a stage late epibole after a microinjection of DMSO, PEG-100, PEG-1500 and formamide (FA) cryoprotectants in area of perivitelline spaces (PS) and yolk sac (YS). It is established that at introduction of DMSO, PEG-100 and PEG-1500 in concentration of 10, 50 and 95 % in area of PS and at the subsequent 30-minute incubation in 0,88 and 0,29 M to sucrose, survival rate level decreased: 58,4–48,5, 74,4–53,9 and 79,63–59,6 % accordingly. At FA survival rate level under the same conditions decreased from 7 to 3,6 %. At introduction of PEG-100 and PEG-1500 in concentration 10, 50 and 95 % in YS area at 30-minute incubation in 0,88 and 0,29 M to sucrose level of survival rate had no statistically significant differences and was higher, than at introduction of DMSO and FA.

Key-words: embryo, loach (*Misgurnus fossilis* L.), microinjection, cryoprotective agents.

Криоконсервирование эмбрионов рыб поможет сохранить виды, находящиеся под угрозой исчезновения, а также поддержать ценные и высокопродуктивные линии в аквакультуре [32]. В настоящее время криоконсервируют сперму около 200 видов рыб [26, 11]. Однако методы криоконсервирования эмбрионов рыб не разработаны [13, 31, 33], так как они имеют большие размеры и сложную структуру, состоящую из эмбриональных клеток и желточного мешка (ЖМ) с низкой проницаемостью мембран [15].

Для криоконсервирования эмбрионов рыб необходимы проникновение и насыщение криопротектором всех эмбриональных структур [21, 25]. Традиционные методы не способны обеспечить защиту всех тканей и органов эмбрионов рыб, особенно ЖМ [17, 22]. Перибласт (желточный синцитий),

окружающий ЖМ, является барьером между желтком и бластодермой, препятствующим свободному перемещению воды и криопротекторов [15]. Замораживание эмбрионов рыб невозможно без преодоления этого барьера [14]. Для предотвращения образования внутриклеточного и межклеточного льда все структурные элементы эмбриона должны быть насыщены криопротектором [25]. Авторы [19, 27] предложили использовать микроинъекцию как эффективный способ преодоления трудно проницаемых мембран эмбрионов рыб. Этот метод обычно используется в генной инженерии и уже применялся при удалении желтка у эмбрионов данио рерио (*Brachydanio rerio*) [23, 24], введении белков антифриза в эмбрионы тюрбо (*Scophthalmus maximus*) [27] и введении криопротекторов в эмбрионы данио рерио [16, 19]. Микро-

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

* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 3119, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

инъекция имеет преимущества перед электропорацией или ультразвуковой обработкой не только с точки зрения эффективности, но и выживаемости эмбрионов [8].

Цель работы – исследование влияния криопротекторов ДМСО, ПЭО-100, ПЭО-1500 и ФА, введенных в области ПП и ЖМ на выживаемость эмбрионов вьюна и возможности использования метода микроинъекции для насыщения их криопротекторами.

Материалы и методы

Рыбу добывали из природных водоемов во время ледостава. Отбирали 4–6-летних производителей размером 18–26 см, которых содержали в пластиковых контейнерах объемом 30 л при температуре 4–5°C. Перед экспериментом отобранных производителей помещали в такие же контейнеры. Температуру плавно поднимали в течение суток до 21–22°C, что инициировало дальнейшее созревание половых продуктов до 4-й стадии зрелости. После инъекции хорионического гонадотропина (Прегнил – производство “Н.В. Органон”, Нидерланды) самкам по 300 ед., самцам по 100 ед. производителей помещали в пластиковые контейнеры с отстоянной водой объемом 10 л и содержали при температуре 21°C. Созревание наступало через 30–36 ч.

Эмбрионы вьюна были получены по методу Нейфаха [4]. После получения половых продуктов икру самки осеменяли смесью измельченных семенников нескольких самцов и распределяли по чашкам Петри (по ~200 штук) для инкубации при 21°C, рН 7,2, dGH 6,7 мг-экв/л. Воду меняли 3–4 раза в сутки. Неоплодотворенные побелевшие икринки и неразвивающиеся эмбрионы удаляли из общей группы. Развивающиеся эмбрионы оценивали по картам эмбрионального развития [2]. Эмбрионы, находящиеся на стадии развития 8–9 ч (поздняя бластула), отбирали для каждого эксперимента от трех самок (n=6).

Микроинъекции проводили с помощью поршневого микроинъектора, установленного на микроманипулятор КМ-2 (производство ИБП РАН, РФ). Иглы для микроинъекций изготавливали из стеклянных капилляров (наружный диаметр 1 мм, внутренний 0,6 мм) с помощью вертикальной микроузницы (производство ИБП РАН,

Россия). Наружный диаметр изготовленной иглы, измеренный микрометром, составлял 20 мкм и внутренний – 12 мкм. Для получения острых концов иглы обрезали лезвием микротомы под углом 45° под бинокулярным микроскопом МБС-9 (ПО “Рубин”, Россия).

Эмбрионы помещали в чашках Петри с водой на рабочий стол микроскопа “Olympus SZ” (Olympus Optical, Germany) с установленной цифровой фотокамерой “Olympus SP-350” и фиксировали с помощью вакуумного манипулятора.

Общий объем эмбриона с хорионом и объем ЖМ рассчитывали по формуле: $4/3(D/2)^3\pi$ [10], объем ПП определяли как разницу объемов: $V_{ПП} = V_{\text{э}} - V_{\text{ЖМ}}$, где $V_{ПП}$ – объем ПП; $V_{\text{э}}$ – общий объем эмбриона с хорионом; $V_{\text{ЖМ}}$ – объем ЖМ.

Конечные концентрации криопротекторов внутри ЖМ и ПП были определены как отношение объема микроинжецированного криопротектора с данной концентрацией к объему ЖМ или ПП [8] (таблица).

В экспериментах эмбрионы прокалывали микроиглой для определения влияния механических повреждений на их способность к дальнейшему развитию, количество выживших эмбрионов учитывали по отношению к контролю.

Растворы криопротекторов ДМСО, ПЭО-100, ПЭО-1500 и ФА в концентрациях 10, 50, 95% вводили внутрь ЖМ и ПП эмбрионов без красителя. Объем вводимого криопротектора определяли как

Концентрации криопротекторов внутри ЖМ и ПП

Криопротектор	Концентрация введенного криопротектора		Концентрация криопротектора внутри	
	%	М	ЖМ	ПП
ДМСО	10	1,41	0,42	0,28
ДМСО	50	7,04	2,12	1,42
ДМСО	95	13,38	4,02	2,70
ПЭО-100	10	1,12	0,34	0,226
ПЭО-100	50	5,60	1,68	1,13
ПЭО-100	95	10,64	3,20	2,149
ПЭО-1500	10	0,076	0,023	0,015
ПЭО-1500	50	0,38	0,114	0,077
ПЭО-1500	50	0,38	0,114	0,077
ФА	10	2,51	0,755	0,507
ФА	50	12,54	3,77	2,53
ФА	95	23,83	7,167	4,814

$V_{кр} = h\pi(D/2)^2$ и составил $0,40 \pm 0,02 \text{ мм}^3$. Контроль осуществляли шкалой микрометра.

В каждой серии эксперимента ($n=6$) использовали 10–15 инъецированных эмбрионов. После микроинъекций эмбрионы помещали в чашки Петри с 30%-м раствором сахарозы на 30 мин, затем в 10%-й раствор сахарозы – на 30 мин и отстоянную воду. Воду меняли 3 раза в сутки. В конце экспериментов подсчитывали общее количество выживших эмбрионов, прошедших все стадии эмбрионального развития до стадии выклева.

Статистический анализ результатов был проведен с помощью пакета прикладных программ “Statistica” [6]. Для определения статистически значимых различий в сравниваемых группах эмбрионов на выживаемость использовали тесты Тьюки и Манна-Уитни. Статистически значимыми различия считали при $p < 0,05$. Результаты представлены в виде среднего \pm стандартная ошибка.

Результаты и обсуждение

Линейные характеристики эмбрионов соответствовали данным [2]. Получены следующие линейные и объемные характеристики эмбрионов вьюна на стадии развития поздней бластулы (среднее \pm стандартное отклонение): наружный диаметр эмбриона с хорионом ($1,7 \pm 0,1 \text{ мм}$); диаметр ЖМ ($1,24 \pm 0,07 \text{ мм}$); общий объем ($2,57 \pm 0,45 \text{ мм}^3$); объем ЖМ ($0,99 \pm 0,16 \text{ мм}^3$); V_{III} – объем ПП ($1,58 \pm 0,31 \text{ мм}^3$).

При прокалывании микроиглой различных областей эмбрионов без введения криопротекторов наблюдали механические повреждения, влияющие на выживаемость (рис. 1).

Эмбрионы в экспериментах на выживаемость с проколотым хорионом не имели статистически значимых отличий от контрольной группы ($95,7 \pm 2,4$ и $97,8 \pm 1,9\%$, $p < 0,05$). Эмбрионы, проколотые в область ЖМ через хорион и перибласт, имели высокий процент выживаемости и существенно не отличались от тех, у которых был проколот лишь хорион.

При введении криопротекторов ДМСО, ПЭО-100, ПЭО-1500 и ФА в концентрациях 10, 50 и 95% в область ЖМ наблюдался высокий уровень выживаемости эмбрионов (рис. 2).

Микроинъекции криопротекторов ПЭО-100 и ПЭО-1500 в ЖМ во всех концентрациях не влияли на выживаемость и не отличались от групп, в которых

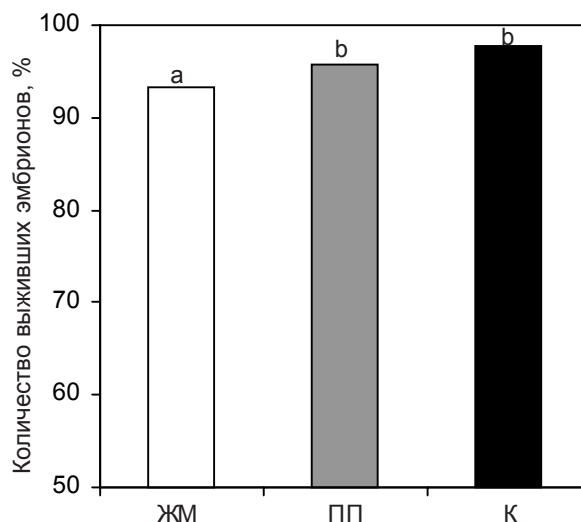


Рис. 1. Влияние механических повреждений на выживаемость эмбрионов вьюна. К – нативные эмбрионы контрольной группы (статистически значимые различия обозначены символами, тест Anova, $p < 0,05$, $n=6$).

ЖМ эмбрионов прокалывали микроиглой без введения криопротекторов. В микроинъекции увеличение концентрации криопротектора ФА до 95% приводило к повышению уровня смертности эмбрионов по сравнению с концентрациями ФА 10 и 50%. Количество выживших эмбрионов при этом уменьшалось с $54,1 \pm 3,1$ (концентрация 10%) до $31,7 \pm 2,4\%$ (концентрация 95%).

Влияние криопротекторов на выживаемость эмбрионов вьюна при введении микроинъекции в область ПП представлено на рис. 3.

Наименьшее негативное влияние на выживаемость эмбрионов наблюдалось при микроинъекции ПЭО-100 и ПЭО-1500 в концентрациях до 50%. Но при увеличении концентрации криопротектора

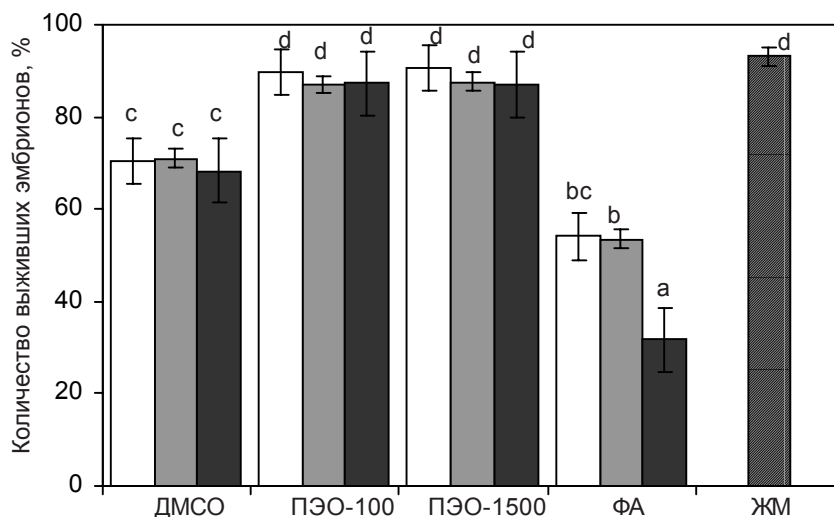


Рис. 2. Выживаемость эмбрионов вьюна при введении криопротекторов в область желточного мешка. ЖМ – желточный мешок с проколом без введения криопротектора (статистически значимые различия обозначены символами, тест Anova, $p < 0,05$, $n=6$, \pm стандартная ошибка). □ – 10%; ■ – 50%; ■ – 95%; ▨ – 0%.

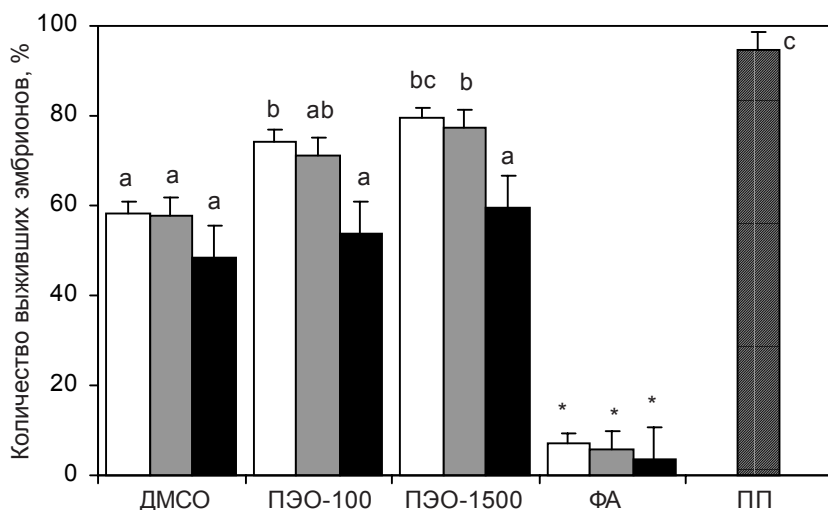


Рис. 3. Выживаемость эмбрионов вьюна при введении криопротекторов в область перивителлинового пространства. ПП – перивителлиновое пространство с проколом без введения криопротектора (статистически значимые различия обозначены символами, тест Anova, $p < 0,05$, $n=6$, \pm стандартная ошибка). □ – 10%; ■ – 50%; ■ – 95%; ▨ – 0%.

текторов до 95% количество погибших эмбрионов увеличивалось и было сравнимо при использовании ДМСО. Криопротектор ФА оказывал наибольшее влияние на уровень смертности эмбрионов в тех случаях, когда даже 10%-я концентрация вводимого вещества вызывала гибель всех эмбрионов в исследуемых группах.

В [19, 27] сообщалось о методе микроинъекции как об адекватной технике при насыщении эмбрионов рыб криопротекторами. В этой работе мы показали, что микроинъекция может служить удобным способом введения криопротекторов внутрь ЖМ эмбрионов вьюна на стадии поздней бластулы без существенного негативного влияния на их жизнеспособность. При этом допустима 4 М концентрация проникающих криопротекторов, что, возможно, усилит положительный эффект микроинъекций при создании методов криоконсервирования эмбрионов на основе их витрификации.

Согласно данным [18] степень проницаемости каждого криопротектора обратно пропорциональна его молекулярной массе. Хотя желток не содержит клеток с ядерным аппаратом и не участвует в делении эмбриональных клеток, но он активно участвует в метаболизме веществ, поддерживая рост и развитие эмбриона [1, 3]. Криопротекторы, введенные в ЖМ, должны преодолеть желточный синцитий, чтобы проникнуть в клетки эмбриона. Проницаемость этого слоя очень низка и считается, что криопротекторы не в состоянии снаружи преодолеть этот барьер. Поэтому, кроме ранее описанного влияния некоторых криопротекторов на развивающийся эмбрион рыб [17, 19], в эксперименты был включен ФА, имеющий наименьшую молекулярную массу (45,04) и, вероятно, более высокую спо-

собность проникать через биомембраны. Установлено, что из исследованных нами криопротекторов ФА обладает наиболее высокой проникающей способностью. Однако этот криопротектор оказывает негативное влияние на дальнейшее развитие эмбрионов вьюна и, возможно, имеет тератогенные свойства, что не позволяет использовать его в чистом виде. Мы предполагаем, что низкая выживаемость эмбрионов при микроинъекциях ФА в концентрациях от 10 до 95% в областях ПП (7–3,6%) и ЖМ (54,1–31,7%) связана с его активным проникновением в клеточные структуры blastomeres через все мембранные комплексы. Вероятно, этот криопротектор может быть включен в определенных концентрациях в состав криозащитных сред.

Установлено, что при инкубации эмбрионов в средах с различными концентрациями ДМСО уровень смертности повышается с увеличением концентрации [30]. Однако в нашем случае введение фиксированного объема ДМСО (0,4 мм³) внутрь ЖМ с максимальной концентрацией (95%) не приводило к статистически значимым отличиям и не влияло на уровень смертности эмбрионов.

Объем вводимых криопротекторов в нашей работе был больше и их конечная концентрация была выше, чем в экспериментах, проведенных ранее на эмбрионах морского карася (*Sparus aurata*) и тюрбо (*Scophthalmus maximus*) [8, 27]. Несмотря на то, что устойчивость к криопротекторам у морских видов выше, в нашем случае было показано, что уровень выживаемости эмбрионов вьюна при введении ДМСО в область ЖМ был несколько больше при максимальной концентрации и достигал 70%. Возможно, причина этого в том, что после микроинъекции мы переносили эмбрионы в среду с 0,88 М сахарозы, в которой, вероятно, ДМСО перемещался по эмбриону и частично выходил за пределы ЖМ. В работе [27] было показано, что микроинъекцированные антифризные белки в ЖМ эмбрионов тюрбо не проникают за его пределы, а в работе [19] установлено, что микроинъекции ДМСО и этиленгликоля в ЖМ в концентрациях 2,4 и 5,2 М оказали влияние на уровень смертности эмбрионов данио рерио на стадии морулы, при этом их выживаемость составила 60 и 14% соответственно. Увеличение концентрации ДМСО до 6,1 М, введенного эмбрионам данио

период на стадии развития хвостовой почки, не оказало влияния на уровень смертности, что, по мнению авторов [19], свидетельствует о его низкой проницаемости через желточный синцитий. Однако в экспериментах [9] показано, что введение ДМСО в ЖМ в концентрациях 6 и 4 М на 10 и 30 мин при инкубации в этих же концентрациях криопротектора соответственно приводило к полной гибели всех эмбрионов морского карася на стадии развития хвостовой почки. Поэтому рекомендовано [9] использовать ДМСО в концентрации 3 М при введении внутрь ЖМ и инкубации эмбрионов в этой же концентрации криопротектора в течение 30 мин, при которой выживаемость эмбрионов составила 35–72%.

В результате использования криопротекторов группы ПЭО мы предположили, что большая молекулярная масса не позволит им за короткий период преодолеть желточный синцитий и повредить клетки эмбриона [29]. Осмотическое давление водных растворов ПЭО-криопротекторов близко к изоосмотическому и не должно вызывать значительных повреждений биологических структур [5]. При этом выживаемость эмбрионов у ПЭО-100 составила 89,7–87,3% и ПЭО-1500 – 90,6–87% в концентрациях 10–95%. Введение этих криопротекторов в ПП несколько снизило общий уровень выживаемости эмбрионов в течение последующей 30-минутной инкубации в растворе сахарозы 30 и 10%. Допускается, что ПЭО-криопротекторы благодаря наличию низкомолекулярных фракций частично могут проникать в клетки, снижая общий уровень выживаемости, но остальное количество адсорбируется на клеточной мембране [5]. Угнетение функциональной активности биологических объектов после действия ПЭО обратимо и полностью снимается после удаления криопротектора [7]. Поэтому снижение уровня выживаемости, с одной стороны, можно объяснить специфическим влиянием криопротекторов на биологические структуры [12] и непосредственным взаимодействием клеток бластодермы с этими криопротекторами [19], с другой стороны, неоднозначной реакцией различных структурных комплексов развивающегося эмбриона на криопротекторы, что усложняет общее насыщение развивающегося эмбриона криозащитной средой [17].

Высокий уровень выживаемости эмбрионов вьюна в наших экспериментах при введении ПЭО-криопротекторов в область ЖМ при концентрациях от 10 до 95% (выживаемость 90,6–87% соответственно) показал, что после инъекции инкубация может проводиться в криопротекторах с минимальной токсичностью, например в сахарозе или других

аналогичных криопротекторах. Сахаросодержащие криопротекторные среды понижают уровень смертности биологических объектов [20, 28]. При замораживании эмбрионов необходимо учитывать, что возможные микроповреждения при инъекции могут влиять на общий уровень выживаемости [19], а изменение осмотического давления, сопровождающее отогрев, может вызвать повреждение биологических структур, поэтому необходимо учитывать индивидуальную чувствительность объекта [5].

Мы предполагаем, что дальнейшие исследования многокомпонентных криозащитных сред на основе проникающих и непроникающих криопротекторов – эффективное направление криобиологических исследований эмбрионов рыб.

Выводы

Микроинъекция может быть методом введения криопротекторов в различные области эмбрионов вьюна на стадии поздней бластулы. Выживаемость эмбрионов вьюна зависит от химического состава вводимой криозащитной среды и области введения.

При микроинъекции криопротекторов в желточный мешок установлен минимальный уровень смертности эмбрионов вьюна.

Введение непроникающих криопротекторов оказывает наименьшее повреждающее действие при микроинъекции в эмбрионы вьюна, а введение проникающих криопротекторов позволяет достичь высоких концентраций внутри эмбриональных структур.

Литература

1. *Игнатьева Г.М.* Ранний эмбриогенез рыб и амфибий.– М.: Наука, 1979.– 176 с.
2. *Костомарова А.А.* Вьюн *Misgurnus fossilis* L. Объекты биологии развития // Под ред. Т.А. Детлаф.– М.: Наука, 1975.– С. 308–323.
3. *Макеева А.П.* Эмбриология рыб.– М.: МГУ, 1992.– 216 с.
4. *Нейфах А.А.* Использование метода радиоактивной инактивации ядер для исследования их функций в раннем развитии рыб // Журн. общей биологии.– 1959.– Т. 20.– С. 202–213.
5. *Пушкарь Н.С., Шраго М.И., Белоус А.М., Калугин Ю.В.* Криопротекторы.– Киев: Наук. думка, 1978.– 204 с.
6. *Реброва О.Ю.* Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ Statistica.– М.: МедиаСфера, 2002.– 312 с.
7. *Сафонова Т.С., Микулинский Ю.Е.* Изучение действия низких температур и криофилактика на выживаемость и метаболическую активность некоторых видов бактерий / В кн.: Современные вопросы криобиологии.– Киев: Наук. думка, 1976.– С. 69–70.
8. *Beirao J., Robles V., Herraes M.P. et al.* Cryoprotectant microinjection toxicity and chilling sensitivity in gilthead seabream (*Sparus aurata*) embryos // Aquaculture.– 2006.– N 261.– P. 897–903.

9. Cabrita E., Robles V., Wallace J.C. et al. Preliminary studies on the cryopreservation of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) embryos // *Aquaculture*.– 2006.– Vol. 251, N2–4.– P. 245–255.
10. Cabrita E., Robles V., Chereguini O. et al. Dimethyl sulfoxid influx in turbot embryos to a vitrification protocol // *Theriogenology*.– 2003.– Vol. 60, N3.– P. 463–473.
11. *Cryopreservation in aquatic species* / Eds: T.R. Tiersch and P.M. Mazik.– Baton Rouge: The World Aquaculture Society, 2000.– 441 p.
12. Fahy G.M., Lilley T.H., Linsdell H. et al. Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: In search of molecular mechanisms // *Cryobiology*.– 1990.– Vol. 27, N3.– P. 247–268.
13. Gwo J.C. Cryopreservation of eggs and embryos from aquatic organisms / In: *Cryopreservation in aquatic species* / Eds: T.R. Tiersch and P.M. Mazik.– Baton Rouge: The World Aquaculture Society, 2000.– P. 211–229.
14. Hagedorn M., Kleinhans F.W., Artemov D. et al. Characterization of a major permeability barrier in the zebrafish embryo // *Biology of Reproduction*.– 1998.– Vol. 59, N 5.– P. 1240–1250.
15. Hagedorn M., Kleinhans F.W., Freitas R. et al. Water distribution and permeability of zebrafish embryos, *Brachydanio rerio* // *J. of Exper. Zoology*.– 1997.– Vol. 278, N6.– P. 356–371.
16. 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.
17. 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. Nati. Acad. Sci. USA*.– 1996.– Vol. 93.– P. 7454–7459.
18. Harvey B., Ashwood-Smith M.J. Cryoprotectant penetration and supercooling in the eggs of salmonid fishes // *Cryobiology*.– 1982.– Vol. 19, N1.– P. 29–40.
19. Janik M., Kleinhans F.W., Hagedorn M. Overcoming a permeability barrier by microinjecting of cryoprotectants into the yolk of zebrafish embryos (*Brachydanio rerio*) // *Cryobiology*.– 2000.– Vol. 41, N1.– P. 25–34.
20. 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 toxicity to embryos and oocytes // *Cryobiology*.– 1999.– Vol 38, N2.– P. 119–130.
21. Leibo S.P. Cryopreservation of oocytes and embryos: Optimization by theoretical versus empirical analysis // *Theriogenology*.– 2008.– Vol. 69, N1.– P. 37–47.
22. Liu X.H., Zhang T.T., Rawson D.M. Differential scanning calorimetry studies of intraembryonic freezing and cryoprotectant penetration in zebrafish (*Danio rerio*) embryos // *J. of Exper. Zoology*.– 2001.– Vol. 290.– P. 299–310.
23. 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.
24. Liu X.H., Zhang T.T., Rawson D.M. The effect of partial removal of yolk on the chilling sensitivity of zebrafish (*Danio rerio*) embryos // *Cryobiology*.– 1999.– Vol. 39, N3.– P. 236–242.
25. Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications // *Amer. J. of Physiology*.– 1984.– Vol. 247, N3, Pt1.– P. 125–142.
26. Rana K.J., Gilmour A. Cryopreservation of fish spermatozoa: effect of cooling methods on the reproducibility of cooling rates and viability // *Refrigeration and Aquaculture Conference*.– Bordeaux, 1996.– P. 3–12.
27. Robles V., Cabrita E., Herraiz M.P. Microinjection of anti-freeze proteins into turbot embryos // *Cryobiology*.– 2004.– Vol. 49, N3.– P. 317–318.
28. Sakkas D., Urned F., Menezo Y., Leppens G. Effects of glucose and fructose on fertilization, cleavage and viability of mouse embryos in vitro // *Biol. Reprod*.– 1993.– Vol. 49.– P. 1288–1292.
29. Spiegel A.J., Nosenworthy M.M. Use of non-aqueous solvents in parental products // *J. Pharm. Sci*.– 1963.– Vol. 52.– P. 917–927.
30. Suzuki T., Komada H., Takai R. et al. Relation between toxicity of cryoprotectant DMSO and its concentration in several fish embryos // *Fish Sci*.– 1995.– Vol. 61.– P. 193–197.
31. Tian Y.S., Chen S.L., Yan A.S. et al. Studies on vitrification method of sea perch (*Lateolabrax japonicus*) embryos // *Acta Zoologica*.– 2003.– Vol. 49.– P. 843–850.
32. Wildt D.E. Genetic resource banking for conserving wildlife species justification, and becoming organized on a global basis // *Anim. Reprod. Sci*.– 1992.– Vol. 28, N1.– P. 247–257.
33. Zhang T.T., Rawson D.M. Feasibility studies on vitrification of intact zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos // *Cryobiology*.– 1996.– Vol. 33, N1.– P. 1–13.

Поступила 23.09.2008