

УДК: 547.42:597.551.2

ВИЖИВАНІСТЬ ЕМБРІОНІВ В'ЮНА (*MISGURNUS FOSSILIS*, L. 1758) НА РІЗНИХ СТАДІЯХ РОЗВИТКУ ПІСЛЯ ЇХ ІНКУБАЦІЇ У ВІТРИФІКУЮЧИХ СЕРЕДОВИЩАХ

Рецензенти: доктор. біол. наук, професор Бугров О.Д.; канд. біол. наук Дзюба Б.Б.

К.Б. Міксон

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України

*У роботі викладені результати вивчення за типом латинського квадрату 5х5 стійкості ембріонів в'юна (*Misgurnus fossilis* L. 1758) на 5 стадіях розвитку після 30 хвилин оброблення вітрифікуючими середовищами (1. – 30 % сахарози; 2. – 30 % сахарози і 10 % метанолу; 3. – 30 % сахарози, 10 % метанолу і 2 % ПЕО-3000). Встановлено, що 23-я стадія розвитку ембріона найстійкіша до вітрифікуючих середовищ. Стадія 33 відповідно найбільш проникна для кріопротекторів. Подальші дослідження умов вітрифікації ембріонів є перспективнішим напрямом у створенні кріобанків ембріонів риб.*

Ключові слова: ембріон, вітрифікація, кріопротектор, кріобанк, риба, в'юн.

Не дивлячись на велику кількість робіт, присвячених кріоконсервації ембріонів і ооцитів риб [1-2], до нині позитивний результат так і не був досягнутий [3, 6]. Це пояснюється їх великими розмірами, високою гетерогенністю структур, низькою проникністю мембран і об'ємом жовткового мішка [9]. Таким чином, для насичення ембріонів кріопротекторами потрібний значний час. Проте, збільшення часу витримки ембріонів у кріозахисних середовищах призводить до їх загибелі ще до заморожування унаслідок токсичності кріопротекторів [1, 7]. Для зменшення часу контакту ембріонів із кріопротекторами підвищували проникність мембран клітин ембріонів, використовуючи аквапорин [4], вибирали стадії розвитку ембріонів із найбільшою проникністю [8] і підбирали найбільш відповідні температурні умови насичення [5, 8]. Проте, ці експерименти виявилися невдалими. Ембріони в них гинули від внутріклітинної кристалізації [5].

Ряд авторів прийшли до висновку про необхідність використання вітрифікації для кріоконсервації ембріонів риб, але і це до цих пір не принесло позитивних результатів [7, 9]. Ймовірно, вибір найбільш відповідної для кріоконсервації стадії [1, 3] залишається актуальною проблемою.

У зв'язку з вищесказаним, нам здалося доцільним вивчити стадії розвитку, найбільш стійкі до вітрифікуючих середовищ, в яких відбувається продовження розвитку.

Матеріали і методи досліджень. Робота була проведена з використанням ембріонів в'юна (*Misgurnus fossilis*, Linnaeus, 1758), які були отримані за допомогою раніше описаного методу Нейфаха [12]. Після ін'єкції хоріонічного гонадотропіну - самичкам по 300 од, самцям по 100 од - плідників розміщували в ємності з водою, об'ємом до 10 літрів, для подальшого дозрівання, і утримували надалі при кімнатній температурі 21 °С. Дозрівання наставало через 30-36 годин. Після отримання статевих продуктів, ікру, відібрану від кожної з п'яти самичок, запліднювали сумішшю сперматозоїдів від декількох самців і розподіляли по чашках Петрі ~ по 200 штук для подальшої інкубації. Зміну води проводили тричотири рази на добу. Загиблі ембріони вилучали з кожної чашки, при цьому враховували відсоток загиблих ембріонів на даній стадії. Підраховували кількість ембріонів, що розвиваються нормально та аномально, з різними відхиленнями

для подальшого статистичного опрацювання. Оцінку ембріонів, що розвиваються, проводили згідно з картами ембріонального розвитку, складеними Костомаровою [10].

Для з'ясування впливу стадії розвитку ембріонів у момент оброблення кріозахисним середовищем на виживаність ембріонів використовували планування багатофакторного експерименту за типом латинського квадрата 5x5. У даному експерименті чинниками, що задаються, були: склад кріозахисних середовищ - 3 чинники - 1). 30 % сахарози; 2). 30 % сахарози, 10 % метанолу; 3). 30 % сахарози, 10 % метанолу, 2 % ПЕО-3000, температура інкубації - 2 чинники (5 °C і 21 °C), і стадія ембріонального розвитку.

Аналіз результатів був проведений за два етапи. На першому етапі проводили загальний аналіз дисперсії отримуваних результатів з урахуванням впливу кожного з чинників експерименту [13]. На цьому етапі експериментальні дані були проаналізовані за допомогою комп'ютерної програми опрацювання статистичних даних "STATGRAF" для багатофакторного експерименту. Первинне опрацювання даних (таблиця), вказує на рівні значущості з урахуванням критерію Фішера кожного з даних чинників.

На другому етапі статистичного опрацювання результатів були розглянуті питання щодо статистичної значущості відмінностей усередині кожного з даних чинників. Для цього застосовували метод парних порівнянь із використанням критерію Стьюдента [11].

Рівень достовірності отриманих результатів приймався значущим при $p < 0,05$. На малюнках представлені середні значення по досліджених чинниках та узагальнена середня помилка.

Результати досліджень. Результати статистичного опрацювання багатофакторного експерименту представлені в таблиці, з яких виходить, що кожен із даних чинників є значущим відповідно до критеріїв Фішера [13].

Після проведення дисперсійного аналізу за критерієм Фішера на другому етапі опрацювання результатів розглядали питання щодо статистичних відмінностей впливу усередині досліджуваних чинників. Аналіз впливу стадії розвитку ембріонів, оброблених кріозахисними середовищами, на виживаність і появу ембріонів, що аномально розвиваються, представлений на рис. 1, 2.

Для зневоднення і насичення ембріонів кріопротекторами в нашому експерименті використовували кріозахисні середовища з високою концентрацією кріопротекторів, що дало б можливість при подальшому заморожуванні досягти ефекту вітрифікації. Нами було встановлено, що найбільший відсоток ембріонів, що вижили, спостерігався на 23-й стадії розвитку (див. рис. 1).

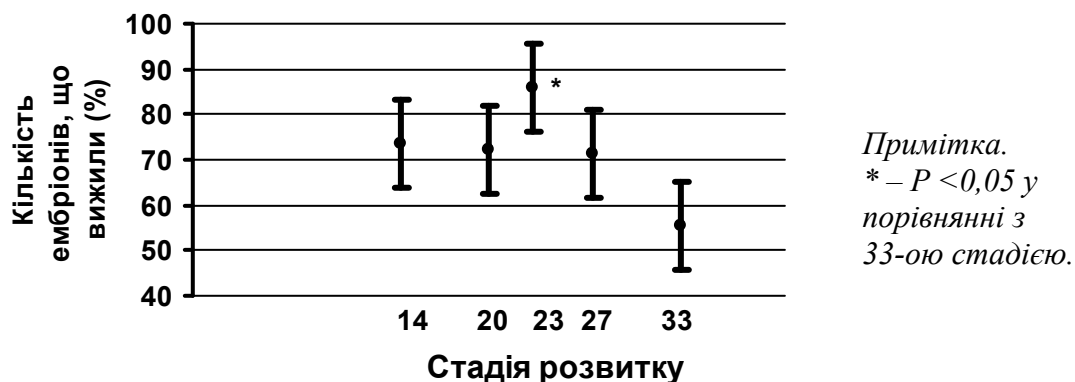


Рис. 1. Вплив стадії розвитку на виживаність ембріонів.

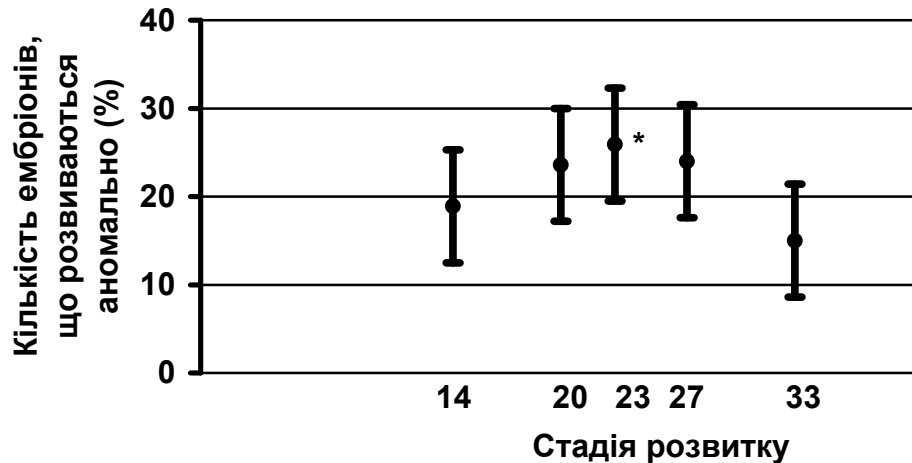


Рис. 2. Вплив вітрифікуючих середовищ на аномальний розвиток ембріонів на різних стадіях розвитку.

*Примітка. * – у порівнянні з 33-ою стадією розвитку.*

Достовірних відмінностей в появі ембріонів, що аномально розвиваються, не спостерігалось при вивчених діях (див. рис.2).

Представлені результати дають змогу зробити висновки про те, що стадія розвитку ембріонів в'юна, на якій проводиться інкубація з кріозахисним середовищем, є визначальним чинником у пошуку методу вітрифікації. Встановлені відмінності виживаності ембріонів від вибраної стадії, на якій проводилася інкубація з кріозахисним середовищем. Достовірні відмінності за виживаністю спостерігалися тільки між 23-ою і 33-ою стадіями розвитку. Достовірних відмінностей між рештою стадій не було виявлено. Спостережувана тенденція щодо збільшення виживаності на 23-ій стадії дає змогу припустити, що саме на цій стадії розвитку ембріони найстійкіші до впливу температури і високої концентрації кріопротекторів у кріозахисних середовищах. На цій стадії, 6-ти пар тулубних сомітів, ще немає складно влаштованих гетерогенних структур. У той же час співвідношення жовтка і клітин бластодекти найоптимальніші для рівномірного проникнення кріопротектора скрізь мембрани [1, 9].

Висновок. Оскільки на стадії 6-ти пар тулубних сомітів ще немає складно влаштованих гетерогенних структур, ембріони в'юна саме на 23-ій стадії розвитку є найстійкішими до впливу температури і високої концентрації кріопротекторів у кріозахисних середовищах.

Подальші дослідження умов вітрифікації ембріонів є перспективнішим напрямом у створенні кріобанків ембріонів риб.

Бібліографічний список

1. Bart A.N. New approaches in cryopreservation of fish embryos. In: Cryopreservation in Aquatic Species. Tierch T.R., Mazik P.M., Editors. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana. (2000).- P. 179–187.
2. Blaxter J.H.S. Development: Eggs and larvae, In: Fish Physiology, Vol. III. W.S. Hoar and D.J. Randall, editors. Academic Press, New York, (1955) pp. 177–253.
3. Ding, F.H., Xiao, Z.Z. and Li, J. Preliminary studies on the vitrification of red sea bream (*Pagrus major*) embryos. Theriogenology (2007), 68, 702–708.

4. Altering fish embryos with aquaporin-3: an essential step toward successful cryopreservation / [M. Hagedorn, S.L. Lance, D.M. Fonseca, F.W. Kleinhans, D. Artemov, R. Fleischer, A.T. M.S. Hoque, M.B. Hamilton, B.S. Pukazhenthil].- Biol. Reprod. (2002) 67.- 961–966.
5. Chilling sensitivity and cryoprotectant permeability of dechorionated zebrafish embryos, *Brachydanio rerio* / [M. Hagedorn, F.W. Kleinhans, D.E. Wildt, W.F. Rall]//Cryobiology (1997).- 34.- 251–263.
6. Lubzens, E. Cryopreservation of Fish Oocytes: Can this be Achieved? / E. Lubzens, I. Pekarsky, I. Blais / The First International Workshop on the Biology of Fish Sperm. (2007) .- P. 60.
7. Vitrification assays with embryos from a cold tolerant sub-arctic fish species / [Robles V., Cabrita E., Fletcher G.L., Shears M.A., King M.J., Herráez M.P.]//Teriogenology .-2005.- 64 (7).- P. 1633–1646.
8. A study on the cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio*) embryos / [Zhang, X.S., Zhao L., Hua T.C., Chen X.H. and Zhu H.Y.].// Cryo-Letters.-1989.-№ 10.- P. 271–278 .
9. Zhang T.T., Cryopreservation of Gametes and Embryos of Aquatic Species / Life in the Frozen State /Edited by Fuller B.J., Lane N., Benson E.E.; CRC Press LLC. - 2004. - Ch. 14.- P.672.
10. Костомарова А.А. Вьюн *Misgurnus fossilis* L. /А.А. Костомарова //Объекты биологии развития. – Москва: Наука, 1975.- С. 308–323.
11. Лисенков А. Н. Математические методы планирования многофакторных медико-биологических экспериментов /А.Н. Лисенков.- Москва: Медицина, 1979.- 344 с.
12. Нейфах А.А. Использование метода радиоактивной инактивации ядер для исследования их функций в раннем развитии рыб /А.А. Нейфах //Журнал общей биологии. -1959.- 20.-С. 202–213.
13. Планирование эксперимента в исследовании технологических процессов / [К. Хартман, Э. Лецкий, В. Шефер и др.]; под ред. Э. Лецкий - Москва: Мир, 1977.- 552 с.

ВЫЖИВАЕМОСТЬ ЭМБРИОНОВ ВЬЮНА (*MISGURNUS FOSSILIS*, L. 1758) НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ РАЗВИТИЯ ПОСЛЕ ИХ ИНКУБАЦИИ В ВИТРИФИКАЦИОННЫХ СРЕДАХ

Миксон К.Б., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

*В работе представлены результаты изучения выживаемости эмбрионов вьюна (*Misgurnus fossilis* L. 1758) на разных стадиях развития после инкубации в витрифицирующей среде. В эксперименте по типу латинского квадрата 5x5 исследовали устойчивость эмбрионов вьюна на 5 стадиях развития после 30 минут обработки витрифицирующими средами (1. – 30 % сахарозы; 2. – 30 % сахарозы и 10 % метанола; 3. – 3 0% сахарозы, 10 % метанола и 2 % ПЭО-3000). Установлено, что 23–я стадия развития эмбриона наиболее устойчива к витрифицирующим средам. Стадия 33 соответственно наиболее проницаема для криопротекторов. Дальнейшие исследования условий витрификации эмбрионов являются наиболее перспективным направлением в создании криобанков эмбрионов рыб.*

Ключевые слова: эмбрион, витрификация, криопротектор, криобанк, рыба, вьюн.

THE LOACH EMBRYO SURVIVAL RATE ON THE VARIOUS DEVELOPMENTAL STAGES AFTER IN-VITRO MEDIUM INCUBATION

Mixon K.; Institute of freezing biology & medicine affiliated to the national academy of sciences of Ukraine, Kharkiv

This article highlights the experimental research results on the loach embryo survival rate during the various developmental stages after in-vitro medium incubation. The loach embryo survival test was executed during the 5 developmental stages after in-vitro medium treatment. The procedure lasted 30 minutes. The in-vitro medium was composed by 30% cane sugar, 10% methanol & 2% PEO-3000. The 23 developmental stage proved to be the most chemically resistant to the in-vitro medium. The 33 developmental stage proved to be non-resistant to the freezing protectors. The new in-vitro embryo freezing preservation techniques were elaborated. The test data on the fish embryos were registered.

Key words: embryo, in-vitro freezing preservation, frozen embryo preservation data, loach, fish, freezing protector.

УДК 636.2.082.453.5

ВЛИЯНИЕ СОРБЕНТОВ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ СПЕРМЫ БЫКОВ, ЗАМОРОЖЕННОЙ ПО РАЗНЫМ ТЕХНОЛОГИЯМ КРИОКОНСЕРВАЦИИ

Рецензенты: доктор биол. наук, академик УААН Осташко Ф.И.; канд. с.-х. наук Шигимага В.А.

А.В. Соклакова, А.Б. Сушко, М.С. Савельева

Институт животноводства УААН

М.Е. Романько

Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины УААН

Показаны результаты исследований введения в ингредиентный состав разбавителей сорбентов: атокса и сорбовера в концентрации 0,06%, позволяющие вдвое сократить адаптационно-эквilibрационный период при использовании существующих технологий криоконсервации спермы быков. Исползованные препараты ингибируют развитие во времени интенсивности окислительных процессов, происходящих в фосфолипидах мембран спермиев и разбавителя и повышают устойчивость мембранного аппарата половых клеток к негативному воздействию температурных градиентов, возникающих при крио- и деконсервации спермиев. Присутствие сорбентов в разбавленной сперме позволяет повысить биологическую полноценность спермы после ее замораживания, характеризующееся увеличением показателей качества оплодотворяющей способности.

Ключевые слова: сперма, быки-производители, сорбенты, разбавитель, деконсервация, выживаемость, активность.

Одним из методов крупномасштабного создания и пополнения криобанка элитных пород крупного рогатого скота является метод глубокого (до -196 °C) замораживания спермы быков-производителей, характеризующийся высокой эффективностью и широким внедрением в практику животноводства многих стран. Однако, несмотря на удачные технологические решения, существенным недостатком его является значительное снижение количества полноценных спермиев после их деконсервации. В настоящее время, при использовании всех существующих технологий криоконсервации спермы потери спермопродукции