

УДК 547.422:597.554.3.084

К.Б. Миксон\*, Е.Б. Ревенко, А.А. Гапон

## Влияние растворов криопротекторов на выживаемость и тератогенность эмбрионов карася (*Carassius auratus gibelio* Bloch, 1783)

UDC 615.014.41:612.647.014.3:611.018.46

K.B. Mikson\*, E.B. Revenko, A.A. Gapon

### Effect of Cryoprotective Solutions on Survival and Teratogenicity of Prussian Carp Embryos (*Carassius auratus gibelio* Bloch, 1783)

**Реферат:** Исследовано влияние растворов криопротекторов, принадлежащих к различным классам химических веществ, на выживаемость и аномальное развитие эмбрионов карася (*Carassius auratus gibelio* Bloch, 1783) на стадии развития, соответствующей 6 сомитам. В течение 60 мин эмбрионы инкубировали в 10%-х растворах криопротекторов диметилсульфоксида (ДМСО), 1,2-пропандиола (1,2-ПД), 1,3-пропандиола (1,3-ПД), 1,3-бутандиола (1,3-БД), 1,4-бутандиола (1,4-БД), 1,2-метаоксиэтана (1,2-МОЭ), глицерина, этиленгликоля (ЭГ), метанола, полиэтиленоксида (ПЭО-1500) и сахарозы. После этого эмбрионы отмывали и прослеживали развитие до стадии свободно плавающей личинки. Наибольший уровень выживаемости эмбрионов карася (54–67%) наблюдался в 10%-х растворах 1,2-ПД, 1,3-ПД, ЭГ, ПЭО-1500, сахарозы, которые обеспечивали уровень сохранности нормально развивающихся эмбрионов, близкий к контрольному. Растворы криопротекторов 1,3-БД, 1,4-БД обладали большей токсичностью – уровень выживаемости в них составил 40–49%. В растворах криопротекторов 1,2-МОЭ, ДМСО, глицерина и метанола уровень выживаемости эмбрионов был минимальным. Наибольший уровень тератогенных эмбрионов наблюдали после инкубирования в растворах криопротекторов 1,2-МОЭ и метанола.

**Ключевые слова:** эмбрионы, карась, криопротектор, выживаемость, тератогенность.

**Реферат:** Досліджено вплив розчинів криопротекторів, які належать до різних класів хімічних речовин, на виживаність і аномальний розвиток ембріонів карася (*Carassius auratus gibelio* Bloch, 1783) на стадії розвитку, що відповідає 6 сомітам. Протягом 60 хв ембріони інкубували в 10%-х розчинах криопротекторів диметилсульфоксиду (ДМСО), 1,2-пропандіолу (1,2-ПД), 1,3-пропандіолу (1,3-ПД), 1,3-бутандіолу (1,3-БД), 1,4-бутандіолу (1,4-БД), 1,2-метаоксietану (1,2-МОЕ), глицерину, етиленгліколю (ЕГ), метанолу, поліетиленоксиду (ПЕО-1500) і сахарози. Після цього ембріони відмивали і простежували розвиток до стадії вільно плаваючої личинки. Найбільший рівень виживаності ембріонів карася (54–67%) спостерігався у 10%-х розчинах криопротекторів 1,2-ПД, 1,3-ПД, ЕГ, ПЕО-1500, сахарози, що забезпечували рівень збереження ембріонів, що нормально розвивалися, близький до контрольного. Розчини криопротекторів 1,3-БД, 1,4-БД мали більшу токсичність – рівень виживання в них склав 40–49%. У розчинах криопротекторів 1,2-МОЕ, ДМСО, глицерину і метанолу рівень виживання ембріонів був мінімальним. Найбільший рівень тератогенних ембріонів спостерігали після інкубації в розчинах криопротекторів 1,2-МОЕ та метанолу.

**Ключові слова:** ембріони, карась, криопротектор, виживаність, тератогенність.

**Abstract:** There was studied the effect of cryoprotective solutions, belonging to different classes of chemicals, on the survival and abnormal development of Prussian carp (*Carassius auratus gibelio* Bloch, 1783) embryos at the stage of development corresponding to 6 somites. The embryos were incubated during 60 minutes in 10% solutions of cryoprotectants dimethyl sulfoxide (DMSO), 1,2-propane diol (1,2-PD), 1,3-propane diol (1,3 PD), 1,3-butane diol (1,3-DB), 1,4-butane diol (1,4-BD), 1,2-methoxyethane (1,2-MOE), glycerol, ethylene glycol (EG), methanol, polyethyleneoxide (PEO-1500) and sucrose. Thereafter, the embryos were washed and traced to the stage of development of free-swimming larvae. The highest survival rates for the embryos of Prussian carp (54–67%) was observed in 10% solutions of 1,2-PD, 1,3-PD, EG, PEO-1500, and sucrose, providing the preservation of normally developing embryos close to the control level. Cryoprotective solutions of 1,3-BD, 1,4-BD had higher toxicity: the survival of embryos in those made 40–49%. In the solutions of 1,2-MOE, DMSO, glycerol and methanol cryoprotective agents the survival rate of embryos was minimal. The highest level of teratogenic embryos was observed after incubation in the cryoprotectant solutions of 1,2-MOE and methanol.

**Key words:** embryos, Prussian carp, cryoprotectant, survival, teratogenicity.

Отдел криобиологии системы репродукции, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

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

Поступила 14.02.2014

Принята в печать 07.05.2014

Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2014. – Т.24, №2. – С. 149–156.  
© 2014 Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

Department of Cryobiology of Reproduction System, 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 3119, fax: +380 57 373 3084,  
e-mail: kmikson@ukr.net

Received February 14, 2014

Accepted May 7, 2014

Probl. Cryobiol. Cryomed. 2014. 24(2): 149–156.  
© 2014 Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

В настоящее время разработаны эффективные методы криоконсервирования только для спермы рыб [25], а для эмбрионов эта проблема остаётся нерешенной [11]. Результаты исследований, проведенных на эмбрионах рыб разных видов и на разных стадиях их развития, подтверждают тот факт, что предлагаемые криопротекторы, входящие в состав криозащитных сред, и в целом способы криоконсервирования неэффективны. Известно, что подготовка биообъекта к глубокому охлаждению включает в себя инкубацию в криозащитных средах, содержащих как проникающие, так и непроникающие криозащитные компоненты. Большая часть эмбрионов погибает на этапе инкубации в среде криоконсервирования вследствие действия осмотического фактора [22] и токсичного влияния криопротекторов на эмбрионы [9]. Возникает потребность в новых подходах к решению этой задачи. Ряд авторов пришли к выводу о необходимости использования многокомпонентных криозащитных сред с высокой концентрацией криопротекторов и изменения скорости охлаждения до сверхбыстрой для создания условий стеклования [3, 4, 13]. Разработка эффективных методов криоконсервирования тесно связана с исследованием влияния криопротекторов на выживаемость эмбрионов с целью получения на их основе криозащитных сред. При этом необходимо, в первую очередь, изучить процессы транспорта воды и растворов криопротекторов в эмбрионы рыб [10].

Гетерогенность мембранных комплексов хориона, бластодермы и желточного синцития является основным препятствием для эффективного обезвоживания и насыщения клеток эмбрионов рыб криозащитным раствором [17, 19, 27]. При этом изменяется не только уровень выживаемости инкубированных в криозащитных средах эмбрионов, но и уровень их тератогенности. Повышение показателя сохранности эмбрионов при инкубации в криозащитных средах можно достичь путем снижения цитотоксического действия отдельных криозащитных компонентов среды [15]. В связи с этим исследование влияния растворов криопротекторов на морфофункциональную сохранность эмбрионов рыб позволит выбрать вещества с наименьшим негативным влиянием, которые потенциально могут входить в состав криозащитных сред [14]. Традиционно в исследованиях резистентности эмбрионов рыб при подготовке к глубокому охлаждению в составе криозащитных сред используются такие криопротекторы, как диметилсульфоксид, метанол, глицерин и этиленгликоль [8, 15, 16, 23]. Однако экспериментальные данные, полученные разными исследовательскими группами, носят разрозненный характер, а также требуют систематизации и дополнения.

To date there are effective cryopreservation methods developed only for fish sperm [25] and not for the embryos [4]. The results of the research performed in the embryos of various fishes and at different developmental stages in particular confirm the fact that the tested cryoprotective agents constituting the cryoprotective media and consequently the whole cryopreservation methods are not efficient. It is known that the preparing of a biological specimen for a deep cooling includes the incubation in cryoprotective media containing penetrating and/or non-penetrating cryoprotective components. The majority of embryos dies in cryopreservation medium already during incubation mainly due to osmotic factor [21] and toxic effect of cryoprotectants rendered to embryos [2]. Thereby the need in new approaches to solve this task appears. Some authors hypothesized the necessity to use multi-component cryoprotective media with a high concentration of cryoprotectants and to enhance the cooling rates up to ultra-rapid ones to facilitate vitrification [6, 19, 20]. Development of effective cryopreservation methods is tightly related to the investigations of the effect of cryoprotectants on survival of embryos which could be used to obtain cryoprotective media. Herewith it is primarily necessary to study the transport of water and cryoprotective solutions into fish embryos [3].

Heterogeneity of membrane complexes of chorion, blastoderm and yolk syncytium is the main obstacle for effective dehydration and saturation of fish embryo cells with cryoprotective solution [11, 13, 27]. Herewith not only the survival rate of incubated in cryoprotective media embryos alters but also does the level of their teratogenicity. Rise in the index of embryo survival post incubation in cryoprotective media could be achieved by reducing a cytotoxic effect of some cryoprotective components of the medium [8]. In this connection the study of the effect of cryoprotective solutions on morphofunctional integrity of fish embryos would allow to select the substances with the lowest negative effect, which could thereafter be the potential components of cryoprotective media [7]. Traditionally the studies concerning fish embryo resistance during preparing to a deep cooling are performed with such cryoprotectants as dimethyl sulfoxide, methanol, glycerol and ethylene glycol [8, 10, 18, 22]. However, the experimental data obtained by various research teams are segmentary and require a systematization and complementation.

The research aim was to compare study the effect of cryoprotectants belonging to different classes of chemicals on morphofunctional preservation of Prussian carp embryos.

### Materials and methods

The experiments were performed in Prussian carp embryos (*Carassius auratus gibelio* Bloch, 1783) at the developmental stage corresponding to the formation



Цель работы – сравнительное изучение влияния криопротекторов, принадлежащих к различным классам химических веществ, на морфофункциональную сохранность эмбрионов карася.

### Материалы и методы

Эксперименты проводили на эмбрионах карася (*Carassius auratus gibelio* Bloch, 1783) на стадии развития, соответствующей образованию 6 сомитов. Рыб отлавливали в течение весенне-летнего периода из мест естественного обитания их популяций. Предпочтение отдавали производителям возрастом от 3 до 4-х лет. Процедуру гонадотропной инъекции самкам и самцам, а также получение половых продуктов и осеменение осуществляли в соответствии с рыбоводными рекомендациями [2]. Эмбрионы инкубировали при комнатной температуре (18...21°C) в чашках Петри по 100–150 штук в каждой.

В экспериментах использовали 10%-е растворы криопротекторов диметилсульфоксида (ДМСО), 1,2-пропандиола (1,2-ПД), 1,3-пропандиола (1,3-ПД), 1,3-бутандиола (1,3-БД), 1,4-бутандиола (1,4-БД), 1,2-метаоксиэтана (1,2-МОЭ), глицерина, этиленгликоля (ЭГ), метанола, полиэтиленоксида с м. м. 1500 (ПЭО-1500) и сахарозы.

Эмбрионы карася на стадии развития, соответствующей 6 сомитам, инкубировали в растворах криопротекторов в течение 60 мин. Для удаления криопротекторов эмбрионы трижды пересаживали в воду с параметрами оптимальными для инкубации [24]. Состояние эмбрионов и уровень тератогенности на всех стадиях оценивали визуально в соответствии с картами эмбрионального развития [24], используя микроскоп МБС-9. Эмбрионы в исследуемых группах и контроле наблюдали до стадии развития свободно плавающей личинки.

Полученные результаты анализировали с помощью пакета прикладных компьютерных программ «Statistica» («Statsoft», США). Статистически значимыми считали различия между сравниваемыми группами при  $p < 0,05$  ( $n = 9$ ).

### Результаты и обсуждение

На рис. 1 представлены показатели выживаемости эмбрионов карася после инкубации в исследованных растворах криопротекторов.

Согласно нашим данным наибольший уровень выживаемости эмбрионов карася отмечен в растворах криопротекторов группы диолов 1,2-ПД (64%), 1,3-ПД (54%), ЭГ (67%), сахарозы (61%) и ПЭО-1500 (50,5%).

Растворы 1,2-МОЭ, метанола, глицерина и ДМСО в концентрации 10% снижают уровень выживаемости эмбрионов карася при инкубировании

of 6 somites. Fish were caught during spring-summer period from their natural habitats. The preference was given to mature males aged 3–4 years. The procedure of gonadotropic injection to females and males, as well as derivation of reproductive products and insemination were performed in accordance with fish breeding recommendations [9]. The embryos were incubated at room temperature (18...21°C) in Petri dishes by 100–150 in each.

The experiments involved 10% cryoprotective solutions of dimethyl sulfoxide (DMSO), 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), 1,2-methoxyethane (1,2-MOE), glycerol, ethylene glycol (EG), methanol, polyethylene oxide (PEO-1500) and sucrose.

Prussian carp embryos at developmental stage corresponding to 6 somites were incubated with cryoprotectants solutions for 60 min. To remove cryoprotectants the embryos were thrice transferred to water with parameters optimal for incubation [24]. State of embryos and teratogenic rate at all the stages were visually estimated in accordance to the maps of embryonic development [24] using microscope MBS-9. The embryos in the studied groups and control were monitored to the development stage of free-swimming larva.

The obtained results were analyzed using the Statistica software (Statsoft, USA). The differences between the groups were considered as statistically significant at  $p < 0.05$ .

### Results and discussion

Fig. 1 demonstrates the indices of survival of Prussian carp embryos after incubation in the studied cryoprotective solutions.

According to our data the highest rate of survived Prussian carp embryos was noted in cryoprotective solutions of diol groups 1,2-PD (64%), 1,3-PD (54%), EG (67%) and sucrose (61%) and PEO-1500 (50.5%).

Solutions of 1,2-MOE, methanol, glycerol and DMSO in concentration of 10% reduced the survival rate of Prussian carp embryos following the incubation for 60 min down to  $(10.5 \pm 4.8)$ ;  $(13.6 \pm 2.7)$ ;  $(28.8 \pm 4.6)$  and  $(26.25 \pm 4.2)$ % correspondingly if compared with the the control (Fig.1).

Previously it has been shown that dwarf gourami (*Colisa lalia*), goldfish (*Carasius auratus*, var.dom.) and zebra fish (*Brachydanio rerio*) demonstrate the ability to further development after incubation in cryoprotective solutions of methanol, glycerol, DMSO and EG from 30 to 60 min at 0°C up to room temperature (21°C) [15, 19, 26]. However, only in EG solution quite a high survival rate of dwarf gourami and Prussian carp embryos was found [16].

K.C. Liu *et al.* [15] incubated the Prussian carp embryos at the developmental stages corresponding



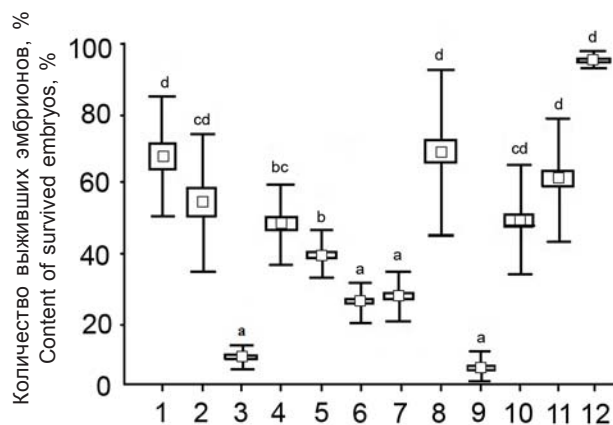
в течение 60 мин до  $(10,5 \pm 4,8)$ ;  $(13,6 \pm 2,7)$ ;  $(28,8 \pm 4,6)$  и  $(26,25 \pm 4,2)\%$  соответственно, по сравнению с контролем (рис. 1).

Ранее было показано, что эмбрионы лягушки (*Colisa lalia*), золотой рыбки (*Carasius auratus*, var. dom.) и данио рерио (*Brachydanio rerio*) демонстрируют способность к дальнейшему развитию после инкубирования в растворах криопротекторов метанола, глицерина, ДМСО и ЭГ от 30 до 60 мин при температуре от 0°C до комнатной (21°C) [5, 21, 26]. Однако только в растворе ЭГ сохраняется достаточно высокий уровень выживаемости эмбрионов лягушки [5] и карася [7].

К.С. Liu и соавт. [21] инкубировали в течение 20 мин эмбрионы карася на стадиях развития, соответствующих образованию сомитов, в растворах ДМСО и глицерина с постепенным повышением концентрации до 10%. Было установлено, что уровень выживаемости эмбрионов составил 50% в растворе ДМСО и 30% – в растворе глицерина. Эти показатели выше, чем в наших экспериментах, что, по-видимому, связано с непродолжительным временем инкубации в растворах криопротекторов. При повышении концентрации криопротекторов от 12 до 15% и увеличении времени инкубации до 50 мин уровень выживаемости резко снижался в ДМСО до 25% и в глицерине – до 21%.

Успех криоконсервирования биологического объекта, особенно при использовании метода витрификации, во многом зависит от эффективного насыщения клеток криопротекторами. М. Hagedorn и соавт. [19] исследовали способность ДМСО, 1,2-ПД и метанола насыщать эмбрионы данио рерио (карповые). Методом магнитного резонанса было показано, что только метанол проникает внутрь эмбриона в течение 15 мин, а остальные криопротекторы – в течение более длительного времени. Эти результаты подтверждают наши данные о влиянии метанола не только на уровень выживаемости, но и на увеличение тератогенно развивающихся эмбрионов карася после более продолжительного инкубирования в этом растворе.

М.М. Ahammad и соавт. [9] сообщили, что после 45-минутной инкубации эмбрионов толстолобика (*Hypophthalmichthys molitrix*), который также относится к карповым, в растворах 0,25 М сахарозы и 0,1 М 1,2-ПД уровень выживаемости эмбрионов составил 35 и 39% соответственно, который авторы оценили как высокий. Мы предполагаем, что в нашей работе более высокий уровень выживаемости эмбрионов карася на той же стадии развития, но при большем времени инкубирования в растворах криопротекторов, связан с меньшими размерами эмбрионов, поскольку у толстолобика оплодотворенная икра более оводнена и подвер-



**Рис. 1.** Выживаемость эмбрионов карася на стадии развития 6 сомитов после 60-минутной инкубации в 10%-х растворах криопротекторов: 1 – 1,2-ПД; 2 – 1,3-ПД; 3 – 1,2-МОЭ; 4 – 1,3-БД; 5 – 1,4-БД; 6 – ДМСО; 7 – глицерин; 8 – ЭГ; 9 – метанол; 10 – ПЭО-1500; 11 – сахароза; 12 – контроль;  $\bar{x}$  – стандартное отклонение;  $\square$  – среднее;  $\square$  – стандартная ошибка; различия между группами, обозначенными неодинаковыми символами (a, b, c, d), статистически значимы,  $p < 0,05$ .

**Fig.1.** Survival of Prussian carp embryos at developmental stage of 6 somites after 60-min incubation in 10% cryoprotective solutions; 1 – 1,2-PD; 2 – 1,3-PD; 3 – 1,2-MOE; 4 – 1,3-BD; 5 – 1,4-BD; 6 – DMSO; 7 – glycerol; 8 – EG; 9 – methanol; 10 – PEO-1500; 11 – sucrose; 12 – control;  $\bar{x}$  – SD;  $\square$  – mean;  $\square$  – SE; differences between data indicated with different indices (a, b, c, d) are statistically significant,  $p < 0.05$ .

to the formation of somites for 20 min in the solutions of DMSO and glycerol with a gradual rise in the concentration up to 10%. It has been established that survival rate of embryos made 50% in the solution of DMSO and 30% for glycerol solution. These indices were higher than in our experiments that was likely related to a shorter incubation in cryoprotective solutions. Increasing concentration of cryoprotectants from 12 to 15% and prolongation of incubation up to 50 min resulted in a sharp decrease in the survival for DMSO down to 25% and down to 21% for glycerol.

Successful cryopreservation of biological specimen especially when using the vitrification method mainly depends on effective saturation of cells with cryoprotectants. M. Hagedorn *et al.* [13] studied the ability of DMSO, 1,2-PD and methanol to saturate the zebra fish (*Cyprinidae*) embryos. Method of magnetic resonance allowed to show that only methanol penetrated to the embryo during 15 min and the other cryoprotectants needed much longer time period. The results explain our findings on the effect of methanol in terms of the survival rate as well as an increase of teratogenically developing embryos of Prussian carp as concerned with long incubation time in the methanol solution.

M.M. Ahammad *et al.* [2] reported that after 45-min incubation of silver carp (*Hypophthalmichthys mo-*



жена действию осмотического фактора в процессе экспозиции [16, 20].

Вепринцев Б.Н. и соавт. [1] исследовали выживаемость эмбрионов вьюна (*Misgurnus fossilis*) (карповые) после 60-минутной экспозиции в растворе ДМСО с концентрацией 10% на стадии развития, соответствующей началу органогенеза (образование 3–13 сомитов). Высокий уровень сохранности эмбрионов вьюна (98%) авторы объясняют низкой проницаемостью клеточных оболочек для веществ с большой молекулярной массой и для других пресноводных рыб. Некоторые исследователи также указывают на низкую или умеренную токсичность раствора ДМСО по отношению к эмбрионам рыб, что позволяет его использовать в криозащитных средах [12, 13, 23]. Однако эксперименты проводили на эмбрионах морских видов (*Sciaenops ocellatus*, *Pagrus major* и *Scophthalmus maximus*), которые, как известно, более устойчивы к воздействию криопротекторов [11].

Показано, что увеличение концентрации криопротекторов существенно влияет на уровень выживаемости эмбрионов [14, 15]. Поэтому мы считали целесообразным проследить за развитием эмбрионов карася до стадии свободно плавающей личинки, поскольку цитотоксическое действие может в дальнейшем сказываться на развитии эмбрионов. Данные по влиянию исследуемых растворов криопротекторов на аномальное развитие эмбрионов карася представлены на рис. 2.

Видно, что максимальный уровень тератогенности эмбрионов наблюдали после инкубации в растворах криопротекторов 1,2-МОЭ, ДМСО, глицерина и метанола. У личинок, которые перешли на внешнее питание, наблюдаются оводненность околожелточного синцития, нарушения в сегментации мышечного корпуса и асимметричность краниального отдела. В растворах диолов, ДМСО и глицерина статистически значимых отличий исследуемых показателей не наблюдали.

Ранее было показано, что тератогенность развития эмбрионов напрямую зависит от способности криопротектора проникать через плазматические мембраны и характеризуется более отдаленными последствиями, что является специфичным для каждого вида рыб [4, 5].

Е. Cabrita и соавт. [12] исследовали влияние криопротектора ДМСО на эмбрионы тюрбо (*Scophthalmus maximus* L., 1758). После инкубации в растворе криопротектора эмбрионы отмывали путем понижения его концентрации. При этом было установлено, что для полного выведения криопротектора из всех структурных элементов эмбриона необходимо участие дополнительных ингредиентов (например, проназы), способст-

*litrix*), being also the member of *Cyprinidae* family, in the solutions of 0.25 M sucrose and 0.1 M 1,2-PD the survival rate of embryos made 35 and 39% correspondingly, and the authors estimated these as high ones. We believe, that achieved in our work higher survival rate of Prussian carp embryos being at the same developmental stage but with longer incubation in cryoprotective solutions is associated with smaller embryos, because the fertilized eggs in silver carp are more wet and subjected to the effect of osmotic factor during exposure [10, 14].

Veprintsev B.N. *et al.* [23] investigated the survival of loach (*Misgurnus fossilis*) embryos after 60-min exposure in 10% DMSO solution at the developmental stage corresponding to the start of organogenesis (formation of 3–13 somites). A high preservation rate of loach embryos (98%) was explained by the authors by a low permeability of cell membranes for the substances of a high molecular weight as observed in most other fresh water fishes. Some investigators also point to a low or moderate toxicity of DMSO solution in respect to fish embryos, enabling to use it in cryoprotective media [5, 6, 22]. However, these experiments were performed in the embryos of marine species (*Sciaenops ocellatus*, *Pargus major* and *Scophthalmus maximus*), known to be more resistant to the effect of cryoprotectants [4].

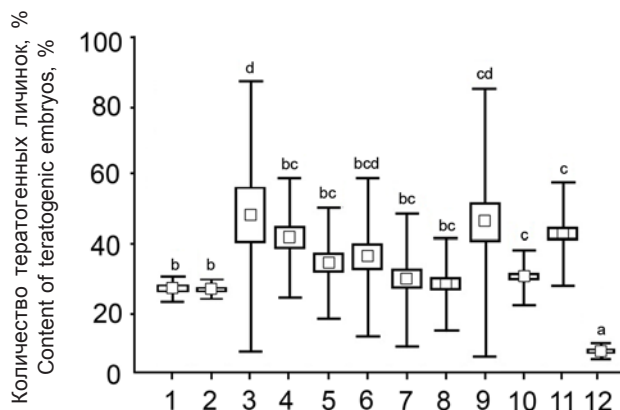
It has been demonstrated that the rise in concentration of cryoprotectants affect significantly the survival of embryos [7, 8]. Therefore we considered as expedient to trace the development of Prussian carp embryos up to the stage of free-swimming larva, since a cytotoxic effect may affect the development of embryos later. Data on the effect of the studied cryoprotectants on abnormal development of Prussian carp embryos are presented in Fig. 2.

It is seen that maximal level of teratogenic embryos was observed after incubation in the solutions of cryoprotectants 1,2-MOE, DMSO, glycerol and methanol. In the externally fed larvae we have found signs of wet perivitelline syncytium, disorders in segmentation of muscular body and asymmetry of cranial compartment. No statistically significant differences of the studied indices were observed in the solutions of diols, DMSO and glycerol.

Previously it has been shown that teratogenic embryos development depends directly on the ability of cryoprotectant to penetrate via plasma membranes and is characterized with more distant consequences, that is specific for each fish species [17, 19].

Е. Cabrita *et al.* [5] have studied the effect of DMSO cryoprotective agent on turbot (*Scophthalmus maximus* L., 1758) embryos. After incubation in cryoprotective solution the embryos were washed by means of its concentration reducing. Herewith it has been





**Рис. 2.** Количество anomalно развивающихся личинок карася на стадии развития, соответствующей образованию 6 сомитов, после 60-минутной инкубации в 10%-х растворах криопротекторов (от общего количества выживших); 1 – 1,2-ПД; 2 – 1,3-ПД; 3 – 1,2-МОЭ; 4 – 1,3-БД; 5 – 1,4-БД; 6 – ДМСО; 7 – глицерин; 8 – ЭГ; 9 – метанол; 10 – ПЭО-1500; 11 – сахароза; 12 – контроль;  $\bar{x}$  – стандартное отклонение;  $\square$  – среднее;  $\square$  – стандартная ошибка; различия между группами, обозначенными неодинаковыми символами (a, b, c, d), статистически значимы,  $p < 0,05$ .

**Fig. 2.** Number of anomalously developing larvae of Prussian carp at the developmental stage corresponding to the formation of 6 somites after 60-min incubation in 10% cryoprotective solutions (of total number of survived); 1 – 1,2-PD; 2 – 1,3-PD; 3 – 1,2-MOE; 4 – 1,3-BD; 5 – 1,4-BD; 6 – DMSO; 7 – glycerol; 8 – EG; 9 – methanol; 10 – PEO-1500; 11 – sucrose; 12 – control;  $\bar{x}$  – SD;  $\square$  – mean;  $\square$  – SE; differences between data indicated with different indices (a, b, c, d) are statistically significant,  $p < 0.05$ .

вующих отмыванию. Только в этом случае эмбрионы, в том числе и тератогенно развивающиеся, сохраняли высокий уровень выживаемости.

В результате наших экспериментов установлено, что 10%-е растворы криопротекторов 1,2-ПД, 1,3-ПД, 1,3-БД, 1,4-БД, глицерина, ЭГ, ПЭО-1500 и сахарозы после 60-минутной инкубации обеспечивают близкую к контролю жизнеспособность нормально развивающихся эмбрионов. Влияние данных растворов на уровень тератогенно развивающихся эмбрионов имеет статистически значимые различия по отношению к контролю. Следовательно, для выведения растворов криопротекторов из эмбрионов необходима разработка дополнительных методов.

Считается, что при составлении кризащитных сред на основе ДМСО и метанола необходимо снижать их концентрацию и сокращать общее время инкубации, что требует дальнейших исследований [18].

Полученные данные свидетельствуют о возможности использования 1,2-ПД, 1,3-ПД, 1,3-БД, 1,4-БД, глицерина, ЭГ, ПЭО-1500 и сахарозы как базовых при создании и исследовании комплексных кризащитных сред в различных комбинациях.

## Выводы

1. Растворы криопротекторов 1,2-ПД, 1,3-ПД, 1,3-БД, 1,4-БД, ЭГ, ПЭО-1500 и сахарозы в концентрации 10% обеспечивают достаточно высокий уровень выживаемости эмбрионов карася в течение 60 мин по сравнению с контролем и могут быть рекомендованы для использования в составе многокомпонентных кризащитных сред.

2. Растворы криопротекторов 1,2-МОЭ, ДМСО, глицерина и метанола в концентрации 10% повышают уровень тератогенности эмбрионов карася.

established that for a complete removal of cryoprotectants from all structural elements of an embryo the participation of additional ingredients contributing to washing (*e. g.* pronase) is necessary. Just in this case, the embryos including those being teratogenically developed kept a high survival rate.

In the result of our experiments it has been established that 10% cryoprotective solutions 1,2-PD, 1,3-PD, 1,3-BD, 1,4-BD, glycerol, EG, PEO-1500 and sucrose provided following 60-min incubation a viability of normally developing embryos close to the control. The effect of these solutions in terms of teratogenicity of developing embryos had statistically significant differences *vs.* the control. So, there is a need of developing new methods to remove the cryoprotectants out of embryos.

There is an opinion that creation of the cryoprotective media based on either DMSO or methanol needs the reduction of their concentration and decreasing a total incubation time, and in its turn this requires further studies [12].

The findings testify to a possible use of 1,2-PD, 1,3-PD, 1,3-BD, 1,4-BD, glycerol, EG, PEO-1500 as basic substances for creating and investigating the complex cryoprotective media in different combinations.

## Conclusions

1. Solutions of cryoprotectants 1,2-PD, 1,3-PD, 1,3-BD, 1,4-BD, EG, PEO-1500 and sucrose in 10% concentration provide quite a high survival rate of Prussian carp embryos following 60 min incubation if compared with the control and could be recommended to be used as the components of multicomponent cryoprotective media.

2. Cryoprotective solutions of 1,2-MOE, DMSO, glycerol and methanol in 10% concentration increase the teratogenicity in Prussian carp.



## Литература

1. Вепринцев Б.Н., Новиков А.Н., Утешев В.К., Смолихина Т.И. Действие ДМСО в субнулевых температурах на зародышей вьюна // Криобиология. – 1989. – №2. – С. 16–21.
2. Герасимов Ю.Л. Основы рыбного хозяйства // Самара, 2003. – 108 с.
3. Миксон К.Б., Зинченко А.В., Боброва Е.Н. Фазовые переходы и стеклование в криозащитных средах и эмбрионах *Misgurnus fossilis* L., 1758 // Проблемы криобиологии. – 2008. – Т. 18, №2. – С. 225.
4. Миксон К.Б., Копейка Е.Ф., Ишков Г.С. Влияние компонентов криозащитной среды на эмбрионы вьюна (*Misgurnus fossilis* L., 1758) // Ветеринарна медицина: Міжвідомчий тем. зб. – 2008. – Вип. 89. – С. 271–274.
5. Миксон К.Б., Копейка Е.Ф., Линник Т.П. Выживаемость эмбрионов лягушки (*Colisa lalia* Hamilton-Buchanan, 1822) после инкубации в криозащитных средах // Проблемы криобиологии. – 2008. – Т. 18, №3. – С. 343–345.
6. Миксон К.Б., Копейка Е.Ф., Линник Т.П. Условия витрификации эмбрионов вьюна (*Misgurnus fossilis* L., 1758) в криозащитных средах // Проблемы криобиологии. – 2009. – Т. 19, №2. – С. 154–162.
7. Миксон К.Б. Черепанов В.В. Влияние растворов криопротекторов на выживаемость эмбрионов карася // Проблемы криобиологии. – 2012. – Т. 22, №3. – С. 373.
8. Adam M.M., Rana K.J., McAndrew B.J. Effect of cryoprotectants on activity of selected enzymes in fish embryos // Cryobiology. – 1995. – Vol. 32, №1. – P. 92–104.
9. Ahammad M.M., Bhattacharyya D., Banerjee R.D., Bandyopadhyay P.K. Toxicity of protectants to embryos of silver carp after cold storage at different storage time periods // Cell Preservation Technology. – 2004. – Vol. 2, №3. – P. 227–233.
10. Bart A.N. The use of ultrasound to enhance transport of compounds into fish and fish embryos: a review // Asian Fisheries Science. – 2001. – Vol. 14, №4. – P. 389–397.
11. Bart A.N. New approaches in cryopreservation of fish embryos // The World Aquaculture Society: Cryopreservation in Aquatic Species. – Louisiana, Baton Rouge, 2000. – P. 179–187.
12. Cabrita E., Chereguini O., Luna M.J. et al. Effect of different treatments on the chorion permeability to DMSO of turbot embryos (*Scophthalmus maximus*) // Aquaculture. – 2003. – Vol. 221, №1–4. – P. 593–604.
13. Ding F.H., Xiao Z.Z., Li J. Preliminary studies on the vitrification of red sea bream (*Pagrus major*) embryos // Theriogenology. – 2007. – Vol. 68, №5. – P. 702–708.
14. 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, №3. – P. 247–268.
15. Fahy G.M., Wowk B., Wu J., Paynter S. Improved vitrification solutions based on the predictability of vitrification solution toxicity // Cryobiology. – 2004. – Vol. 48, №1. – P. 22–35.
16. Hagedorn M., Kleinhans F.W. Problems and prospects in cryopreservation of fish embryos // The World Aquaculture Society: Cryopreservation in Aquatic Species. – Louisiana, Baton Rouge, 2000. – P. 161–178.
17. Hagedorn M., Kleinhans F.W., Artemov D., Pilatus U. Characterization of a major permeability barrier in the zebrafish embryo // Biol. Reprod. – 1998. – Vol. 59, №5. – P. 1240–1250.
18. Hagedorn M., Hsu E.W., Kleinhans F.W., Wildt D.E. New approaches for studying permeability of fish embryos: Toward successful cryopreservation // Cryobiology. – 1997. – Vol. 34, №4. – P. 335–347.
19. 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, №15. – P. 7454–7459.
20. Leibo S.P. Cryopreservation of oocytes and embryos: Optimization by theoretical versus empirical analysis // Theriogenology. – 2008. – Vol. 69, №1. – P. 37–47.

## References

1. Adam M.M., Rana K.J., McAndrew B.J. Effect of cryoprotectants on activity of selected enzymes in fish embryos. Cryobiology 1995; 32(1): 92–104.
2. Ahammad M.M., Bhattacharyya D., Banerjee R.D., Bandyopadhyay P.K. Toxicity of protectants to embryos of silver carp after cold storage at different storage time periods. Cell Preservation Technology 2004; 2(3): 227–233.
3. Bart A.N. The use of ultrasound to enhance transport of compounds into fish and fish embryos: a review. Asian Fisheries Science 2001; 14(4): 389–397.
4. Bart A.N. New approaches in cryopreservation of fish embryos. In: The World Aquaculture Society: Cryopreservation in Aquatic Species. Louisiana, Baton Rouge 2000; p. 179–187.
5. Cabrita E., Chereguini O., Luna M.J. et al. Effect of different treatments on the chorion permeability to DMSO of turbot embryos (*Scophthalmus maximus*). Aquaculture 2003; 221(1–4): 593–604.
6. Ding F.H., Xiao Z.Z., Li J. Preliminary studies on the vitrification of red sea bream (*Pagrus major*) embryos. Theriogenology 2007; 68(5): 702–708.
7. Fahy G.M., Lilley T.H., Linsdell H. et al. Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: In search of molecular mechanisms. Cryobiology 1990; 27(3): 247–268.
8. Fahy G.M., Wowk B., Wu J., Paynter S. Improved vitrification solutions based on the predictability of vitrification solution toxicity. Cryobiology 2004; 48(1): 22–35.
9. Gerasimov J.L. Fundamentals of Fisheries. Samara: Samara University; 2003.
10. Hagedorn M., Kleinhans F.W. Problems and prospects in cryopreservation of fish embryos. In: The World Aquaculture Society: Cryopreservation in Aquatic Species. Louisiana, Baton Rouge 2000; p. 161–178.
11. Hagedorn M., Kleinhans F.W., Artemov D., Pilatus U. Characterization of a major permeability barrier in the zebrafish embryo. Biol Reprod 1998; 59(5): 1240–1250.
12. Hagedorn M., Hsu E.W., Kleinhans F.W., Wildt D.E. New approaches for studying permeability of fish embryos: Toward successful cryopreservation. Cryobiology 1997; 34(4): 335–347.
13. Hagedorn M., Hsu E.W., Pilatus U. et al. Magnetic resonance microscopy and spectroscopy reveal kinetics of cryoprotectant permeation in a multicompartiment biological system. Proceedings Nat Acad Sci. USA; 1996; 93(15): 7454–7459.
14. Leibo S.P. Cryopreservation of oocytes and embryos: Optimization by theoretical versus empirical analysis. Theriogenology 2008; 69(1): 37–47.
15. Liu K.C., Chou T.C., Lin H.D. Cryosurvival of goldfish embryo after subzero freezing. Aquatic Living Resources 1993; 6(1): 63–66.
16. Mikson K.B., Cherepanov V.V. Effect of cryoprotectant solutions on survival of crucian carp embryos. Problems of Cryobiology 2012; 22(3): 373.
17. Mikson K.B., Kopeika E.F., Ishkov G.S. Influence of cryoprotective medium components on the loach embryos (*Misgurnus fossilis* L., 1758). Interdepartmental thematic collection: Veterinary Medicine 2008; (89): 271–274.
18. Mikson K.B., Kopeika E.F., Linnik T.P. Conditions for loach (*Misgurnus fossilis*) embryos vitrification in cryoprotective media. Problems of Cryobiology 2009; 19(2): 154–162.
19. Mikson K.B., Kopeika E.F., Linnik T.P. Survival of Dwarf gouramy embryos (*Colisa lalia*) after incubation in cryoprotective media. Problems of Cryobiology 2008; 18(3): 343–345.
20. Mikson K.B., Zinchenko A.V., Bobrova E.N. Phase transitions and vitrification in cryoprotective media and embryos *Misgurnus fossilis* L., 1758. Problems of Cryobiology 2008; 18(2): 225.
21. Petrunkina A.M. Fundamental aspects of gamete cryobiology. J Reproduktionsmed Endokrinol 2007; 4(2): 78–91.
22. Robertson S.M., Lawrence A.L., Nell W.H. et al. Toxicity of the cryoprotectants glycerol, dimethyl sulfoxide, ethylene glycol,



21. Liu K.C., Chou T.C., Lin H.D. Cryosurvival of goldfish embryo after subzero freezing // *Aquatic Living Resources*. – 1993. – Vol. 6, №1. – P. 63–66.
22. Petrunkina A.M. Fundamental aspects of gamete cryobiology // *J. Reproduktionsmed. Endokrinol.* – 2007. – Vol. 4, №2. – P. 78–91.
23. Robertson S.M., Lawrence A.L., Nell W.H. et al. Toxicity of the cryoprotectants glycerol, dimethyl sulfoxide, ethylene glycol, methanol, sucrose, and sea salt solutions to the embryos of red drum // *Progressive Fish-Cult.* – 1988. – Vol. 50, №3. – P. 148–154.
24. Yamamoto K., Yamazaki F. Rhythm of development in the oocyte of the gold-fish, *Carassius auratus* // *Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ.* – 1961. – Vol. 12, №2. – P. 93–110.
25. Zhang T.T. Cryopreservation of gametes and embryos of aquatic species // *Life in the Frozen State* / Ed. by B.J. Fuller, N. Lane, E.E. Benson. – Boca Raton, Florida, USA: CRC Press LLC, 2004. – P. 415–436.
26. Zhang T.T., Rawson D.M. Permeability of dechorionated one-cell and six-somite stage zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos to water and methanol // *Cryobiology*. – 1998. – Vol. 37, №1. – P. 13–21.
27. Zhang T.T., Rawson D.M. Permeability of the vitelline membrane of zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos to methanol and propan-1,2-diol // *CryoLetters*. – 1996. – Vol. 17, №6. – P. 273–280.
- methanol, sucrose, and sea salt solutions to the embryos of red drum. *Progressive Fish-Cult* 1988; 50(3): 148–154.
23. Veprintsev B.N., Novikov A.N., Uteshev V.K., Smolikhina T.I. DMSO effect at subzero temperatures on loach embryos. *Kriobiologiya* 1989; (2): 16–21.
24. Yamamoto K., Yamazaki F. Rhythm of development in the oocyte of the gold-fish, *Carassius auratus*. *Bull Fac Fish Hokkaido Univ* 1961; 12(2): 93–110.
25. Zhang T.T. Cryopreservation of gametes and embryos of aquatic species. In: Fuller B.J., Lane N., Benson E.E., editors. *Life in the Frozen State*. Florida: CRC Press LLC; 2004. p. 415–436.
26. Zhang T.T., Rawson D.M. Permeability of dechorionated one-cell and six-somite stage zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos to water and methanol. *Cryobiology* 1998; 37(1): 13–21.
27. Zhang T.T., Rawson D.M. Permeability of the vitelline membrane of zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos to methanol and propan-1,2-diol. *CryoLetters* 1996; 17(6): 273–280.

