

АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ  
ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРИОБИОЛОГИИ И КРИОМЕДИЦИНЫ

На правах рукописи

БИБЕНКО ОЛЬГА ВИКТОРОВНА

ВЛИЯНИЕ ФАКТОРОВ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ НА ГЕНЕТИЧЕСКИЙ  
АППАРАТ СПЕРМИЕВ РЫБ

(03.00.22 - криобиология)

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т  
диссертации на соискание ученой  
степени кандидата биологических наук

Харьков - 1993

76 27.30

Работа выполнена в Институте проблем криобиологии и криомедицины АН Украины.

Научные руководители—академик АН Украины, доктор медицинских наук, профессор, лауреат Государственных премий СССР и Украины В.И. Грищенко  
академик Академии Естественных Наук России, доктор биологических наук, профессор А.А. Нейфах

Официальные оппоненты — доктор биологических наук, лауреат Государственной премии СССР М.И. Шраго,

доктор биологических наук, профессор В.Г. Шахбазов

Ведущая организация — Институт гидробиологии АН Украины

Защита состоится "18" Мая 1993 года в "13<sup>30</sup>" часов на заседании специализированного совета Д 016.60.01 при Институте проблем криобиологии и криомедицины АН Украины (г. Харьков, ул. Переяславская, 23).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке института.

Автореферат разослан "16 апреля" 1993 года.

Ученый секретарь специализированного совета,  
доктор медицинских наук

А.Н. Гольцев

ЛНБ ім. В. Стефаніка  
АН України

ЛНБ України ім. В. Стефаніка



00814244 (N)

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ.** Загрязнение водной среды, бесконтрольный вылов рыб, строительство плотин и разрушение нерестилищ сильно уменьшают количество рыб в различных популяциях, приводят к инбридингу, вырождению и даже к гибели многих видов. В Красную книгу МСОП (1978) внесено 168 видов (около 1 % мировой фауны) и 25 подвидов рыб, находящихся под угрозой исчезновения. В Красной книге СССР (1984) было 9 видов (3,5 % общего числа пресноводных форм), а в 1990 г. этот список вырос уже до 35 видов рыб.

Не лучше обстоят дела и в странах Европы, где значительная часть рыб (52,3 %) находятся под угрозой исчезновения, а 53,5 % популяций всех промысловых рыб полностью истощены и запрещены к вылову (А.В. Яблоков, С.А. Остроумов, 1985).

В связи с этим во многих странах мира ведутся исследования по криоконсервации спермы рыб, и в некоторых странах (ФРГ, США, Канада) уже созданы низкотемпературные банки. Главная цель таких работ – сохранение генома криоконсервированных спермиев с последующим их использованием для воспроизведения видов, подвидов и пород и восстановления исчезающих генотипов рыб. Но вопрос о состоянии генетического аппарата спермиев, закладываемых на долгосрочное хранение, степени его сохранности, несмотря на его первостепенное значение для данных работ, до сих пор не изучен. Имеется большое количество исследований, посвященных разработке способов криоконсервации спермы рыб и выяснению механизмов криповреждений, но практически отсутствуют исследования по изучению состояния генетического аппарата спермиев рыб на разных этапах криоконсервации. В литературе имеются лишь единичные сообщения о массовой гибели эмбрионов, полученных с использованием криоконсервированной спермы (В.Н. Жукинский и др., 1981; М. Koldras, K. Bieniark, 1987); а также о суммарном влиянии факторов криоконсервации на геном рыб (А.А. Нейфах и др. 1981). После этих работ однако оставалось неясным, на каком из этапов криоконсервации происходят повреждения генетического аппарата. Гибель эмбрионов на критических стадиях развития может свидетельствовать о повреждении доминантных генов. Но, вероятно, что при криоконсервации также могут возникать повреждения рецессивных генов, которые будут проявляться в следующих поколениях.

Можно заключить, что выяснение возможности повреждений генетического аппарата спермиев рыб на различных этапах криоконсервации является первостепенной задачей исследователей, работающих в области сохранения генофонда рыб с использованием методов криокон-

сервации.

**ЦЕЛЬ РАБОТЫ.** Целью работы было изучить возможны ли повреждения генетического аппарата спермиев рыб при воздействии на них криопротекторов и глубокого охлаждения.

**ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ:**

-изучить смертность диплоидных и андрогенетических гаплоидных эмбрионов, полученных с использованием нативной спермы:

а) выдержанной разное время (5, 15, 30 и 60 мин) в средах с различной концентрацией (0; 2,5; 5,0; 10,0 % ) разных криопротекторов: этиленгликоля (ЭГ), диметилсульфоксида (ДМСО), глицерина (Гл) и метилового эфира этиленгликоля (Мц) и при нескольких температурах (0 °С, 5 °С, 15 °С и 21 °С);

б) и спермы после замораживания-оттаивания:

-определить стадии эмбриогенеза, на которых происходит максимальная гибель эмбрионов ("критические стадии");

-изучить митотическую активность и наличие хромосомных аберраций в клетках эмбрионов рыб, полученных при оплодотворении яйцеклеток спермиями после разных этапов криоконсервации.

**НАУЧНАЯ НОВИЗНА ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ.**

Впервые установлено, что:

-максимальная гибель эмбрионов осетровых (севрюга) и костистых (каarp, вьюн) рыб, полученных с использованием спермиев при разных условиях криоконсервационной предобработки, происходит в период начального фенотипического проявления функции генома на ранних стадиях эмбриогенеза между поздней бластулой и гастролой, а на последующих стадиях развития эмбрионов различия в доле живых зародышей между опытом и контролем сохраняются на постоянном уровне;

-эквilibрация спермиев карпов и вьюнов в средах с 10 % криопротекторов ЭГ, ДМСО, Гл и Мц приводит к увеличению смертности эмбрионов, полученных с использованием этой спермы;

-процессы замораживания и оттаивания спермиев увеличивают смертность эмбрионов рыб, полученных с использованием этой спермы. Причем, этот показатель существенно зависит от используемого криопротектора и его концентрации:

-различия в выживаемости диплоидных и андрогенетических гаплоидных зародышей увеличиваются, если они получены с помощью криоконсервированной спермы, или эквilibрированной в средах с 10 % криопротекторов. Это позволяет заключить, что факторы криоконсервации вызывают повреждения как доминантных, так и рецессивных генов;

-смертность эмбрионов, зависит от генотипических и физиологических характеристик самки, от которой получены яйцеклетки;

-эквilibрация спермиев с криопротекторами влияет на количество аберраций и митотический индекс клеток эмбрионов карпов и вьюнов.

#### ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ РАБОТЫ.

Теоретическое значение работы заключается в установлении возможности мутагенного и селективного влияния факторов криоконсервации на генетический аппарат спермиев рыб. Установленные факты расширяют представления о механизмах криоповреждений и криозащиты клеток, о роли ядерно-цитоплазматических взаимоотношений в обеспечении жизнеспособности клеток и о механизмах реализации функции генов в раннем развитии.

Полученные результаты позволяют при оценке качества материала, закладываемого на долгосрочное хранение, и при оптимизации способов криоконсервации, рекомендовать обязательную оценку состояния генетического аппарата гамет рыб по гибели эмбрионов. Они также позволяют внести коррективы при определении количества образцов, закладываемых на хранение, и, таким образом, предупредить потерю ценного коллекционного материала из-за вероятности инбридинга и вырождения.

Установление факта влияния факторов криоконсервации на генетический аппарат спермиев рыб позволяет селекционерам проводить работы по направленной селекции.

#### ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ, ВНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ.

Использование для осеменения спермы карпов и вьюнов, эквilibрированной или криоконсервированной с высокими концентрациями (10 %) криопротекторов ЭГ, ДМСО, Гл и Мц, вызывает:

а) повышение гибели диплоидных и андрогенетических гаплоидных эмбрионов начиная со стадии поздней бластулы (начало фенотипического проявления работы генома) до стадии гаструлы, зависящее от вида криопротектора, а также от генотипических и физиологических характеристик самки, от которой получены яйцеклетки;

б) появление хромосомных аберраций,

что очевидно является следствием повреждения генетического аппарата в спермиях рыб.

#### АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ.

Материалы диссертационной работы докладывались и обсуждались на Международной конференции под эгидой ЮНЕСКО "Достижения и перс-

пектив развития криобиологии и криомедицины" (Харьков, 1988), школе по криобиологии (Харьков, 1990), заседании Координационного совета по программе ГКНТ СССР "Криобанк рыб" (Пушино, 1990) и на Международном рабочем совещании по криоконсервации и хранению гамет и эмбрионов водных организмов (Франция, Марли Рой, 1992).

**ПУБЛИКАЦИИ.** По теме диссертации опубликовано 4 работы.

**СТРУКТУРА И ОБЪЕМ РАБОТЫ.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материала и методов, результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 110 страницах машинописного текста, включает 33 рисунка и 9 таблиц. В работе использовано 159 источников литературы.

**МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИИ.**

Объектами исследований служили яйцеклетки, спермии, эмбрионы и эмбриональные клетки вьюна (*Misgurnus fossilis* L.) карпа (*Cyprinus carpio* L.) и севрюги (*Acipenser stellatus*).

Спермии и яйцеклетки севрюги, карпов и вьюнов получали после предварительного стимулирования гаметогенеза гонадотропным гормоном или гипофизом. Севрюгам и карпам инъецировали раствор ацетонированных гипофизов осетровых и карповых рыб (Гинзбург А.С., 1968; Пулина Г.А., 1974). Вьюнам инъецировали раствор хорионического гонадотропина по методу модифицированному А.А. Нейфахом (Костомарова А.А., 1975).

Для криоконсервации спермы карпа, севрюги и вьюнов использовали защитные среды, разработанные Е.Ф. Копейкой (1981, 1986).

Криоконсервацию спермы карпа проводили в пластиковых контейнерах емкостью 1 мл с помощью стационарного программного устройства охлаждения УОП-6 производства СКТБ с ОП ИПК и К АН Украины. Сперму рыб после охлаждения в холодильнике до 4 °С разбавляли 1:1 изотермической защитной средой с криопротекторами (ЭГ, ДМСО, Мц или Гл) таким образом, чтобы в конечной среде концентрация криопротектора была равна 10 % об/об. Завышенная концентрация криопротектора была нами взята специально для выявления всех возможных последствий этого воздействия. Обычно, при криоконсервации спермы карпов и осетров используют более низкие концентрации криопротекторов (Копейка Е.Ф., 1986). Сперму охлаждали по трехэтапной программе: 1 этап - от 0 °С до минус 15 °С со скоростью 1-2 град/мин; 2 этап - от минус 15 °С до минус 70 °С со скоростью 15-20 град/мин; 3 этап - от минус 70 °С до минус 196 °С (погружение в жидкий азот).

Сперму вьюна и севрюги криоконсервировали по приведенной про-

грамме с регистрацией режима на микровольтамперметре НЗ99, помещив над поверхностью азота.

После эквilibрации спермиев с крипротекторами и особенно после криоконсервации и размораживания погибала значительная часть спермиев. Но при осеменении икры мы это практически не учитывали и почти всегда давали одинаковое количество спермы в опыте и контроле. Такое искусственное занижение количества спермиев на одну яйцеклетку в опыте было необходимо нам для уменьшения конкуренции между спермиями и повышения возможности реализации потенций всех поврежденных клеток. Это приводило к снижению выживаемости эмбрионов. По разнице в количестве погибших эмбрионов, полученных с использованием нативной спермы и эквilibрированной в средах с крипротекторами или замороженной и размороженной судили о повреждениях генетического аппарата спермиев. После осеменения яйцеклеток карпов и вьюнов на стадии ранней бластулы (начало работы генома) удаляли всю неоплодотворенную, активированную и погибающую икру. Оставшиеся эмбрионы принимали за 100 % и исследовали их гибель на последующих стадиях. У севрюги эту операцию проводили на стадии 2-4 бластомеров. Оставшиеся эмбрионы инкубировали в термостате при температуре 18 °С, периодически удаляя погибшие, и, заменяя воду. Через каждые 12 часов после осеменения проводили учет и удаление погибших эмбрионов во всех чашках. Отбор проводили на 5-6 стадиях развития.

Об оплодотворяющей способности спермиев осетровых судили по доле эмбрионов, достигших стадий двух-четырёх бластомеров. Об оплодотворяющей способности спермиев карпов и вьюнов судили по доле развивающихся зародышей на стадии ранней бластулы и выражали эту величину в процентах как  $\frac{a}{b} \times 100$ , где  $a$  - количество оплодотворенных клеток;  $b$  - общее количество эмбрионов. О повреждениях доминантных генов спермиев судили по доле диплоидных эмбрионов, погибших после стадии средней-поздней бластулы. О повреждении рецессивных генов судили по разнице в долях погибших эмбрионов между диплоидными и андрогенетическими гаплоидными зародышами.

Так как у диплоидных эмбрионов была возможность компенсации поврежденных генов спермией материнским геномом яйцеклетки, то для выявления всех возможных повреждений генетического аппарата спермиев все наши опыты повторили на андрогенетических гаплоидах.

Для получения андрогенетических гаплоидов необходимо было осеменить инактивированные яйцеклетки. Радиационную инактивацию яйцеклеток проводили по методике А.А. Нейфаха (1959) на терапевти-

ческих рентгеновских аппаратах РУМ-11 и РУМ-17 (двухтрубное облучение) в течение 17 мин 19 сек. Сила тока на установках РУМ-17 и РУМ-11 была соответственно 10 мА и 7 мА, напряжение - 200 кВ и 195 кВ. Облучение проводили без фильтра и со снятым тубусом. Расстояние от объекта до анода трубки было 9 см. Общая доза облучения яиц при этих условиях составляла 22 тыс. Рад. Эта доза обеспечивает практически полную инактивацию генома, но еще не повреждает заметным образом цитоплазматические структуры яйца (Нейфах, 1959).

Для получения андрогенетических гаплоидных зародышей облученные яйцеклетки осеменяли нативной спермой, обработанной защитной средой с криопротекторами, а также замороженно-оттаянной.

Для определения митотического индекса и выявления хромосомных aberrаций зародышей карпа и вьюна фиксировали в жидкости Карнуа (Волкова О.В., Елецкий Ю.К., 1971), соответственно на 8-9 стадии (поздняя бластула - ранняя гаструла) и на 9-10 стадии (поздняя бластула - ранняя гаструла), а также перед вылуплением.

Для хромосомного анализа готовили давленые препараты из фиксированных зародышей, предварительно окрашенных ацето-кармином.

Для уменьшения ошибки, повышения качества и достоверности исследований мы проводили многофакторные эксперименты. Статистическая обработка результатов проводилась в вычислительном центре ИПК и К АН Украины.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИИ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В первых экспериментах на гаметах севрюги мы разбавляли сперму средой с ДМСО и замораживали ее. Конечная концентрация криопротектора была равна 10 % об/об. Размороженной спермой осеменяли яйцеклетки и на стадии 2-4 бластомеров удалили все неоплодотворенные и погибшие. Оставшиеся эмбрионы принимали за 100 % и учитывали их гибель на последующих стадиях развития. Было установлено, что смертность эмбрионов севрюги, полученных с использованием криоконсервированной спермы на стадии поздней бластулы значительно выше, чем при использовании нативной спермы. Таким образом, в этом эксперименте было установлено, что последствия криоконсервации спермиев могут проявляться не только у карпов, как было известно из литературы (Жукинский В.Н. и др. 1981; M. Koldras, 1987), но и у других видов рыб.

Такие же эксперименты, но с разными криопротекторами, были поставлены нами на карпах и вьюнах. Как видно из рис. 1, эквивалентная спермиев карпов в средах с 10 % криопротекторов приводила к достоверному снижению выживаемости эмбрионов между контролем и

опытом ( $P=0,95$ ).

Кол-во живых  
эмбрионов, %

Рис. 1. Выживаемость эмбрионов карпов, полученных с использованием спермы, эквilibрированной с криопротекторами  $\square$  или криоконсервированной  $\blacksquare$ . (1 - контроль, 2 - Мц, 3 - ДМСО, 4 - ЭГ).



При этом оказалось, что выживаемость зависела от вида криопротектора. При использовании криоконсервированной спермы различия в выживаемости эмбрионов становились более значимыми, но имели другую направленность. Так, после криоконсервации спермиев с ЭГ смертность эмбрионов оставалась почти такой же, как и до криоконсервации. Из результатов представленных на рис. 1 следует, что криозащитные эффекты ДМСО и Мц выражены в меньшей степени, в сравнении с ЭГ и количество выживших эмбрионов, было значительно ниже, чем после осеменения яйцеклеток нативной спермой ( $P=0,95$ ), или только эквilibрированной с этими криопротекторами ( $P=0,95$ ). Анализ результатов по влиянию на спермии карпов криопротекторов до и после криоконсервации свидетельствует о том, что ДМСО обладает самой низкой криопротекторной активностью. Полученные результаты не противоречат имеющимся в литературе данным о более высокой криопротекторной активности ЭГ в сравнении с ДМСО при криоконсервации спермы карпа (Е.Ф. Копейка, 1986).

На спермиях выюнов также исследовали влияние криопротекторов (ЭГ, ДМСО, Мц, Гл) в различных концентрациях (10,0; 5,0; 2,5 и 0 % об/об). Было установлено (Рис. 2), что только после эквilibрации спермиев в средах с 10 % криопротекторов выживаемость эмбрионов была достоверно ниже, чем при использовании нативной спермы ( $P=0,99$ ). Использование спермиев эквilibрированных в средах с 2,5% или 5 % криопротекторов практически не сказывалось на выживаемости эмбрионов. Подобная зависимость выживаемости эмбрионов от концентрации криопротектора в среде эквilibрации спермиев была установлена и для карпов (Рис. 3). Только эквilibрация спермиев в растворе с 10 % криопротекторов достоверно снижала выживаемость эмбрионов

карпов. Эквilibрация спермы в защитной среде или в той же среде, но с 2,5 % криопротектора не влияла на выживаемость эмбрионов.

Кол-во живых эмбрионов, %

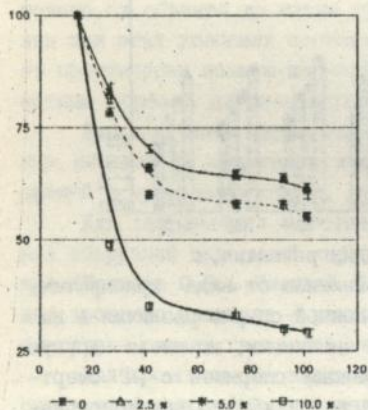


Рис. 2. Влияние эквilibрации спермы вьюнов с различными концентрациями криопротекторов на выживаемость эмбрионов.

Кол-во живых эмбрионов, %

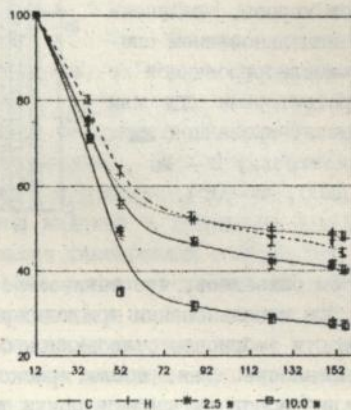


Рис. 3. Влияние эквilibрации спермы карпов с защитной средой и криопротекторами на выживаемость эмбрионов (С-среда, Н-контроль).

Установлено, что выживаемость эмбрионов карпов и вьюнов очень сильно варьирует у различных самок (Рис. 4, 5). Разная выживаемость эмбрионов, полученных с использованием нативной спермы, эквilibрированной с криопротекторами или криоконсервированной, обусловлена различиями в физиологических и генетических потенциях икры.

Таким образом, в результате проведенных экспериментов на нескольких видах рыб (севрюга, карп, вьюн) было установлено, что эквilibрация спермиев в средах с 10 % криопротекторов, или криоконсервация увеличивают смертность эмбрионов. Кроме того, как видно на всех представленных рисунках, гибель эмбрионов значимо ( $P=0,95$ ) различалась между исследуемыми стадиями. Максимальная гибель эмбрионов и различия в выживаемости при варьировании различных факторов достигали максимума между поздней бластулой (момент первого проявления морфогенетической активности генома) и гастролой, а затем сохранялись на одном уровне. Эта закономерность отмечалась на

эмбрионах трех видов рыб и четко прослеживалась во всех опытах.  
 Кол-во живых эмбрионов, %

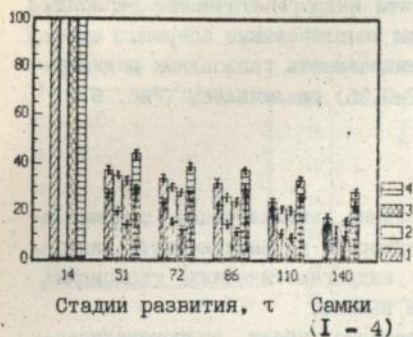


Рис. 4. Выживаемость эмбрионов карпов разных самок, полученных с использованием спермы, эквilibрированной с криопротекторами или криоконсервированной .

Кол-во живых эмбрионов, %

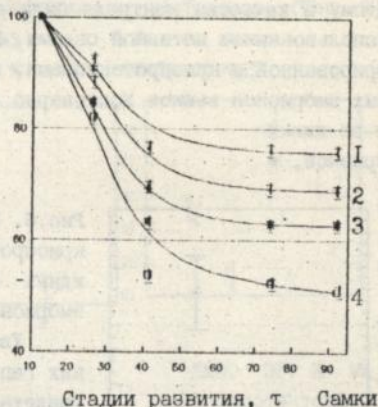


Рис. 5. Выживаемость эмбрионов вьюнов разных самок, полученных с использованием спермы, эквilibрированной в средах с криопротекторами.

Можно предположить, что факторы криоконсервации вызывают хотя и в небольшом числе, но только крупные повреждения хромосом, которые затрагивают большое число генов и поэтому проявляются уже на первых стадиях проявления функции генов. Мелких же хромосомных повреждений оказывается мало и они фактически не проявляются в виде гибели эмбрионов на поздних стадиях.

В диплоидных клетках повреждения рецессивных генов одного из родителей не будут проявляться, так как они могут компенсироваться геномом второго. Поэтому следует ожидать, что в исследуемых нами эмбрионах реализуются не все поврежденные гены спермиев, т.к. они могут компенсироваться женским геномом. В отсутствии этих компенсаторных эффектов гибель эмбрионов, обусловленная повреждениями генома спермиев должна быть еще выше. Для выявления всех возможных повреждений генетического аппарата спермиев, т.е. и доминантных и рецессивных генов мы получали андрогенетические гаплоидные зародыши. Для этого осеменяли яйцеклетки с ядром, предварительно инактивированным радиацией. Осеменение проводили тремя видами спермы: нативной, эквilibрированной с криопротекторами или же криоконсер-

вированной.

Известно, что гаплоидные зародыши и личинки рыб живут до определенной стадии и погибают при явлениях гаплоидного синдрома. Поэтому в качестве контроля были взяты андрогенетические гаплоиды с использованием нативной спермы. При использовании спермы, эквilibрированной с криопротекторами, выживаемость гаплоидных и диплоидных эмбрионов выюнов достоверно ( $P=0,95$ ) различалась (Рис. 6).

Кол-во живых эмбрионов, %

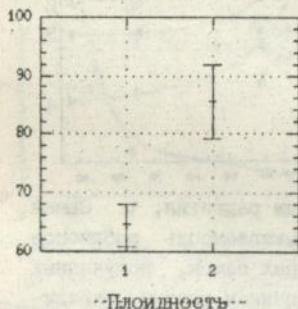


Рис. 6. Влияние эквilibрации спермы с криопротекторами на выживаемость диплоидных и андрогенетических гаплоидных эмбрионов выюнов.

Увеличение гибели андрогенетических гаплоидов в сравнении с диплоидами свидетельствует о повреждении рецессивных генов, которые не проявляются в первом поколении у диплоидов. Причем, самая высокая смертность эмбрионов была,

при использовании спермы, эквilibрированной с ЭГ. Этот факт был подтвержден и в последней серии экспериментов на выюнах, которая была поставлена в соответствии с матрицей (таблица 1).

Таблица 1

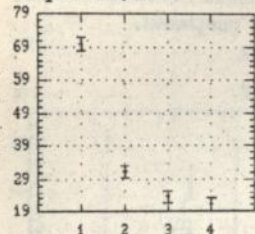
Схема опыта по получению гаплоидных и диплоидных эмбрионов выюнов

	Облученная икра				Необлученная икра			
	Сперма после эквilibрации		Сперма после замораживания		Сперма после эквilibрации		Сперма после замораживания	
Р	1Р 2Р 3Р 4Р	1Р 2Р 3Р 4Р	1Р 2Р 3Р 4Р	1Р 2Р 3Р 4Р				
К								
ДМСО								
ЭГ								
Мц								

Как и в предыдущих экспериментах было показано, что основная гибель эмбрионов происходила на начальных стадиях эмбриогенеза (Рис. 7).

Эффекты эквilibрации спермы с криопротекторами и собственно замораживание оказывали достоверное влияние ( $P=0,95$ ) на выживаемость эмбрионов (Рис. 8). Все исследуемые криопротекторы также оказывали достоверное влияние ( $P=0,95$ ) на выживаемость эмбрионов (Рис. 9).

Кол-во живых эмбрионов, %



Стадии развития

Рис. 7. Выживаемость гаплоидных и диплоидных эмбрионов выинов на разных стадиях развития, полученных с использованием эквilibрированной с криопротекторами и криоконсервированной спермы.

Выживаемость эмбрионов, полученных с использованием размороженной спермы, была достоверно ниже ( $P=0,99$ ), чем выдержанной с криопротекторами (Рис. 10). Из этого следует, что в процессе замораживания также возможны повреждения генома спермиев, ведущие к гибели эмбрионов. Но, так как криоконсервация спермы рыб без криопротекторов невозможна, то степень этих повреждений, а следовательно, и выживаемость эмбрионов, может быть различна в зависимости от используемого криопротектора и плоидности (Рис. 11).

Как видно из результатов, основные повреждения спермиев, выдержанных с ДМСО или Мц, происходят в процессе криоконсервации, тогда как с ЭГ спермии в основном повреждаются на первом этапе — в процессе эквilibрации и в меньшей степени при криоконсервации.

Таким образом, в завершающем эксперименте были подтверждены

Кол-во живых эмбрионов, %

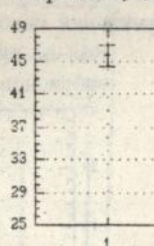
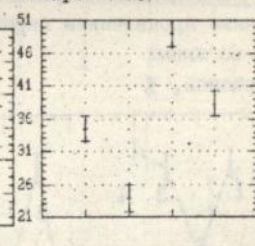


Рис. 8. Влияние эквilibрации (1) и криоконсервации спермы (2) с криопротекторами на выживаемость диплоидных и андрогенетических гаплоидных эмбрионов выинов.

Кол-во живых эмбрионов, %



ДМСО ЭГ К Мц  
Криопротекторы

Рис. 9. Влияние криопротекторов на выживаемость эмбрионов выинов, полученных с использованием спермы эквilibрированной с криопротектором и криоконсервированной.

наши предположения о том, что гибель андрогенетических гаплоидов, полученных с использованием спермы разбавленной средами с криопротекторами или криоконсервированной будет еще выше, чем у диплоидных эмбрионов, и выше, чем в гаплоидном контроле. Причиной повышенной гибели андрогенетических гаплоидов может быть полное отсутствие компенсации поврежденных участков генома самца генами самки, а также проявлением скрытых повреждений генома спермиев.

Кол-во живых эмбрионов, %

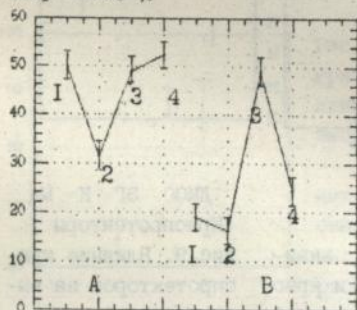


Рис. 10. Влияние криопротекторов (1-ДМСО, 2-ЭГ, 3-Контроль, 4-Мц) и условий обработки спермы (А-эквilibрация с криопротекторами и В-криоконсервация) на выживаемость гаплоидных и диплоидных эмбрионов выкнов.

Для окончательного подтверждения предположения о связи гибели эмбрионов с повреждением генетического аппарата нами были проведены эксперименты по определению числа хромосомных aberrаций в эмбриональных клетках, полученных с использованием спермы, выдержанной с криопротекторами и криоконсервированной. Как видно из результатов, представленных на рис. 12 и 13, у карпов была отмечена тенденция к повышению количества aberrаций при использовании спермы, выдержанной с ЭГ. По количеству aberrаций эмбрионы, полученные от использования спермы, эквilibрированной с ДМСО, ЭГ и Гл не отличались между собой. Достоверные отличия ( $P=0,95$ ) по этому показателю были только между ЭГ и Мц. В эмбриональных клетках выкнов, полученных с использованием спермы, выдержанной с ЭГ и ДМСО, по количеству хромосомных aberrаций не было отличий, тогда как у эм-

Кол-во живых эмбрионов, %

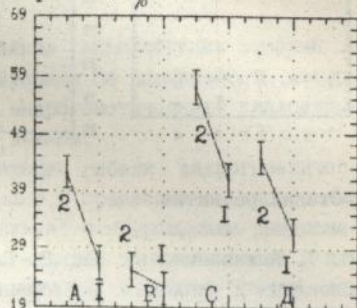


Рис. 11. Выживаемость эмбрионов выкнов в зависимости от плоидности (1-гаплоиды, 2-диплоиды) и криопротекторов (А - ДМСО, В - ЭГ, С - контроль, Д - Мц), используемых при эквilibрации и криоконсервации спермы.

брионов, полученных с использованием спермы, эквilibрированной с Гл и Мц число aberrаций было меньше ( $P=0,95$ ).

Кол-во aberrантных клеток, %.

Кол-во aberrантных клеток, %.

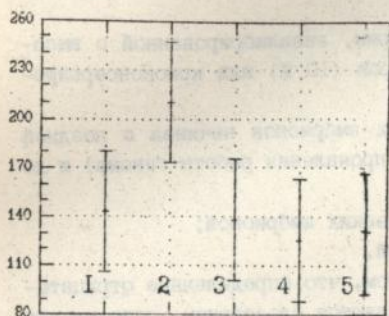


Рис. 12. Влияние эквilibрации спермы карпов с криопротекторами на частоту aberrаций в клетках эмбрионов (1-ДМСО, 2-ЭГ, 3-Гл, 4-Мц, 5-Контроль).

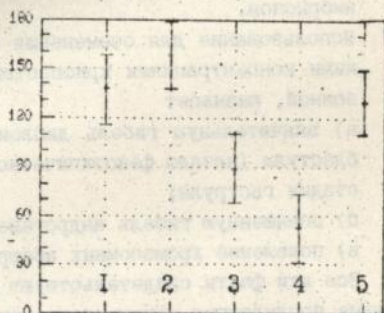


Рис. 13. Влияние эквilibрации спермы вьюнов с криопротекторами на частоту aberrаций в клетках эмбрионов (1-ДМСО, 2-ЭГ, 3-Гл, 4-Мц, 5-Контроль).

Таким образом, в результате этих экспериментов было получено подтверждение того, что гибель эмбрионов на стадиях после бластулы-гастролы является следствием повреждений генетического аппарата спермиев рыб.

#### ВЫВОДЫ

1. При использовании спермы, эквilibрированной с криопротекторами или криоконсервированной, основная гибель эмбрионов происходит со стадии поздней бластулы (начала фенотипического проявления работы генома) до стадии гастролы.
2. Выживаемость эмбрионов карпов и вьюнов, полученных с использованием нативной, эквilibрированной с криопротекторами или криоконсервированной спермы, зависит от генотипа или физиологического состояния самки. (Механизм этого эффекта требует специального исследования).
3. Гибель андрогенетических эмбрионов, полученных при использовании криоконсервированной спермы или эквilibрированной с криопротекторами выше, чем при использовании нативной спермы.
4. Использование спермы, эквilibрированной в средах с 10% криопротекторов или криоконсервированной с ними, снижает выживаемость

мость эмбрионов. При меньших концентрациях криопротектора этот эффект не обнаруживается.

5. Количество выживших эмбрионов зависит от вида криопротектора, в котором находилась сперма до и при замораживании.
6. Эквilibрация спермиев в солевой среде не влияет на выживаемость эмбрионов.
7. Использование для осеменения спермы, эквilibрированной с высокими концентрациями криопротекторов (10 %) или криоконсервированной, вызывает
  - а) значительную гибель диплоидных эмбрионов начиная с поздней бластулы (начало фенотипического проявления работы генома) и до стадии гастролы;
  - б) повышенную гибель андрогенетических эмбрионов;
  - в) появление хромосомных aberrаций.

Все эти факты свидетельствуют о том, что определенные отрицательные последствия криоконсервации являются следствием повреждения генетического аппарата спермиев рыб. Этот эффект, однако, может быть существенно снижен путем подбора оптимальных условий криоконсервации (концентрация и вид криопротекторов и др.).

#### СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.

1. Е.Ф. Копейка, С.И. Дрокин, О.В. Бибенко, А.А. Нейфах и др. Повреждения сперматозоидов рыб при криоконсервации. / Тез. докл. Межд. конф. Достижения и перспективы развития криобиологии и криомедицины, Харьков, 1988, с. 69 - 70.
2. Е.Ф. Копейка, Л.И. Цветкова, В.Я. Катасонов, В.В. Черепанов, С.И. Очкур, О.В. Бибенко, С.И. Дрокин. Формирование коллекции низкотемпературного банка спермы карпа. / Сб. научн. трудов. Вопросы селекции, генетики и племенного дела. 1989, М, 58, с. 66-68.
3. О.В. Бибенко, Е.Ф. Копейка. Влияние криоконсервации спермы карпа *Cyprinus Carpio* на эмбриогенез. Сб. науч. трудов. / В.И. Грищенко. Криоконсервирование репродуктивных клеток и эмбрионов, Харьков, 1992, с. 3-8.
4. O.V. Bibenko. The effect of extreme factors cryopreservation on genome. Workshop on gamete and embryo storage and cryopreservation in aquatic organisms, France, Marly le Roy, 1992, p. 52.

Подп. к печ. 12.04.93. Формат 60×84<sup>1</sup>/<sub>16</sub>. Бумага тип. Печать офсетная. Усл. печ. л. 10.  
Уч.-изд. л. 1.0 Тираж 120 экз. Зак. № 1213. Бесплатно.

---

Харьковское межвузовское арендное полиграфическое предприятие.  
310093, Харьков, ул. Свердлова, 115.



10259A

1165310

AB 27.305