نشریه حفاظت و بهره‌برداری از منابع طبیعی
جلد اول، شماره دوم، ۱۳۹۱
http://ejang.gau.ac.ir

تأثیر عوامل مؤثر در سمیت مواد ضدانجماد در جنین ماهیان

***سعیده کیوانلو[۱] و محمد سوداگر[۲]**

[۱]دانش‌آموخته کارشناسی ارشد دانشکده شیلات و محیط‌زیست دانشگاه علوم کشاورزی و منابع‌طبیعی گرگان،
[۲]دانشیار گروه شیلات دانشکده شیلات و محیط‌زیست دانشگاه علوم کشاورزی و منابع‌طبیعی گرگان

تاریخ دریافت: ۹۰/۱۱/۸ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۱/۹/۹

چکیده

علی‌رغم تلاش‌های فراوان، تاکنون امکان انجماد موفقیت‌آمیز جنین ماهیان میسر نشده است. انجماد جنین عبارت از جایگزین کردن مواد ضد انجماد با آب درون جنین است. انجماد موفقیت‌آمیز جنین ماهیان نیازمند ورود مقادیر و غلظت‌های مناسبی از مواد ضدانجماد به قسمت‌های مختلف جنین است. در بررسی‌های صورت گرفته در زمینه انجماد جنین موجودات، اطلاعات مربوط به سمیت مواد ضد انجماد از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. مواد ضدانجماد در درجه حرارت‌های پایین، سمیت کمتری دارند. مواد ضدانجماد این توانایی را دارند که سمیت یکدیگر را کاهش دهند. به‌طورکلی با افزایش غلظت و زمان غوطه‌وری، درصد تفریخ کاهش می‌یابد، کاهش درصد تفریخ می‌تواند در اثر وارد آمدن شوک‌اسمزی، عدم تعادل یونی و یا اثر سمیت مواد ضدانجماد باشد. نتایج تحقیقات صورت گرفته نشان می‌دهد، با پیشرفت روند تکاملی حساسیت جنین نسبت به غلظت‌های مختلف مواد ضدانجماد کاهش یافته و بهتر می‌تواند غلظت‌های بالای این مواد را تحمل کند.

واژه‌های کلیدی: سمیت، مواد ضدانجماد، جنین، ماهیان

*مسئول مکاتبه: skeivanloo@yahoo.com

مقدمه

علی‌رغم موفقیت‌های قابل توجهی که در زمینه انجماد و محافظت جنین در برابر سرما در پستانداران و برخی بی مهرگان دریایی (چائو و همکاران، ۱۹۹٤) بدست آمده است اما، تاکنون امکان انجماد کاملا موفقیت آمیز جنین ماهیان فراهم نشده است (کابریتا و همکاران، ۲۰۰٦). یکی از فاکتورهای اساسی در انجماد جنین ورود و توزیع همگن مواد ضدانجماد در قسمت‌های مختلف جنین می‌باشد، ابتدا این مواد باید وارد جنین شده تا بتوان اقدام به انجماد جنین نمود (وتی‌فانچایی و همکاران، ۲۰۰۵). این مواد در دماهای پایین از جنین محافظت کرده و مانع از مرگ آن می‌شوند، از سوی دیگر این مواد در غلظت‌های بالا می‌توانند ایجاد مسمومیت نموده و درصد تفریخ را کاهش و تلفات را در جنین ماهیان افزایش دهند (کیوانلو و همکاران، ۲۰۱۱) در بررسی‌های صورت گرفته در زمینه انجماد جنین موجودات، اطلاعات مربوط به سمیت مواد ضدانجماد از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند.

اثرات هر ماده ضدانجماد علاوه بر ویژگی و خاصیت شیمیایی آن، به مرحله تکامل و نوع گونه نیز بستگی دارد (سوزوکی و همکاران، ۱۹۹۵). در اثر کاهش دما، مقادیری از آب موجود در سلول‌ها از طریق دهیدراسیون (آبگیری) اسمزی خارج می شود و در صورتی می توان انواع سلول‌ها را به شکل موفقیت آمیز منجمد کرد که کریستاله شدن آب باقی مانده در سلول صدمات جبران ناپذیری را به سلول وارد نسازد. مواد ضدانجماد سبب کاهش تشکیل کریستال‌های یخی درون سلول شده و از این طریق صدمات سلولی را به حداقل می‌رسانند. با این وجود اکثر این مواد بدلیل سمیت شدید و ایجاد صدمات اسمزی می‌توانند سبب بروز صدمات و آسیب‌های سلولی شوند (پیلایی و همکاران، ۲۰۰۱).

بررسی سمیت مواد ضد انجماد می‌تواند بر اساس شاخص‌های مختلفی صورت گیرد که سبب بدست آمدن نتایج متنوعی خواهند شد. یکی از این شاخص‌ها قابلیت برگشت پذیری سلول است که در سلول‌های جنسی و یا بافت‌هایی که تکثیر نمی‌کنند قابل ارزیابی نیست. برای بررسی اثر سمیت مواد ضد انجماد روی قابلیت زیست سلول‌های جنسی اغلب از شاخص‌هایی نظیر قابلیت باروی و توانایی تحرک استفاده می شود. برخی از آزمایشات زیست سنجی این قابلیت را دارند که برای بررسی توانایی عملکرد سلول‌ها و بافت‌ها مورد استفاده قرار گیرند (بست، ۲۰۰۸).

اهمیت بررسی سمیت مواد ضدانجماد: با حذف یا کاهش قابل ملاحظه سمیت مواد ضدانجماد، امکان نگهداری اعضای بدن و حتی جنین موجودات زنده در دماهای پایین برای مدت زمان نامحدود

فراهم خواهد شد و این امر شرکت‌های بزرگ تجاری را به سرمایه گذاری در این زمینه ترغیب خواهد نمود. با استفاده از اطلاعات بدست آمده در زمینه اثرات و حدود سمیت مواد ضد انجماد، می‌توان اقدام به ساخت محلول‌های شیشه ساز برای نگهداری سلول‌ها، بافت‌ها، اعضای بدن و حتی جنین موجودات زنده در درجه حرارت‌های پایین نمود به‌طوری‌که، بتوان آن‌ها را برای مدت نامحدود نگهداری و حمل و نقل کرد و پس از خروج از حالت انجماد بتوانند به حیات طبیعی خود ادامه دهند (بست، ۲۰۰۸).

اثر دما بر سمیت مواد ضد انجماد: به‌طورکلی مواد ضدانجماد در دمای پایین‌تر، سمیت کمتری دارند، با این وجود مکانیسم کاهش سمیت در مواد مختلف، متفاوت است. کاهش دما سبب می‌شود که سمیت دی متیل سولفوکساید به‌طور قابل ملاحظه‌ای کاهش یابد (وانگ و همکاران، ۲۰۰۷). دی‌متیل سولفوکساید در دمای بالا، خاصیت آبگریزی بیشتری دارد و این سبب آبگیری بیشتر از غشای سلول می‌شود (سام و دپابلو، ۲۰۰۳). این احتمال وجود دارد که با کاهش دما، اکسید شدن دی متیل سولفوکساید به گروه‌های سولفیدریل کاهش یابد (اسنو و همکاران، ۱۹۷۵).

سمیت اختصاصی مواد ضد انجماد در سلول‌ها، بافت‌ها و اندام‌ها: مواد ضد انجماد یا متابولیت‌های حاصل از آن می‌توانند سبب بروز صدمات شیمیایی در برخی بافت‌ها شوند. اتیلن گلیکول در طی متابولیسم به اگزالیک اسید تبدیل می‌شود که می‌تواند کریستال‌های اگزالات کلسیم را در کلیه تشکیل دهد (هوودا و همکاران، ۲۰۱۰). گلیسرول نیز با افزایش ترشح نیتریک اکسید باعث بروز صدماتی در کلیه می‌شود (چاندلر و چوپرا، ۲۰۰۶). متانول یکی دیگر از مواد ضدانجماد است که در اثر متابولیسم به فرمیک اسید تبدیل می‌شود و سبب تخریب عصب بینایی و بدنبال آن کوری می‌گردد (تفلی، ۱۹۹۱).

در میان مواد ضد انجماد، گلیسرول کمترین سمیت را برای بافت کلیه داشته و در مقایسه با دی متیل سولفوکساید، اثرات سمی کمتری برای اسپرم دارد (تی‌سلوتین و همکاران، ۱۹۹۹). با این وجود، در جنین ماهی فلاندر (*Paralichthys olivaceus*) (چن و تیان، ۲۰۰۵) و باکتری اشیرشیاکلای (*Escherichia coli*) (مارکاریان و همکاران، ۲۰۰٤) گلیسرول نسبت به سایر مواد ضدانجماد بیشترین اثرات سمیت را بر جای گذاشت.

ترکیب مواد ضد انجماد و اثرات آن بر کاهش سمیت: مواد ضد انجماد این توانایی را دارند که سمیت یکدیگر را کاهش دهند. ترکیب دی متیل سولفوکساید با سایر مواد ضدانجماد یک ترکیب گرمازا است. در ترکیب فرمامید با دی متیل سولفوکساید نسبت به اتیلن گلیکول گرمای بیشتری آزاد می‌شود و بدین‌ترتیب فرمامید نسبت به اتیلن گلیکول توانایی بیشتری در کاهش سمیت دی‌متیل سولفوکساید دارد (فاحی و همکاران، ۱۹۸۷). در سال‌های اخیر بیان شده است که دی‌متیل سولفوکساید قادر است سمیت فرمامید را کاهش دهد اما این مطلب درست نیست، بلکه ترکیب دی متیل سولفوکساید با فرمامید سبب می‌شود که توانایی زیستی کلیه به‌طور قابل ملاحظه‌ای افزایش یابد، که با دی متیل سولفوکساید به تنهایی امکان پذیر نیست. افزودن مواد ضد انجماد غیر سمی مثل ساکارز و ترهالوز اثر معنی داری در کاهش سمیت ایزومرهای ۲و۳- بوتان دی‌ال در گلبول‌های قرمز خون داشت (بوترون و پی‌ریدیو، ۱۹۹٤). همچنین ترهالوز سبب کاهش سمیت دی متیل سولفوکساید در جنین اویستر شد (چائو و همکاران، ۱۹۹٤).

در جنین ماهی فلاندر با افزودن متانول با غلظت ۵ درصد، سمیت گلیسرول، دی متیل سولفوکساید، پروپیلن گلیکول و اتیلن گلیکول به طور معنی داری کاهش یافت (ژانگ و همکاران، ۲۰۰۵).

مکانیسم عمل سمیت مواد ضدانجماد: به نظر می‌رسد یکی از مکانیسم‌های سمیت مواد ضدانجماد، دناتوره کردن و ایجاد تغییر در ساختار پروتئین‌ها باشد (آراکاوا و همکاران، ۱۹۹۰). آنزیم ترمولیزین بوسیله دی متیل فرمامید و در مقادیر کمتر بوسیله دی متیل سولفوکساید غیر فعال می‌شود در حالی که گلیسرول و ترهالوز سبب فعال شدن این آنزیم می‌شوند (پاژنگ و همکاران، ۲۰۰٦). با این وجود پروتئین‌های خالصی که به‌طور تصادفی انتخاب شده بودند به غلظت‌های بالاتری از فرمامید و دی متیل‌سولفوکساید برای دناتوره شدن نیاز داشتند (فاحی و همکاران، ۱۹۹۰). در بررسی اثر مواد ضد انجماد بر همولیز گلبول‌های قرمز مشخص شد، درجه همولیز به تغییرات القا شده در شکل و ساختار گلبول‌های قرمز بستگی دارد و اختلاف ناچیز در خاصیت آبگریزی غشای سلول و آبگریزی محلول، سبب پدید آمدن تغییرات عمده ای در شکل و حد بالایی از همولیز در گلبول‌های قرمز شد. توانایی فرمامید در خنثی کردن و کاهش سمیت دی متیل سولفوکساید ممکن است به این علت باشد که این دو ماده اثرات متضادی در خاصیت آبگریزی محلول دارند (باکالچوا و همکاران، ۱۹۹٦). به‌طورکلی

این فرضیه وجود دارد که استحکام پیوندهای هیدروژنی در مواد ضدانجماد علت اصلی سمیت آن‌ها است (هر چند قندهایی مثل ساکارز که به عنوان ماده ضدانجماد استفاده می‌شوند، غیر سمی هستند). برای تعیین سمیت مواد ضدانجماد از مقیاس استاندارد و قابل اندازه‌گیری تحت عنوان qv^* استفاده می‌شود که تابعی از گروه‌های قطبی مولکولی در غلظت‌های مورد نیاز برای شیشه‌ای شدن – شیشه‌ای شدن عبارت است از تبدیل یک مایع به جامد، بدون تشکیل بلور در ساختار آن بلکه با بالا بردن بی‌نهایت ویسکوزیته به‌صورت ناگهانی با کاهش دما تا ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد است. از این مقیاس می‌توان برای کنترل سمیت مواد ضد انجماد استفاده کرد که فرمول آن به‌صورت زیر است:

$$qv^* = M_W / M_{PG}$$

در این فرمول qv^* غلظت مورد نیاز برای شیشه‌ای شدن ۵ تا ۱۰ میلی‌لیتر از محلول است هنگامی که نرخ سردسازی ۱۰ درجه سانتی‌گراد در دقیقه باشد. M_W مول آب است و M_{PG} مول گروه‌های قطبی ماده ضد انجماد نفوذپذیر است. برای مثال مول گروه‌های قطبی در گلیسرول ۳ گروه هیدروکسیل است، در اتیلن گلیکول ۲ گروه هیدروکسیل و در دی‌متیل سولفوکساید، ۱ گروه سولفینیل‌سولفوکساید است. با تغییر qv^* سمیت و قابلیت شیشه‌سازی به‌صورت خطی تغییر می‌کند. برای بیشتر مواد ضد انجماد qv^* در محدوده بین ۲ تا ٤ است اما، در دی متیل‌سولفوکساید این عدد به ٦ می‌رسد. یک محلول با qv^* بالا، به ازای هر مولکول آب، گروه‌های قطبی کمتری خواهد داشت و این بدان معنی است که پیوندهای هیدروژنی قوی‌تری با آب تشکیل می‌دهد و داشتن پیوندهای هیدروژنی قوی به معنی سمیت بیشتر است. به‌طوری‌که دی متیل سولفوکساید، فرمامید و متانول در غلظت‌های بالا و دمای بالاتر از ۲۰ درجه سانتی‌گراد قادرند DNA موجود در سلول را حل کنند (فاحی و همکارن، ۲۰۰٤).

غلظت و همچنین سمیت مواد ضد انجماد نفوذپذیر با استفاده از مواد ضدانجماد نفوذناپذیر که عمدتا درشت مولکول‌هایی با وزن مولکولی بالا هستند (مثل پلی ونیل پیرولیدوون، پلی‌اتیلن گلیکول و ساکارز) می‌تواند کاهش یابد. مواد ضدانجماد نفوذناپذیر بزرگتر از آن هستند که بتوانند به داخل سلول وارد شده و انتشار یابند. با این وجود به شیشه‌ای شدن آب موجود در فضای خارج سلولی کمک می‌کنند (کولشوا و همکاران، ۲۰۰۱).

اثر سمیت مواد ضد انجماد بر آبزیان: غلظت مواد ضد انجماد، روند افزایش غلظت، مرحله تکامل جنینی و مدت زمانی که جنین در معرض مواد ضد انجماد قرار می‌گیرد از جمله عوامل کلیدی در زمینه محافظت از جنین موجودات در برابر سرما هستند (ویتین‌گام، ۱۹۸۰). از آن جا که گونه‌های مختلف موجودات واکنش‌ها و عکس‌العمل‌های متفاوتی نسبت به مواد ضد انجماد از خود نشان می‌دهند لذا، ضروری است که آستانه تحمل و حساسیت هر موجود نسبت به این عوامل به‌صورت جداگانه مورد ارزیابی قرار گیرد. در بررسی اثر سمیت مواد ضدانجماد سه عامل بسیار مهم عبارتند از: نوع ماده ضدانجماد، مرحله تکامل جنینی و مدت زمانی که جنین در معرض این مواد قرار می‌گیرد. اثر هر یک از این عوامل و میزان سمیتی آن در جنین آبزیان در زیر بیان شده است.

نوع ماده ضد انجماد: نتایج تحقیقات انجام شده در جنین ماهی فلاندر نشان داد، اتیلن‌گلیکول در تمامی غلظت‌های مورد بررسی، برای جنین این گونه سمی بود (چن و تیان، ۲۰۰۵). رابرتسون و همکاران در سال ۱۹۸۸ نیز بیان کردند اتیلن گلیکول حتی در پایین ترین غلظت، اثرات سمی روی جنین ماهی باس کانالی (*Sciaenops ocellatus*) دارد. با این حال، نتایج بررسی‌های کابریتا و همکاران در سال ۲۰۰٦ نشان داد اتیلن گلیکول ماده ضد انجمادی است که کمترین سمیت را در طی مراحل تکامل جنینی سیم‌دریایی سر طلایی (*Sparus aurata*) دارد. نتایج بررسی‌های ژانگ و راوسون در سال ۱۹۹٦ نشان داد جنین ماهی گورخری (*Brachydanio rerio*)، سطوح مختلف متانول را نسبت به اتیلن گلیکول بهتر تحمل کرد و نسبت به آن حساسیت کمتری داشت. نتایج تحقیقات صورت گرفته در جنین ماهی فلاندر نیز بیانگر آن بود که متانول سمیت کمتری نسبت به اتیلن گلیکول داشت (چن و تیان، ۲۰۰۵).

رینارد و چوکارد در سال ۱۹۸۹ سمیت مواد ضدانجماد را در جنین صدف دو کفه‌ای (*Crassostria gigas*) بررسی کرده و نتایج این بررسی نشان داد که متانول کمترین سمیت را در جنین در حال تکامل داشت. نتایج پژوهش صورت گرفته توسط رابرتسون و همکاران در سال ۱۹۸۸ نشان داد از میان مواد ضدانجماد متنوع مورد آزمایش ، دی متیل‌سولفوکساید کمترین اثرات سمی را در جنین ماهی باس کانالی بر جای گذاشت. جنین ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Salmon gairdnert*) و ماهی آزاد کوهو (نقره‌ای) (*Oncorhyncus kisutch*)، از میان سه غلظت ۱، ۲ و ٤ مولار دی‌متیل

سولفوکساید تنها توانستند غلظت ۱ مولار را تحمل کنند و در سایر غلظت‌ها از بین رفتند (استوس و دونالدسون، ۱۹۸۳).

سوزوکی و همکاران در سال ۱۹۹۵ نتایجی را مبنی بر تلفات دسته جمعی و گروهی در جنین ماهی مداکا، قزل آلای رنگین کمان و کپور، هنگامی که در غلظت‌های بالاتر از ۵ مولار دی‌متیل سولفوکساید قرار گرفتند گزارش کردند. در جنین ماهیان، گلیسرول نسبت به دی متیل سولفوکساید سمیت بیشتری داشت. هاروی و همکاران در سال ۱۹۸۳ به بررسی اثر سمیت این دو ماده در جنین ماهی گورخری پرداختند، نتایج نشان داد غلظت ۱ مولار دی متیل سولفوکساید نتوانست روی درصد تفریخ جنین ماهی گورخری اثر گذار باشد در حالی که گلیسرول در همان غلظت بسیار سمی بود. نتایج بررسی‌های بن آموتز و رستا در سال ۱۹۸۱ نیز نشان داد جنین شاه ماهی اقیانوس اطلس می‌تواند به مدت دو ساعت غلظت ۱/۵ مولار دی متیل سولفوکساید را تحمل کند در حالی که گلیسرول در همان غلظت اثرات سمی بر جای گذاشت.

مدت زمان در معرض‌گذاری: بررسی‌های صورت گرفته در برخی از آبزیان نشان می‌دهد افزایش زمان در معرض گذاری با مواد ضد انجماد سبب می‌شود سمیت مواد ضدانجماد افزایش یابد (پیلای و همکاران، ۲۰۰۱). این احتمال وجود دارد که مواد ضد انجماد سبب ایجاد اثرات زیان آوری در همه یا بخشی از پیکره موجود شده و از این رو درصد تفریخ را کاهش دهند. به نظر می رسد که مدت زمان در معرض گذاری جنین با این مواد، عامل مهمی است به‌ویژه هنگامی که غلظت مواد ضدانجماد از ۵ مولار فراتر می‌رود. با ابن حال باید توجه داشت برای دستیابی به انجماد موفقیت آمیز جنین، باید مقداری از مواد ضدانجماد به درون پیکره جنین وارد شوند و این مستلزم استفاده از غلظت‌های بالای مواد ضدانجماد است. نتایج تحقیقات صورت گرفته نیز نشان می‌دهد ارتباط مستقیمی بین غلظت‌های بالای این مواد و موفقیت در فرآیند انجماد وجود دارد (بست، ۲۰۰۸).

مرحله تکامل جنینی: لارو ماهیان در مراحل اولیه تکامل جنینی از نفوذپذیری و تراوایی نسبتا بالایی برخوردار هستند اما، نسبت به ورود مواد ضدانجماد و تغییرات غلظت مایعات درون و برون سلولی بسیار حساس بوده و خطر مرگ جنین وجود دارد (وتیفاندچایی و همکاران، ۲۰۰۵). در طی مراحل تکامل جنینی آبزیان از جمله: ماهی، بی مهرگان دریایی و سخت پوستان، حساسیت نسبت به مواد ضدانجماد کاهش یافته و مقاومت در برابر سمیت مواد ضدانجماد افزایش می‌یابد (سیمون و همکاران،

۱۹۹٤؛ چائو و همکاران، ۱۹۹٤؛ نیوتون و سابرمونیام، ۱۹۹٦؛ اوربانی و همکاران، ۱۹۹۷؛ دنـی‌یـس و همکاران، ۱۹۹۸). نتایج بررسی‌های رابرتسون و همکاران (۱۹۸۸) نشان داد، جنین ماهی باس کانـالی در مرحله ظهور دم نسبت به مرحله مورولا، حساسیت کمتری نسبت به غلظت‌های مختلف مواد ضـد انجماد دارد. علت این امر می‌تواند افزایش تحمل نسبت به دستکاری، تغییر در تراوایی و نفوذپـذیری غشای سلولی و توانایی تنظیم اسمزی باشد. در این بررسی اتیلن گلیکول در مرحله مورولا برای جنین ماهی باس کانالی بسیار سمی و با پیشرفت روند تکامل جنینی در مرحله ظهور دم تقریبا بی ضرر بود.

نتیجه‌گیری

این احتمال وجود دارد که مواد ضدانجماد سبب ایجاد اثرات زیان باری در همه یا بخشی از پیکره موجود شده و از این طریق درصد تفریخ را کاهش دهند. به‌طورکلی، مواد ضدانجماد می‌توانند سبب بروز صدماتی شوند که به دو دسته صدمات بیوشیمیایی و صدمات اسمزی تقسیم می‌شوند. با وجود بررسی‌های فراوان، علت اصلی و نحوه بروز صدمات بیوشیمیایی هنوز ناشناخته است، با این حال این صدمات با افزایش زمان در معرض‌گذاری، افزایش می‌یابند. صدمات اسمزی نیز به علت تغییر در حجم و اندازه سلول‌ها ایجاد می‌شوند که می‌توانند روی نفوذپذیری و تراوایی مواد ضدانجماد اثرگذار باشند (رینارد و کوچارد، ۱۹۸۹). کاهش درصد تفریخ می‌تواند به‌علت وارد آمدن شوک اسمزی، عدم تعادل یونی و یا اثرمستقیم سمیت مواد ضدانجماد باشد. مواد ضدانجماد همچنین می‌توانند نفوذپذیری و تراوایی غشا را نسبت به یون‌ها تغییر داده و سبب اثرات غیرمستقیم سمیت شوند (رابرتسون و همکاران، ۱۹۸۸).

در مجموع، سمیت مواد ضدانجماد در دماهای پایین کمتر بوده و حتی اگر دما به اندازه کافی پایین باشد، سمیت این مواد بسیار ناچیز خواهد بود. به نظر می‌رسد آگاهی از مکانیسم نفوذپذیری یا تراوایی این مواد به درون جنین و نیز یافتن راهی برای بالابردن میزان نفوذپذیری این مواد کلید اصلی برای موفقیت در فرآیند انجماد جنین ماهیان باشد (ژانگ و راوسون، ۱۹۹۵). علاوه بر آن باید توجه داشت که مواد ضدانجماد باید در حجم مناسب و به اندازه کافی وارد سلول‌های جنین شوند تا امکان انجماد موفقیت‌آمیز جنین ماهیان فراهم شود. نتایج متفاوتی که از بررسی سمیت مواد ضدانجماد در جنین ماهیان بدست آمده است نشان دهنده ضرورت و اهمیت مطالعات اختصاصی سمیت این مواد برای هر یک از گونه‌های ماهیان است.

رهیافت‌های ترویجی

مواد ضدانجماد نقطه انجماد محلول‌ها را کاهش داده و از تشکیل کریستال‌های یخ در محلول‌های داخل و خارج سلول جلوگیری می‌کنند با این وجود،این مواد در غلظت های بالا می‌توانند ایجاد مسمومیت نموده و سبب تلفات جنین ماهیان شوند. سمیت این مواد به عواملی نظیر: غلظت آن‌ها، دما و مدت زمان در معرض گذاری سلول با مواد ضدانجماد و گونه مورد مطالعه مرتبط است. با استفاده از اطلاعات بدست آمده در زمینه اثرات و حدود سمیت مواد ضدانجماد، می‌توان اقدام به ساخت محلول‌های شیشه‌ساز برای نگه‌داری جنین ماهیان در درجه حرارت‌های پایین برای مدت نامحدود نمود به‌طوری‌که پس از خروج از حالت انجماد بتوانند به حیات طبیعی خود ادامه دهند (بست، ۲۰۰۸).

منابع

1. Arakawa, T., Carpenter, J.F., Kita, Y.A. and Crowe, J.H. 1990. The basis for toxicity of certain cryoprotectants: A hypothesis. Cryobiology, 27: 401-415.
2. Bakaltcheva, I.B., Odeyale, C.O., and Spargo, B.J. 1996. Effects of alkanols, alkanediols and glycerol on red blood cell shape and hemolysis. Biochemical et biophysical acta, 1280(1): 73-80.
3. Ben-Amotz, A., and Rosenthal, H. 1981. Cryopreservation of marine unicellular algae and early life stage and life for use in mariculture. European marinculture society publication, 6: 149-162. (Bredene, Belgium).
4. Best, B. 2008. A History of Cryonics. The Immoralist. Cryonics institute. http://www.cryonics.org/immortalist/november08.History.pdf. Retrieved 2009-08-24.
5. Boutron, P. and Peyridieu, J.F. 1994. Reduction in toxicity for red blood cells in buffered solutions containing high concentrations of 2, 3-butanediol by trehalose, sucrose, sorbitol, or mannitol. Cryobiology, 31(4): 367-373.
6. Cabrita, E., Robles, V., Wallace, J.C., Sarasquete, M.C. and Herra´ez, M.P. 2006. Preliminary studies on the cryopreservation of gilthead seabream (*Sparus aurata*) embryos. Aquaculture, 251: 245– 255.
7. Chandler, V. and Chopra, K. 2006. Protective effect of resveratrol, a polyphenolic phytoalexin on glycerol-induced acute renal failure in rat kidney. Renal Failure, 28(2): 161-169.
8. Chao, N.H., Chiang, C.P., Hsu, H.W., Tasi, C.T. and Lin, T.T. 1994. Toxicity tolerance of oyster embryos to selected cryoprotectants. Aquatic living resources, 9: 99-104.

9. Chen, S.L. and Tian, Y.S. 2005. Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos by vitrfication. Theriogenology, 63: 1207-1219.
10. Dinnyes, A., Urbanyi, B., Baranyai, B. and Magyary, I. 1998. Chiling sensivity of carp (*Cyprinus carpio*) embryos at different developmental stages in the presence of cryoprotectants: work in progress. Theriogenology, 50: 1-13.
11. Fahy, G.M., Levy, D.I. and Ali, S.E. 1987. Some emerging principles underlying the physical properties, biological actions, and utility of verification solutions. Cryobiology, 24(3): 196-213.
12. Fahy, G.M., Lilley, T.H., Linsdell, H., St. John Douglas, M. and Meryman, H.T. 1990. Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: In search of molecular mechanisms. Cryobiology, 27(3): 247-268.
13. Fahy, G.M., Wowk, B., Wua, J. and Paynterb, Sh. 2004. Improved vitrification solutions based on the predictability of vitrification solution toxicity. Cryobiology, 48: 22-35.
14. Harvey, B., Kelley, R.N. and Ashwood-Smith, J. 1983. Permeability of intac and dechorionated zebra fish embryos to glycerol and dimethyl sulfoxide. Cryobiology, 20: 432-439.
15. Hovda, K.E., Guo, C., Austin, R., and McMartin, K.E. 2010. Renal toxicity of ethylene glycol results from internalization of calcium oxalate crystals by proximal tubule cells. Toxicology Letters, 192(3): 365-367.
16. Keivanloo, S., Hajibeglou, A.A. and Sudagar, M. 2011. Preliminary studies on the freezing (cryopreservation) of fish embryos. The second national conference on fisheries and aquatic organisms. Lahijan, Iran.
17. Kuleshova, L.L., Shaw, J.M. and Trounson, A.O. 2001. Studies on replacing most of the penetrating cryoprotectant by polymers for embryo cryopreservation. Cryobiology, 43: 21-31.
18. Markarian, S.A., Bonora, S., Bagramyan, K.A. and Arakelyan, V.B. 2004. Glass-forming property of the system diethyl sulphoxide/water and its cryoprotective action on Escherichia coli survival. Cryobiology, 49(1):1-9
19. Newton, S.S. and Subramoniam, T. 1996. Cryoprotectant toxicity in penaeid prawn embryos. Cryobiology, 33: 172-177.
20. Pazhang, M, Khajeh, K., Ranjbar, B., and Hosseinkhani, S. 2006. Effects of water-miscible solvents and polyhydroxy compounds on the structure and enzymatic activity of thermolysin. journal of Biotechnology, 127(1): 45-53.
21. Pillai, B.R., Rao, K.J., and Mohanty, journal of 2001. Toxicity of selected Cryoprotectants to the first zoeal stages of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) (de Man). Ashian fisheries science. 14: 1-8.
22. Renard, P. and Cochard. J.C. 1989. Effects of various cryoprotectants on Pacific oyster (*Crassostria gigas*). Thunberg, Manil clam. Cryoletters, York, UK, V.P, P.69-180.

23. Robertson, S.N., Lawrence, A.L., Neil. W.H., Arnold, C.R. and McCarty, G. 1988. Toxicity of the cryoprotectants glycerol, dimethyl sulfoxide, ethylene glycol, methanol, sucrose, and sea salt solution to the embryos of red drum. The progressive fish culturist, 50: 148-154.
24. Simon, C., Dumont, P., Cuende, F.X. Diter, A. and Aquacop. 1994. Determination of suitable freezing media for cryopreservation of *Penaus indicus* embryos. Cryobiology, 31: 245-253.
25. Snow, J.T., John W. Finley, J.W. and Friedman, M. 1975. Oxidation of sulfhydryl groups to disulfides by sulfoxides. Biochemical and biophysical research communications, 64(1): 441-447.
26. Stoss. J. and Donaldson, E.M. 1983. Studies on cryopreservation of eggs from rainbow trout (*Salmon gairdnert*) and coho salmon (*Oncorhyncus kisutch*). Aquaculture, 31: 51-56.
27. Sum, A.K., and De Pablo, J.J. 2003. Molecular simulation study on the influence of dimethylsulfoxide on the structure of phospholipid bilayers. Biophysical journal, 85(6): 3636-3645.
28. Suzuki, T., Komada, H., Takai, R., Arii, K. and Kozima, T.T. 1995. Relation between toxicity of cryoprotectant Me_2SO and its concentration in several fish embryos. Fisheries Scinece. 61: 193-197.
29. Tephly, T.R. 1991. The toxicity of methanol. Life sciences. 48(11): 1031-1041.
30. Tselutin, K., Seigneurin, F., and Blesbois, E. 1999. Comparison of cryoprotectants and methods of cryopreservation of fowl spermatozoa Poultry Science. 78(4): 586-590.
31. Urbanyi, B., Baranyai, B., Magyary, I. and Dinnyes, A. 1997. Toxicity of methanol, DMSO and glycerol on carp (*Cyprinus carpio*) embryos in different development stages. Theriogenology, 47: 408 (abstract).
32. Vuthiphandchai, V., Pengpun, B., and Nimrat, S. 2005. Effects of cryoprotectant toxicity and temperature sensitivity on the embryos of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Aquaculture, 246: 275– 284.
33. Wang, X., Hua, T.Ch., Sun, D.W., Liu, B., Yang, G. and Cao, Y. 2007. Cryobiology. 55(1): 60-65.
34. Whittingham, D.G. 1980. Principles of embryo preservation In: Low temperature preservation in Medicine and Biology (ed. M.J. Ash wood Smith and J. Farrant). Pitman Medical Ltd. Turnbridge Wells. Kent. U.K. 65-83.
35. Zhang, T. and Rawson, D.M. 1996. Feasibility studies on verification of intact Zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos. Cryobiology, 33: 1–13.
36. Zhang, Y.Z., Zhang, S.C., Liu, X.., Xu, Y.J., Hu, J.H., Xu, Y.Y., Li, J. and Chen, S.L. 2005. Toxicity and protective efficency of cryoprotectants to flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos. Theriogenology, 63: 765-773.

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
J. of Conservation and Utilization of Natural Resources, Vol. 1 (2), 2012
http://ejang.gau.ac.ir

Cryoprotectant toxicity in fish embryos

***S. Keivanloo[1] and M. Sudagar[2]**
[1]M.Sc. graduated student, Dept. of fisheries and environmental, Gorgan university of agricultural sciences and natural resources, [2]Associate prof., dept. of fisheries and environmental, Gorgan university of agricultural sciences and natural resources
Received: 2012-1-28; Accepted: 2012-11-29

Abstract

Successful fish embryo cryopreservation has not been achieved. Cryopreservation of fish embryos is replacement of cryoprotectants with water inside embryo. Cryopreservation of fish embryos requires an optimal concentration of cryoprotectants inside all embryo compartments. In researches on cryopreservation of embryo, information on relative toxicities of cryoprotectants is of key importance. Cryoprotectants are less toxic at lower temperatures**.** Cryoprotectants can neutralize the toxicity of other cryoprotectants. Generally the hatching rate decrease with increase in concentration and expose time. Reduced hatch may be a result of osmotic shock, ionic imbalance or consequence of cryoprotectant toxicity. As the progress of embryonic development, sensitivity of embryos decrease to the different concentration of cryoprotectants and can tolerate high concentration of this materials better.

Keywords: Toxicity; Cryoprotectants; Embryos; Fish

*Corresponding Author; Email: Skeivanloo@yahoo.com