

УДК 57.043: 577.352.462/464

UDC 57.043: 577.352.462/464

Влияние эквilibрации в среде замораживания на осмотическую устойчивость и жизнеспособность 8-клеточных эмбрионов мыши

Е.И. Смольянинова¹, О.Б. Хроменкова², Г.В. Жерноклев³, О.В. Пишко¹

¹Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

²Харьковский государственный медицинский университет

³Харьковский биотехнологический центр

Equilibration Effect in Freezing Medium on Osmotic Resistance and Viability of 8-Cell Mice Embryos

SMOLYANINOVA E.I.¹, KHROMENKOVA O.B.², ZHERNOKLEV G.V.³, PISHKO O.V.¹

¹Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov

²Kharkov State Medical University

³Kharkov Biotechnology Centre

Исследовали влияние различных этапов быстрого замораживания в глицерин-сахарозной среде на уровень жизнеспособности и осмотическую устойчивость 8-клеточных эмбрионов мыши. Показано, что длительность предварительной эквilibрации эмбрионов в среде замораживания является ключевым этапом, влияющим на конечную сохранность эмбрионов. Выявлено, что одно- и двухэтапное добавление растворов глицерина к эмбрионам оказывает различное влияние на количественные значения транспортных характеристик плазматических мембран ранних зародышей. Обсуждаются возможные механизмы повреждающего действия растворов глицерина высоких концентраций на мембранные структуры эмбрионов мыши.

Ключевые слова: быстрое замораживание, эмбрионы, проницаемость, глицерин, жизнеспособность.

Вивчали вплив різних етапів швидкого заморожування в глицерин-сахарозному середовищі на життєздатність та осмотичну стійкість 8-клітинних ембріонів миші. Показано, що тривалість попередньої еквilibрації ембріонів у середовищі заморожування є ключовим етапом, що впливає на кінцеву збереженість ембріонів. Виявлено, що одно- та двохетапне додавання розчинів глицерину має різний вплив на кількісні значення транспортних характеристик плазматичних мембран ранніх зародків. Обговорюються можливі механізми пошкоджуючої дії розчинів глицерину великих концентрацій на мембранні структури ембріонів миші.

Ключові слова: швидке заморожування, ембріони, проникність, глицерин, життєздатність.

Effect of several steps of ultra-rapid freezing in glycerol-sucrose medium on 8-cell mice embryo osmotic resistance and viability has been studied. It has been shown that the procedure of embryos treatment before freezing makes a determinant influence on final embryo survival. The different influence of one-step and two-step addition of the glycerol solutions to embryos on the transport parameters of their plasma membranes has been revealed. The possible mechanisms of detrimental effect of glycerol solutions of high concentrations on membrane structures of mouse embryos are discussed.

Key words: rapid freezing, embryos, permeability, glycerol, survival.

Витрификация внутриклеточной среды является необходимым условием обеспечения сохранности клеток как при медленном, так и быстром замораживании. При медленном замораживании она обеспечивается дегидратацией клеток в процессе внеклеточного кристаллообразования. Исключить внутриклеточное кристаллообразование при быстром замораживании можно дегидратацией клеток на этапе эквilibрации в высококонцентрированных смесях непроницающих и проникающих криопротекторов в сочетании с высокими скоростями охлаждения.

Intracellular medium vitrification is known to be the essential condition to provide the cell integrity at both slow and rapid cooling. At a slow one it is provided by cell dehydration during the process of extracellular crystal formation. It is possible to avoid intracellular crystal formation at a rapid freezing by cell dehydration at the stage of equilibration in highly concentrated mixtures of penetrating and non-penetrating cryoprotectants combined with high cooling rates.

To cryopreserve the mammalian early embryos there have been used strongly penetrating cryoprotectants such as glycerol, 1, 2-propanediol, ethylene

Адрес для корреспонденции: Смольянинова Е.И., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 772-88-71, факс: +38 (057) 772-00-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Address for correspondence: Smolyaninova E.I., Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the Natl. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +38 (057) 7721119, fax: +38 (057) 7720084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua.

Для криоконсервирования ранних эмбрионов млекопитающих применяются такие хорошо проникающие криопротекторы, как глицерин, 1,2-пропандиол, этиленгликоль, диметилсульфоксид в относительно высоких концентрациях [4, 5, 9, 11, 13]. Однако при использовании высоких концентраций криопротекторов предъявляются особые требования к процедурам их добавления и удаления. Скорости насыщения клеток криопротектором и его выхода на этапе отмывания от криозащитной среды зависят от коэффициентов проницаемости плазматических мембран для молекул воды и криозащитных веществ. Определение этих клеточных характеристик в экспериментах, моделирующих различные условия криоконсервирования, является теоретической основой для оптимизации его основных этапов.

В связи с вышеизложенным очевидна актуальность исследований осмотического поведения ооцитов и ранних эмбрионов млекопитающих в криозащитных средах и определения транспортных характеристик их плазматических мембран в условиях, моделирующих реальные криобиологические ситуации.

Особое значение в таких исследованиях имеет выяснение зависимости транспортных характеристик и плазматических мембран ранних эмбрионов млекопитающих как от вида и стадии развития эмбрионов [10], так и физико-химических свойств и концентрации криопротектора [3]. Зависимость коэффициентов проницаемости плазматических мембран клеток для молекул криопротекторов и воды от концентрации криозащитных веществ может привести к некорректной экстраполяции результатов, полученных для относительно малых концентраций (1,5 М) криопротекторов, на различные криобиологические ситуации с использованием высоких концентраций (3-6 М) криозащитных веществ [8].

Сопоставление данных осмотической устойчивости ранних эмбрионов млекопитающих в криозащитных средах различного состава с данными их сохранности после криоконсервирования представляет интерес как для выяснения механизмов устойчивости и чувствительности эмбрионов к факторам криоповреждения, так и поиска путей оптимизации отдельных этапов цикла криоконсервирования.

Цель работы – изучение влияния различных этапов криоконсервирования с использованием быстрого замораживания в глицерин-сахарозной среде на осмотическую устойчивость и жизнеспособность 8-клеточных эмбрионов мыши, а также исследование изменения транспортных параметров плазматических мембран эмбрионов

glycol, dimethyl sulfoxide at relatively high concentrations [4,5,9,11,13]. However when using high cryoprotectant concentrations there are the special requirements for their adding procedures and removal. Cell saturation rates with cryoprotectant and its release during washing-out of cryoprotective medium depend on the permeability coefficient of plasmatic membranes for aqueous molecules and cryoprotective substances. Determination of these cell characteristics in the experiments, modelling various cryopreservation conditions is the theoretical background for optimisation of its main steps.

According to the data mentioned above we consider to be obvious the actuality of studying the oocyte osmotic behaviour and early mammalian embryos in cryoprotective media, as well as the transport characteristics determination under the conditions of modelling the actual cryobiological events.

Revealing a dependence of the transport characteristics and plasmatic membranes in early mammal embryos is of a special value in these investigations [10], as well as physical and chemical properties and cryoprotectant concentration [3]. The coefficient dependence of plasmatic membrane cell permeability for aqueous molecules and the ones of cryoprotectants may lead to an incorrect extrapolation of the results obtained for the relatively low concentrations (1.5 M) of cryoprotectants, on various cryobiological events using high concentrations of cryoprotective substances (3-6 M) [8].

Comparison of the data of osmotic stability of early mammalian embryos in cryoprotective media of different composition with the data on their integrity following cryopreservation is of great interest both for revealing the mechanisms of the embryo stability and susceptibility to cryo-preservation factors, and searching the optimisation ways for certain stages of cryopreservation cycle.

The aim of the work was studying the effect of various cryopreservation stages using a rapid freezing under glycerol-sucrose medium on osmotic stability and 8-cell mice embryos' viability, as well as studying the change of transport parameters in embryos plasmatic membranes during the process of cell saturation with glycerol at its one- and two-step addition.

Materials and methods

The objects of the study were 8-cell embryos derived from mice females F1 (CBA×C57B1) of 6-8 gestation weeks which were subjected to the ovulation hormonal stimulation. Embryos were obtained by washing-out of the dissected oviducts and uterus horns with a warm physiological Dulbecco medium according to the standard method [1]. The cells were divided into 3 experimental groups and the control one.

в процессе насыщения клеток глицерином при его одно- и двухэтапном добавлении.

Материалы и методы

Объектом исследования служили 8-клеточные эмбрионы самок мышей F₁ (СВА×С57В1) 6-8 недель, подвергнутых гормональной стимуляции овуляции. Эмбрионы получали промыванием отпрепарированных яйцеводов и рогов матки теплой физиологической средой Дюльбекко по стандартной методике [1]. Клетки были разделены на 3 экспериментальные группы и 1 контрольную.

Был исследован метод быстрого замораживания [4, 5]. Эмбрионы 1-й (n=37) и 2-й (n=42) экспериментальных групп после предварительной эквilibрации в течение 10 мин в 10%-м растворе глицерина переносили в среду замораживания, состоящую из 30% глицерина и 70% 1 М раствора сахарозы. Эмбрионы выдерживали в этой среде 1,5 или 3 мин, после чего переносили в 0,5 М раствор сахарозы на 10 мин для удаления криопротектора. Эмбрионы 3-й группы (n=79) после 10-минутной эквilibрации в 10%-м растворе глицерина помещали в пластиковые соломинки, предварительно заполненные криозащитной средой, выдерживали при комнатной температуре 1,5 мин, затем погружали в жидкий азот. Длительность хранения соломинок в жидком азоте составляла 3-7 сут. Оттаивание выполняли в водяной бане (38°C). Для удаления криопротектора также использовали 10-минутную эквilibрацию в 0,5 М растворе сахарозы. После описанных процедур эмбрионы всех 3 экспериментальных групп трижды отмывали физиологической средой и переносили в CO₂-инкубатор для культивирования. Эмбрионы контрольной группы (n=44) помещали в CO₂-инкубатор непосредственно после их получения.

Уровень жизнеспособности эмбрионов оценивали по их развитию в условиях *in vitro* до стадии расширенной бластоцисты.

Методом световой микроскопии изучали осмотическое поведение 8-клеточных эмбрионов мыши в процессе их эквilibрации в 10%- и 30%-м растворах глицерина при одно- и двухэтапном добавлении. В результате были получены экспериментальные зависимости относительного объема отдельных клеток от времени эквilibрации в растворах глицерина. Коэффициенты проницаемости плазматических мембран эмбрионов для молекул воды (L_p) и криопротектора (K_p) определяли следующим образом. Экспериментальные значения относительных объемов клеток аппроксимировали численным решением уравнений неравновесной термодинамики [2] путем соответствующего подбора феноменологических коэффициентов, добиваясь наилучшего согласования

There has been studied a rapid freezing method [4,5]. The embryos of the 1st (n=37) and the 2nd (n=42) experimental groups after a 10 min preliminary equilibration in 10% glycerol solution were transferred into a freezing medium comprised 30% glycerol and 70% 1M sucrose solution. Embryos were kept at the medium for 1.5 or 3 min, then transferred into 0.5 M sucrose solution for 10 min in order to remove the cryoprotectant. The 3rd group embryos (n=79) after a 10 min equilibration at 10% glycerol solution were placed into plastic straws filled up preliminarily with a cryoprotective medium, maintained at room temperature within 1.5 min, then immersed into liquid nitrogen. Storage term of straws in liquid nitrogen made 3-7 days. Thawing was performed in water bath (38°C). To remove the cryoprotectant there was also used a 10-min equilibration in 0.5M sucrose solution. Following the procedures described the embryos of all three experimental groups were thrice washed-out with physiological medium, transferred into CO₂-incubator for culturing. Control group embryos (n=44) were placed into CO₂-incubator immediately after their procurement.

Rate of embryo viability was estimated by their development under *in vitro* conditions up to the stage of extended blastocyst.

By the method of light microscopy there was studied an osmotic behaviour of 8-cell mice embryos during their equilibration in 10%- and 30% glycerol solutions at one- and two-stage addition. As a result there have been obtained the experimental dependencies of a relative volume of some cells upon the time of their equilibration in glycerol solutions. Permeability coefficients of embryo plasmatic membranes for aqueous molecules (L_p) and cryoprotectant (K_p) there were evaluated as follows. Experimental values of relative cell volumes were approximated by numeric solving of the equations of non-equilibrium thermodynamics [2] by selecting the phenomenological coefficients, reaching the proper sequence of experimental dependence and theoretical curve.

The data statistical processing (on Student's criteria) was accomplished by final quantitative values of biophysical parameters obtained for some cells.

By the method of light microscopy there was investigated the embryo osmotic behaviour at the stages of glycerol adding, cell equilibration in a freezing medium and cryoprotectant removal.

Results and discussion

According to the data obtained (Fig.1), equilibration of 8-cell mice embryos in glycerol-sucrose medium (freezing medium) within 1.5 min does not affect significantly the embryo capability of developing in culture to the stage of extended blastocyst if compared with the control group (84.9 and 90.2%, correspondingly). The following freezing process also does not

экспериментальной зависимости и теоретической кривой.

Статистическую обработку данных (по критериям Стьюдента) осуществляли по конечным количественным значениям биофизических параметров, полученных для отдельных клеток.

Методом световой микроскопии исследовали осмотическое поведение эмбрионов на этапах добавления глицерина, эквilibрации клеток в среде замораживания и удаления криопротектора.

Результаты и обсуждение

Как следует из полученных данных (рис. 1), эквilibрация 8-клеточных эмбрионов мыши в глицерин-сахарозной среде (среда замораживания) в течение 1,5 мин не оказывает существенного влияния на способность эмбрионов развиваться в культуре до стадии расширенной бластоцисты по сравнению с контрольной группой (84,9 и 90,2% соответственно). Последующий процесс замораживания также не приводит к дальнейшему снижению уровня жизнеспособности (80,2%). Увеличение времени эквilibрации клеток в среде замораживания до 3 мин достоверно снижает уровень жизнеспособности эмбрионов (56,8%).

Следует отметить, что в процессе микроскопического наблюдения осмотического поведения 8-клеточных эмбрионов, подвергавшихся эквilibрации в растворе глицерина и криозащитной среде (в течение как 1,5, так и 3 мин) с последующим отмыванием в 0,5 М растворе сахарозы и физиологической среде, никаких морфологических нарушений клеток не наблюдалось (рис. 2).

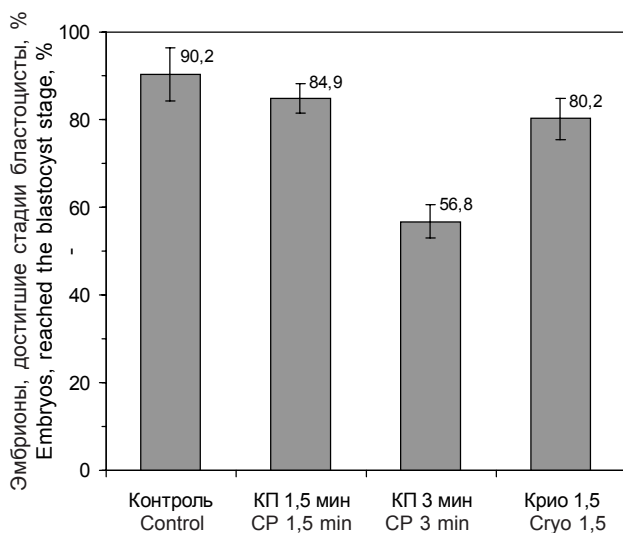


Рис. 1. Уровень жизнеспособности 8-клеточных эмбрионов мыши после инкубации в среде замораживания (КП) и полного цикла криоконсервирования (Крио).

Fig.1. Viability level of 8-cell mice embryos after the incubation in freezing medium (CP) and complete cryopreservation cycle (Cryo).

cause the further reduction of the viability rate (80.2%). The equilibration time rise of the cells in a freezing medium up to 3 min considerably decreases the level of embryo viability (56.8%).

It should be noted that during microscopic observation of 8-cell embryo osmotic behaviour, which were subjected to equilibration in glycerol solution and cryoprotective medium no morphological cell damages were noticed (Fig. 2).

Having supposed the embryonic plasmatic membrane to be the major target for the damaging factor effect, we studied the influence of the initial glycerol concentration and the method of its adding to cells on transport characteristics of plasmatic membranes of 8-cell mice embryos. There was studied the osmotic behaviour of mice embryos during their equilibration in 10% and 30% glycerol solutions at one- and two-step adding of the solutions mentioned (with 10-min interval).

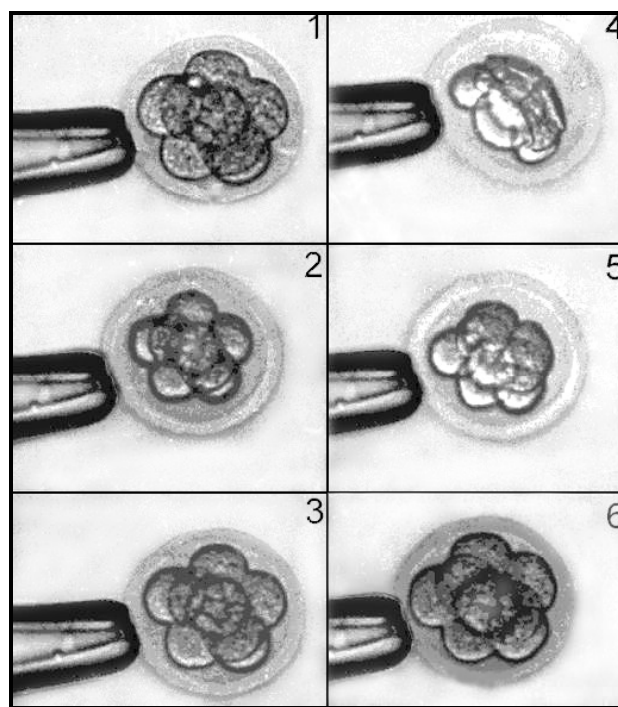


Рис. 2. Кинетика осмотического поведения 8-клеточного эмбриона мыши в процессе добавления и удаления криозащитной среды: 1 – натив; 2 – 2 мин экспозиции в 10%-м растворе глицерина; 3 – 9 мин экспозиции в 10%-м растворе глицерина; 4 – 1 мин в среде замораживания (30% глицерина и 70% 1 М раствора сахарозы); 5 – 9 мин 50 с экспозиции в отмывочной среде (0,5 М раствор сахарозы); 6 – 10 мин экспозиции в физиологической среде Дюльбекко.

Fig. 2. Kinetics of osmotic behaviour of 8-cell mice embryo when adding and removing the cryoprotective medium: 1 – native; 2 – 2 min exposure in 10% glycerol solution; 3 – 9 min exposure in 10% glycerol solution; 4 – 1 min under freezing medium (30% glycerol and 70% 1M sucrose solution); 5 – 9min 50 s of exposure under washing-out medium (0.5 M sucrose solution); 6 – 10 min exposure under physiological Dulbecco's medium.

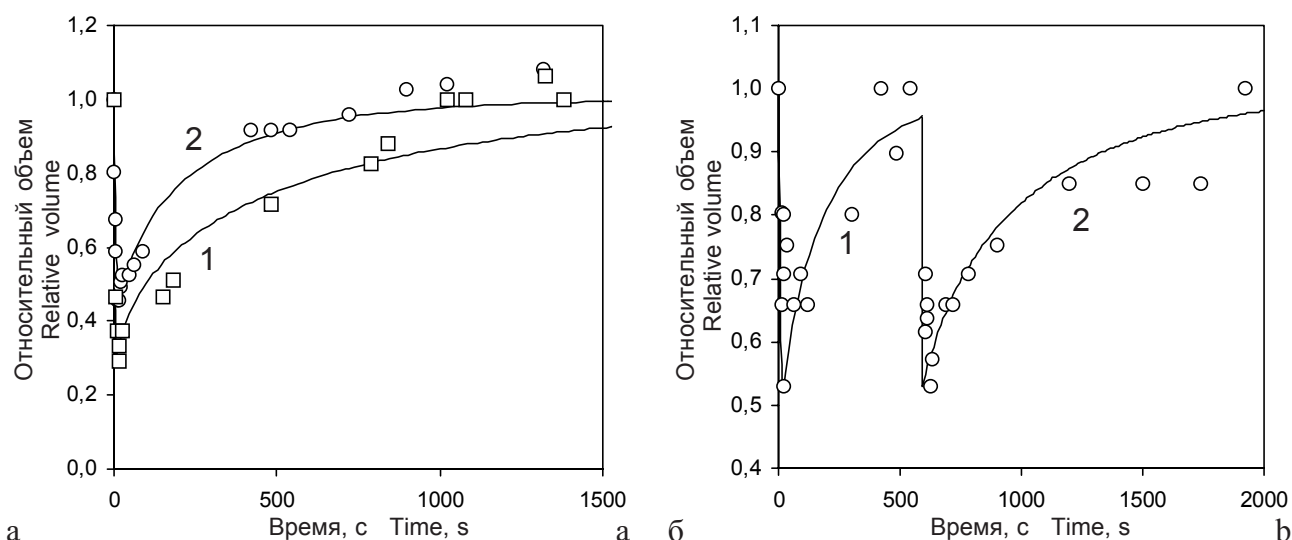


Рис. 3. Теоретические (—) и экспериментальные (○ и □) зависимости относительного объема 8-клеточного эмбриона мыши от времени эквilibрации при одноэтапном (а) и двухэтапном (б) добавлении растворов глицерина с концентрацией: 1 – 10%; 2 – 30%.

Fig. 3. Theoretical (—) and experimental (○ and □) relative volume dependences for 8-cell mice embryo upon equilibration time at one-step (a) and 2-step (b) addition of glycerol solutions with the following concentrations: 1 – 10%; 2 – 30%.

Предполагая, что плазматическая мембрана эмбрионов является основной мишенью для действия повреждающих факторов, мы исследовали влияние начальной концентрации глицерина и метода его добавления к клеткам на транспортные характеристики плазматических мембран 8-клеточных эмбрионов мыши. Было изучено осмотическое поведение эмбрионов мыши в процессе их эквilibрации в 10%- и 30%-х растворах глицерина при одно- и двухэтапном (с 10-минутным интервалом) добавлении указанных растворов.

На рис. 3 представлены экспериментальные и теоретические зависимости относительного объема 8-клеточного эмбриона мыши от времени эквilibрации в исследуемых растворах глицерина при одноэтапном (рис. 3, а) и двухэтапном (рис. 3, б) их добавлении. При одноэтапном добавлении увеличение исходной концентрации глицерина приводит к усилению степени сжатия клетки на этапе обезвоживания и к более длительному восстановлению исходного значения клеточного объема. При двухэтапном добавлении растворов глицерина указанных концентраций минимальные значения клеточного объема, фиксируемые на этапе обезвоживания, в обоих растворах практически одинаковы. Близки также и значения времени восстановления исходных значений клеточного объема.

В таблице приведены количественные значения коэффициентов проницаемости плазматических мембран 8-клеточных эмбрионов мыши для молекул воды и глицерина, определенные в указанных условиях. Как видно, значения транс-

Fig. 3 presents the experimental and theoretical dependencies of a relative volume of 8-cell mouse embryo upon the equilibration time in studied glycerol solutions under their one- (Fig. 3a) and two-step (Fig. 3b) adding. Under a one-step adding the rise of the glycerol initial concentration causes an increase of the level of cell shrinkage at the dehydration stage and longer recovery of the value of initial cell volume. At two-step adding of glycerol solutions of the mentioned concentrations the minimum values of cell volume being noted at the dehydration stage were nearly the same in both solutions. There were also similar the time parameters of the recovery of cell volume initial values.

The table presents the quantitative values for permeability coefficients of plasmatic membranes of 8-cell mice embryos for water and glycerol molecules, determined under the conditions mentioned. The values of the embryonic membrane transport parameters are noticed to be dependent upon the initial concentration of the cryoprotectant and the method of its adding to cells.

While a 1-step adding the values of permeability coefficients of embryo plasmatic membranes for glycerol molecules are significantly decreasing with the initial cryoprotectant concentration ($P < 0.05$). At two-stage adding of 10 and 30% solutions the values of this parameter determined in both solutions were practically the same. It should be noted that the method of glycerol addition did not significantly affect the coefficient values of embryonic membrane permeability for water molecules.

Analysis of the change dynamics of intracellular glycerol concentrations has demonstrated that cell saturation by cryoprotectant in 90-95% occurs during 1-2 min of embryo equilibration in the solutions studied.

портных параметров мембран эмбрионов зависят от начальной концентрации данного криопротектора и метода его добавления к клеткам.

При одноэтапном добавлении значения коэффициентов проницаемости плазматических мембран эмбрионов для молекул глицерина достоверно уменьшаются с увеличением начальной концентрации криопротектора ($P < 0,05$). При двухэтапном добавлении 10%- и 30%-х растворов глицерина значения этого параметра, определенные в обоих растворах, практически одинаковы. Следует отметить, что метод добавления глицерина не оказывал существенного влияния на значения коэффициентов проницаемости мембран эмбрионов для молекул воды.

Анализ динамики изменения внутриклеточных концентраций глицерина показал, что насыщение клеток криопротектором на 90-95% происходит практически в течение 1-2 мин эквипирации эмбрионов в исследуемых растворах. При двухэтапном добавлении процесс насыщения клеток глицерином в 30%-м растворе ускоряется по сравнению с одноэтапным (рис. 4, а, б). Поэтому 1,5-минутная эквипирация вполне достаточна для подготовки клеток к замораживанию быстрым методом.

Коэффициенты проницаемости плазматических мембран 8-клеточных эмбрионов мыши для молекул воды (L_p) и глицерина (K_p) в зависимости от начальной концентрации криопротектора ($T=20^\circ\text{C}$)

Permeability coefficients for plasmatic membranes of 8-cell mice embryos for water molecules (L_p) and glycerol (K_p) depending upon initial concentration of cryoprotectant ($T=20^\circ\text{C}$)

Начальная концентрация глицерина, % Initial concentration of glycerol, %	Одноэтапное добавление One – step adding		Двухэтапное добавление Two – step adding	
	$L_p \times 10^{14}, \text{M}^3/\text{H} \times \text{c}$ $L_p \times 10^{14}, \text{m}^3/\text{N} \times \text{s}$	$K_p \times 10^8, \text{M}/\text{c}$ $K_p \times 10^8, \text{m}/\text{s}$	$L_p \times 10^{14}, \text{M}^3/\text{H} \times \text{c}$ $L_p \times 10^{14}, \text{m}^3/\text{N} \times \text{s}$	$K_p \times 10^8, \text{M}/\text{c}$ $K_p \times 10^8, \text{m}/\text{s}$
10	$5,59 \pm 0,84$	$8,61 \pm 0,71^a$	$6,42 \pm 0,56$	$8,97 \pm 0,72^a$
30	$4,27 \pm 0,27$	$3,48 \pm 0,4^b$	$4,86 \pm 0,91$	$8,09 \pm 0,57^b$

Примечание: a:b – $p < 0,05$

Note: a:b – $p < 0.05$

At a two-stage adding the process of cell saturation by glycerol in 30% solution is accelerated comparing to the one-stage adding (Fig. 4 a, b). Therefore a 1.5-min equilibration is thought to be quite sufficient for cell preparing to a rapid freezing.

Thus our investigations showed that the viability of 8-cell mice embryos, cryopreserved at glycerol-sucrose medium using a rapid freezing was mainly determined by the term of cell equilibration in cryopreservation medium and the condition of the cryoprotectant addition.

The presence of high concentration of non-penetrating substance (sucrose) in a freezing medium does not allow to determine experimentally the transport characteristics of plasmatic membrane embryos and, correspondingly, dynamics of cell saturation with

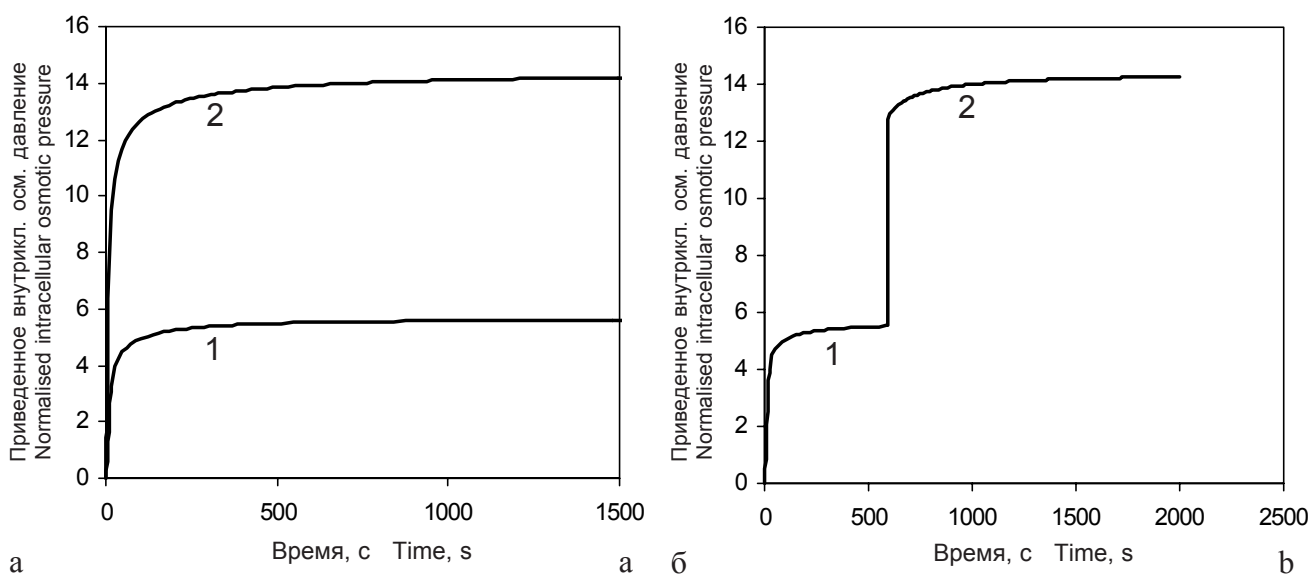


Рис. 4. Теоретические зависимости внутриклеточного осмотического давления криопротектора от времени эквипирации 8-клеточного эмбриона мыши при одноэтапном (а) и двухэтапном (б) добавлении растворов глицерина с концентрациями: 1 – 10%; 2 – 30%.

Fig. 4. Theoretical dependences of intracellular cryoprotectant osmotic pressure on equilibration time of 8-cell mice embryo at one-step (1) and two-step (b) addition of glycerol solutions with the following concentrations: 1 – 10%, 2 – 30%.

Таким образом, проведенные исследования показали, что жизнеспособность 8-клеточных эмбрионов мыши, криоконсервированных в глицерин-сахарозной среде с использованием быстрого замораживания, определяется, главным образом, длительностью эквilibрации клеток в среде криоконсервирования и условием добавления криопротектора.

Присутствие в среде замораживания высокой концентрации непроницающего вещества (сахарозы) не позволяет в эксперименте определить транспортные характеристики плазматических мембран эмбрионов и соответственно динамику насыщения клеток криопротектором. Судить об этой динамике можно по экспериментальному моделированию осмотического поведения эмбрионов мыши в гипертонических растворах глицерина в концентрациях, которые используются в данном методе криоконсервирования.

Исследованная нами зависимость транспортных характеристик плазматических мембран эмбрионов мыши от исходной концентрации глицерина и метода его добавления свидетельствует о пользе двухэтапного насыщения клеток нарастающими концентрациями глицерина. Уменьшение проницаемости плазматических мембран эмбрионов мыши для молекул глицерина с увеличением исходной концентрации криопротектора при одноэтапном добавлении к клеткам, по-видимому, связано с повышением уровня дегидратации, приводящему к уменьшению эффективной площади поверхности мембраны за счет образования дополнительных микроскладок. Подобная зависимость транспортных характеристик плазматических мембран эмбрионов от концентрации криозащитных веществ не является специфичной и наблюдается для других типов клеток [6]. Увеличение степени дегидратации и времени нахождения клеток в сильно обезвоженном состоянии повышает риск их повреждения в результате осмотического шока. Становится понятной необходимость 10-минутной эквilibрации эмбрионов мыши в 10%-м растворе глицерина перед переносом в среду замораживания [4].

Одним из преимуществ ступенчатого добавления криозащитного раствора к клеткам является снижение концентрационных градиентов, возникающих на плазматической мембране. Выравнивание количественных значений коэффициентов проницаемости плазматических мембран 8-клеточных эмбрионов мыши для молекул глицерина, определенных в 10%- и 30%-х растворах этого криопротектора при двухэтапном добавлении, свидетельствует о сохранении полупроницаемых

cryoprotectant. The dynamics can be evaluated by experimental modelling of mice embryo osmotic behaviour under glycerol hypertonic solutions at the concentrations used for this cryopreservation method.

The dependence of transport characteristics of mice embryos plasmatic membranes studied by us upon the initial glycerol concentration and method of its adding testifies the benefits of two-step cell saturation with increasing concentrations of glycerol. Decrease in the permeability of mice embryo plasmatic membranes for glycerol molecules with increasing the initial cryoprotectant concentration at one-step addition to cells is probably connected to the rise of dehydration level, that results in the fall of effective membrane surface square due to the formation of additional microfolds. Such a dependence of transport characteristics of embryo plasmatic membranes upon the concentration of cryoprotective substances is not specific one and observed for other cell types [6]. An increase of dehydration degree and time of cell maintenance at highly dehydrated state increases the risk of their damage as a result of osmotic shock. Now is getting clear the necessity of 10-min equilibration of mice embryos in 10% glycerol solution prior to the transfer into freezing medium [4].

One of the advantages of step-wise addition of cryoprotective solution to cells is known to be the reduction of concentration gradients, which appear in plasmatic membrane. Levelling the quantitative values for permeability coefficients of 8-cell mice embryo plasmatic membranes for glycerol molecules found in 10% and 30% solutions of this cryoprotectant at two-stage adding, testifies to keeping the semi-permeable properties of embryo plasmatic membranes and absence in membrane of osmotic stress-induced structural defects. No considerable effect of glycerol adding to embryos on the coefficient value of plasmatic membranes filtration of 8-cell mice embryos was found during the work, though when increasing the initial glycerol concentration there was observed the tendency to reducing the quantitative value of this parameter. This tendency remained both for one-stage and two-stage methods of adding the glycerol solutions.

The cause of the viability level reduction for 8-cell mice embryos when increasing equilibration time up to 3 min in freezing medium has remained to be unclear. The values of equilibration time studied in the work, were shown to be insufficient to manifest the glycerol toxic effect on cell structures. Cell damage in this case may be supposed to be stipulated by the increase of embryo maintenance at dehydrated state under the effect of high concentrations of the medium freezing components, that results in the impairments in the whole integrity and interactions of intracellular structures.

свойств плазматических мембран эмбрионов и отсутствии в мембране структурных дефектов, индуцированных осмотическим стрессом. В работе не было обнаружено достоверного влияния метода добавления глицерина к эмбрионам на значение коэффициента фильтрации плазматических мембран 8-клеточных эмбрионов мыши, хотя при увеличении начальной концентрации глицерина наблюдалась тенденция к снижению количественного значения этого параметра. Эта тенденция сохранялась как для одноэтапного, так и для двухэтапного методов добавления растворов глицерина.

Причина снижения уровня жизнеспособности 8-клеточных эмбрионов мыши при увеличении времени эквilibрации в среде замораживания до 3 мин остается не совсем понятной. Значения времени эквilibрации, изученные в нашей работе недостаточны для проявления токсичного влияния глицерина указанных концентраций за счет прямого химического воздействия на клеточные структуры. Можно предположить, что в этом случае повреждение клеток обусловлено увеличением длительности пребывания эмбрионов в дегидратированном состоянии под действием высоких концентраций компонентов среды замораживания, что приводит к нарушениям общей интегральной целостности и взаимодействий внутриклеточных структур.

Выводы

Таким образом, эффективность экспериментально-теоретического подхода к изучению конкретных условий криоконсервирования позволяет получить полезную информацию о факторах, действующих на клетки.

Продолжительность эквilibрации 8-клеточных эмбрионов мыши в среде замораживания, предшествующей прямому погружению клеток в жидкий азот, определяет конечную сохранность клеток. Кратковременное пребывание 8-клеточных эмбрионов мыши в высококонцентрированном растворе криоконсервирования сводит к минимуму токсичное влияние глицерина за счет химического воздействия на клеточные структуры. Ступенчатое добавление возрастающих концентраций криопротектора к клеткам позволяет сохранить избирательные свойства плазматических мембран. Снижение уровня жизнеспособности эмбрионов при увеличении длительности их эквilibрации в консервирующем растворе дают основание предположить, что основные повреждения клеток происходят на этапе дегидратации. В свою очередь это свидетельствует о преобладающем вкладе осмотического фактора в повреждение клеток при быстром замораживании.

Conclusions

Thus the efficacy of experimental theoretical approach to studying the certain cryopreservation conditions allows getting the important data about the cell-affecting factors.

The equilibration term for 8-cell mice embryos in a freezing medium, preceding the direct cell immersion into liquid nitrogen determines the final cell integrity. Short-term equilibration of 8-cell mice embryos in highly concentrated cryopreservation solution allows us to minimise the glycerol toxic effect due to a chemical effect on cell structures. Gradual addition of the increasing cryoprotectant concentrations to cells gives the possibility to keep selective plasmatic membrane properties. Viability level reduction in embryos when increasing the term of their equilibration at the preservation solution allows to suppose the major cell damages to occur at the stage of rehydration. It testifies in its turn to a predominating osmotic factor contribution into cell damage during a rapid freezing.

References

1. *Biology of mammals development*. Methods: Translated from English / Edited by M. Monk.— Moscow: Mir, 1990.— 406p.
2. Gordienko E.A., Pushkar N.S. Physical grounds for cell suspension low temperature preservation.— Kiev: Nauk. dumka, 1994.— 160p.
3. Gordienko E.A., Smolyaninova E.I., Kovalenko I.F. Determination and comparative studying of biophysical parameters for mice oocytes and embryos in aqueous solutions of penetrating cryoprotectants // *Problems of Cryobiology*.— 1998.— N2.— P.27-32.
4. Isachenko V.V., Grischenko V.I., Ostashko F.I. et al. Ultra-rapid freezing of rat and cow embryos with no "classical" equilibration // *Problems of Cryobiology*.— 1994.— N3.— P. 3-7.
5. Krivokharchenko A.S., Vilyanovich L.I., Serobyayn G.A. et al. Mice embryos viability after ultra-rapid freezing by different ways using various cryoprotectants // *Problemy reproduktivnoy biologii*.— 1995.— N4.— P. 13-17.
6. Kuleshova L.G., Gordienko E.A., Kovalenko I.F. Permeability of rat hepatocytes' plasmatic membranes for water molecules in non-isotonic medium of electrolytes // *Biophysical Bulletin*.— 2002.— N2(11).— P. 39-42.
7. Smolyaninova E.I., Khromenkova O.B., Zhernoklev G.V. Influence of different cryopreservation steps by the method of ultrarapid freezing on the osmotic stability and morphological integrity of mice embryos // *Problems of Cryobiology*.— 2001.— N2.— P.49-55.
8. Agca Y., Lin J. et al. Membrane permeability characteristics of metaphase II mouse oocytes at various temperatures in the presence of Me₂SO // *Cryobiology*.— 1998.— Vol.36.— P. 287-300.
9. Leibo S.P., Oda K. High survival of mouse zygotes and embryos cooled rapidly or slowly in ethylene glycol plus polyvinilpyrrolidone // *Cryo-Letters*.— 1993.— Vol.14.— P. 133-144.
10. Jascowsky C.S., Leibo S.P., Mazur P. Glycerol permeability of fertilized and unfertilized mouse ova // *J.Exp.Zool*.— 1980.— Vol.212.— P. 329-341.
11. Show J.W., Traunson A.O. Effect of dimethyl sulfoxide and protein concentration on the viability of two-cell mouse

Литература

1. *Биология развития млекопитающих*. Методы: Пер. с англ. / Под ред. М. Манк.– М.: Мир, 1990.– 406 с.
2. *Гордиенко Е.А., Пушкарь Н.С.* Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий.– Киев: Наук. думка, 1994.– 160 с.
3. *Гордиенко Е.А., Смольянинова Е.И., Коваленко И.Ф.* Определение и сравнительное изучение биофизических параметров ооцитов и эмбрионов мыши в водных растворах проникающих криопротекторов // Пробл. криобиологии.– 1998.– №2.– С.27-32.
4. *Исаченко В.В., Грищенко В.И., Осташко Ф.И. и др.* Сверхбыстрое замораживание эмбрионов крыс и коров без “классической” эквипирации // Пробл. криобиологии.– 1994.– №3.– С. 3-7.
5. *Кривохарченко А.С., Вильянович Л.И., Серобян Г.А. и др.* Выживаемость эмбрионов мыши после сверхбыстрого замораживания разными способами с использованием различных криопротекторов // Пробл. репродукции.– 1995.– №4.– С. 13-17.
6. *Кулешова Л.Г., Гордиенко Е.А., Коваленко И.Ф.* Проницаемость плазматических мембран гепатоцитов крысы для молекул воды в неизотонической среде электролитов // Біофізичний вісник.– 2002.– №2(11).– С.39-42.
7. *Смольянинова Е.И., Хроменкова О.Б., Жерноклев Г.В.* Влияние различных этапов криоконсервирования методом сверхбыстрого замораживания на осмотическую устойчивость и морфофункциональную сохранность эмбрионов мыши // Пробл. криобиологии.– 2001.– №2.– С. 49-55.
8. *Agca Y., Lin J. et al.* Membrane permeability characteristics of metaphase II mouse oocytes at various temperatures in the presence of Me₂SO // Cryobiology.– 1998.– Vol.36.– P. 287-300.
9. *Leibo S.P., Oda K.* High survival of mouse zygotes and embryos cooled rapidly or slowly in ethylene glycol plus polyvinylpyrrolidone // Cryo-Letters.– 1993.– Vol.14.– P. 133-144.
10. *Jascowsky C.S., Leibo S.P., Mazur P.* Glycerol permeability of fertilized and unfertilized mouse ova // J.Exp.Zool.– 1980.– Vol.212.– P. 329-341.
11. *Show J.W., Trounson A.O.* Effect of dimethyl sulfoxide and protein concentration on the viability of two-cell mouse embryos frozen with a rapid freezing technique // Cryobiology.–1989.– Vol.26.– P. 413-421.
12. *Toupin C.J., Le Maguer M., McGann L. E.* Permeability of human granulocytes to dimethyl sulfoxide // Cryobiology.– 1989.– Vol.26.– P. 422-430.
13. *Trounson A.O., Peure A., Kirby C.* Ultrarapid freezing: a new low cost and effective method of embryo cryopreservation // Fertil. Steril.– 1987.– Vol.48.– P. 1121-1128.

Accepted in 25.11.2003

Поступила 25.11.2003