

УДК 577.352.462:57.085.2:615.014.41

UDC 577.352.462:57.085.2:615.014.41

Прогнозирование осмотического поведения эмбрионов мыши на основных этапах криоконсервирования

О.В. Пишко, Е.И. Смольянинова, И.Ф. Коваленко, С.Е. Коваленко, Л.Ф. Розанов
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Forecasting of Murine Embryo Osmotic Behaviour at Main Stages of Cryopreservation

O.V. PISHKO, E.I. SMOLYANINOVA, I.F. KOVALENKO, S.E. KOVALENKO, L.F. ROZANOV
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov

Определены транспортные характеристики зигот, 2- и 8-клеточных эмбрионов мыши. На основании полученных коэффициентов проницаемости и соответствующих геометрических параметров клеток было проведено моделирование осмотического поведения клеток на этапах добавления криопротектора к эмбрионам, замораживания эмбрионов с различными скоростями охлаждения и удаления криопротектора из клеток.

Ключевые слова: эмбрион, этиленгликоль, осмотическая реакция, коэффициент проницаемости.

Визначено транспортні характеристики зигот, 2- та 8-клітинних ембріонів миші. На основі отриманих коефіцієнтів проникності і відповідних геометричних параметрів клітин було проведено моделювання осмотичної поведінки клітин на етапах додавання криопротектора до ембріонів, заморожування ембріонів з різними швидкостями охолодження та видалення криопротектора з клітин.

Ключові слова: ембріон, етиленгліколь, осмотична реакція, коефіцієнт проникності.

There were determined the transport characteristics for zygotes, 2- and 8-cell murine embryos. Basing on the obtained permeability coefficients and corresponding geometric cell parameters the modelling of cell osmotic behaviour at the stages of cryoprotectant adding to embryos, as well as at the stages of embryo freezing with different cooling rates and cryoprotectant removal out of cells, was carried-out.

Key-words: embryo, ethylene glycol, osmotic reaction, permeability coefficient.

Успех криоконсервирования во многом определяется осмотическим поведением клеток на основных его этапах, которое зависит от степени согласования применяемых процедур с транспортными характеристиками плазматических мембран криоконсервируемых клеток и их геометрическими параметрами.

Физико-математическая модель, достаточно адекватно описывающая осмотическое поведение изолированных клеток [2] на основных этапах криоконсервирования, включает коэффициенты проницаемости для воды (L_p) и криопротектора (K_p), а также наиболее существенные клеточные геометрические параметры: поверхностно-объемное отношение клетки ($\gamma=S_0/V_0$) и относительный осмотически неактивный объем ($\alpha=V_\alpha/V_0$, где V_0 – объем интактной клетки). Основными решениями уравнений, описывающих поведение клеток на этапах добавления и удаления криопротектора при известных L_p и K_p , являются: зависи-

Successful cryopreservation is largely determined by cell osmotic behaviour at its main stages, depending on the coordination degree of applied procedures with transport characteristics of plasmatic membranes in cryopreserved cells and their geometric parameters.

Physical and mathematical model, describing adequately an osmotic behaviour of isolated cells [2] at the main stages of cryopreservation, comprises the permeability coefficients for water (L_p) and cryoprotectant (K_p), as well as the most significant geometric cell parameters: surface-volume cell ratio ($\gamma=S_0/V_0$) and relative osmotic inactive volume ($\alpha=V_\alpha/V_0$, where V_0 is the intact cell volume). The main solutions of theoretic equations, describing cell behaviour at the stages of cryoprotectant addition and removal at known L_p and K_p are as follows: $y(t)=V/V_0$ is the dependency on time of a relative cell volume; $\pi_1^{in}(t)$ is that for cryoprotectant concentrations and $\pi_2^{in}(t)$ for non-penetrating osmotically active substances in a cell. When modeling the freezing stage

Адрес для корреспонденции: Смольянинова Е.И., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. 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&Cryomedicine of the Natl. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.:+380 57 772 8871, fax: +38 (057) 7720084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

мость относительного клеточного объема от времени $y(t)=V/V_0$; зависимости от времени концентраций криопротектора и непроникающих осмотически активных веществ в клетке $\pi_1^{in}(t)$ и $\pi_2^{in}(t)$. При моделировании этапа замораживания решениями становятся зависимости $y(T)$, $\pi_1^{in}(T)$ и $\pi_2^{in}(T)$ от температуры. Такие зависимости достаточно несложно получить для линейных и экспоненциальных режимов охлаждения.

Анализ осмотического поведения клеток при различных процедурах криоконсервирования позволяет определять наиболее оптимальные условия насыщения клеток криопротектором и его удаления из клеток, согласовывать процедуру экспозиции клеток в растворе криопротектора с их последующим замораживанием.

Цель исследования – определение транспортных характеристик зигот, 2- и 8-клеточных эмбрионов мыши и прогнозирование их осмотического поведения при криоконсервировании.

Материалы и методы

Эмбрионы мыши получали по стандартной методике от самок мышей линии СВА, подвергавшихся суперовуляции [1]. Эмбрионы разных стадий развития выделяли через определенные интервалы времени после инъекции чХГ путем промывания отпрепарированных яйцеводов физиологической средой Дюльбекко. Для приготовления растворов криопротектора также использовали данную среду. Экспериментальные исследования осмотических реакций эмбрионов мыши проводили методом световой микроскопии (МБИ-13) при температуре $19\pm 1^\circ\text{C}$, регистрируя получаемые микроскопические изображения на киноплёнку. Эмбрионы в капле физиологической среды помещали в кювету, установленную на предметном столике микроскопа. Для предотвращения смещения (потери) объекта в момент смены внеклеточной среды эмбрион фиксировали в поле зрения микроскопа с помощью микроприсоски. После съёмки исходного состояния эмбриона в кювету добавляли 10%-й раствор этиленгликоля (ЭГ), приготовленный на среде Дюльбекко в объеме, в 20 раз превышающем объем внеклеточной среды.

Сопоставляя экспериментальную зависимость $y(t)$ с теоретической, методом наименьших квадратов определяли коэффициенты проницаемости для воды и ЭГ при одно- и двухэтапном добавлении криопротектора. Определение L_p и k_p проводили в два этапа. Аппроксимация участка кривой $y(t)$, соответствующего фазе дегидратации клеток адекватным, решением уравнений позволяет определить значение L_p . На этом участке значения k_p меньше реальных, так как потоку

the $y(T)$, $\pi_1^{in}(t)$ and $\pi_2^{in}(t)$ dependencies on temperature become the solutions. This is quite simple to obtain such dependencies for linear and exponential cooling regimens.

The analysis of cell osmotic behaviour under different cryopreservation procedures permits to determine the most optimal conditions for cell saturation with cryoprotectant and its removal out of cells, to coordinate the procedure of cell exposure in cryoprotectant solution with their following freezing.

The investigation aim was to determine the transport characteristics in zygotes, 2- and 8-cell murine embryos and to forecast their osmotic behaviour during cryopreservation.

Materials and methods

Murine embryos were procured according to the standard methods from CBA murine female, subjected to superovulation [1]. The embryos of different development stages were procured in the certain time interval after hCH injection by washing the prepared oviducts with Dulbecco physiological solution. This Dulbecco medium was also used for cryoprotectant solution preparation. Experimental investigation of murine embryo osmotic reactions was performed with light microscopy (with MBI-13 microscope) under the temperature of $19\pm 1^\circ\text{C}$ with recording the obtained microscopic images on film camera. The embryos in a physiological medium drop were placed into the flask, set on an object table. In order to prevent the shift (loss) of an object in the moment of extracellular medium change, the embryo was fixed in a visual field of microscope by means of micropipette. After filming the initial state of an embryo, the 10% ethylene glycol (EG) solution, prepared on Dulbecco medium in the volume, 20 times exceeded the extracellular medium one, was added into the flask. When comparing an experimental dependency $y(t)$ with the theoretic one using the least square method we determined the permeability coefficients for water, EG at one- and two-stage cryoprotectant addition. The determination of L_p and K_p was performed in two stages. L_p was determined when approximating by an adequate solution of theoretic equations the $y(t)$ curve site, corresponding to the cell dehydration phase. At this site the K_p values are lower than the real ones, as an opposite water flow interferes the cryoprotectant one into a cell. The real K_p values were found out by approximating the curve site $y(t)$ by the equation solution, describing the cell rehydration phase. At the same time the L_p values, obtained as a result of the first approximation, were inserted into the model.

The analysis of the murine embryos' osmotic behaviour at the main cryopreservation stages was carried-out by inserting into the model the found out

криопротектора внутрь клетки препятствует встречный поток воды. Истинные значения k_p находили, аппроксимируя решением уравнений участок кривой $y(t)$, описывающий фазу регидратации клетки. При этом в модель подставляли значения L_p , полученные в результате первой аппроксимации.

Анализ осмотического поведения эмбрионов мыши на основных этапах криоконсервирования проводили, подставляя в модель найденные коэффициенты проницаемости и параметры, соответствующие заданным условиям эксперимента.

Результаты и обсуждение

Полученные экспериментальные зависимости $y(t)$, описывающие изменение относительного объема бластомеров зигот, 2- и 8-клеточных эмбрионов в 10%-м растворе ЭГ, представляют собой двухфазные кривые. Объем клеток быстро уменьшается за счет осмотического оттока воды, затем постепенно восстанавливается по мере проникновения криопротектора в клетку, сопровождаемого потоком воды, поддерживающим осмотическое равновесие. В таблице приведены полученные нами значения коэффициентов проницаемости зигот, 2- и 8-клеточных эмбрионов мыши для воды L_p и ЭГ k_p .

Используя полученные коэффициенты проницаемости и соответствующие геометрические параметры клеток, мы моделировали осмотическое поведение клеток на этапах добавления криопротектора к эмбрионам, замораживания эмбрионов с различными скоростями охлаждения и удаления криопротектора из клеток.

Кривая 1 на рис. 1 иллюстрирует прогнозируемое изменение объема зигот при последовательной смене растворов (10%→30%) на этапе добавления ЭГ. На рис. 2 представлена соответствующая динамика изменения внутриклеточной концентрации криопротектора.

Результаты моделирования показывают, что время восстановления клеточного объема на первом и втором этапах добавления криопротектора значительно превышает период эффективного насыщения клеток ЭГ.

Важно отметить, что после добавления как 10%-го, так и 30%-го раствора ЭГ уровень дегидратации клеток заметно снижается уже в течение первых 5 мин. Для сохранения дегидратированного состояния клеток перед быстрым замораживанием необходимо использовать на втором этапе добавления ЭГ непроникающую добавку

permeability coefficient and the parameters, corresponding to the fixed experimental conditions.

Results and discussion

The obtained experimental dependencies $y(t)$, describing the change in a relative volume of zygotes, 2- and 8-cell embryo blastomeres in 10% EG solution, represent the two-phase curves. There is a rapid reduction in cell volume due to an osmotic water outflux, then it gradually recovers as far as a cryoprotectant penetrates into a cell, that is accompanied with water flow, supporting an osmotic balance. Table shows the obtained by us values of permeability coefficients for zygotes, 2- and 8-cell murine embryos for water L_p and ethylene glycol K_p . When using the obtained permeability coefficients and the corresponding geometric cell parameters we modelled an osmotic cell behaviour at the stages of cryoprotectant addition to embryos, freezing of embryos with different cooling rates and cryoprotectant removal out of cells.

Fig. 1 curve demonstrates a forecasted change in zygote volume during a successive change of solutions (10%→30%) at the stage of EG addition. Fig. 2 shows the corresponding dynamics of change in cryoprotectant intracellular concentration.

The results of modelling show that the time for cell volume recovery at the first and second stages of cryoprotectant addition considerably exceeds the period of an efficient cell saturation with EG.

Of note is, that after adding both 10% and 30% EG solution the level of cell dehydration considerably decreases even within the first 5 minutes. In order to keep a dehydrated cell state prior to rapid freezing it is necessary to use a non-penetrating additive: 750 mOsm (Fig. 1, curve 3), for example 70% 1M sucrose at the second stage of EG addition [3].

The results of an osmotic behaviour forecasting for 8-cell murine embryos at freezing with different cooling rates at the presence of 10% EG solution when using

Коэффициенты проницаемости мембран эмбрионов мыши разных стадий развития для воды (L_p) и ЭГ (k_p)
Membrane permeability coefficients for murine embryos of different development stage for water (L_p) and EG (k_p)

Стадии развития Stages of development	Средние размеры бластомеров, мкм Average size of blastomeres, μm	$L_p \times 10^{14}$, м ³ /Н·с $L_p \times 10^{14}$, m ³ /N·s	$k_p \times 10^7$, м/с $k_p \times 10^7$, m/s
Зигота Zygote	62±5	4,26±0,78	1,12±0,6
Двухклеточный эмбрион 2-cell embryo	48±3	3,43±0,17	1,25±0,1
Восьмиклеточный эмбрион 8-cell embryo	32±2	2,44±0,20	0,64±0,3

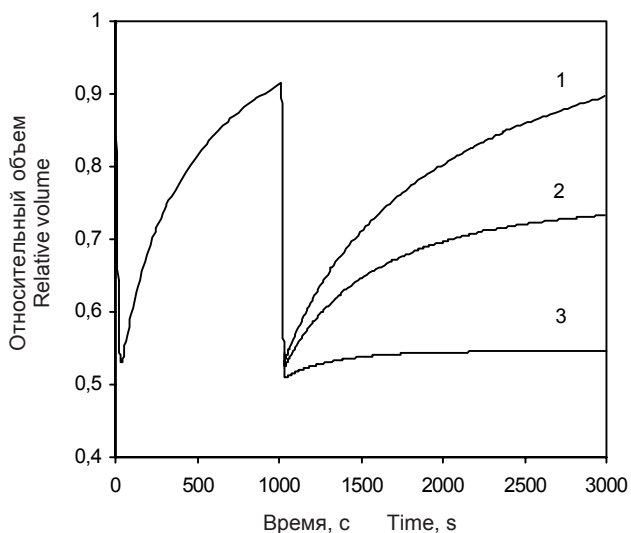


Рис. 1. Изменение относительного объема зиготы при 2-этапном добавлении (10%→30%) ЭГ (1) и в присутствии на втором этапе непроникающей добавки 450 мОсм (2) и 750 мОсм (3) от времени экспозиции.

Fig. 1. Exposition time dependent changes in relative volume of zygote during 2-stage addition (10%→30%) of EG (1), and in presence of non-penetrating additive of 450 mOsm (2) and 750 mOsm (3) on the 2nd stage.

~750 мОсм (рис 1, кривая 3), например 70% 1М сахарозы [3].

Результаты прогнозирования осмотического поведения 8-клеточных эмбрионов мыши при замораживании с различными скоростями охлаждения в присутствии 10%-го раствора ЭГ с использованием линейных режимов охлаждения представлены на рис.3. Как следует из приведенных данных эффективная дегидратация 8-клеточ-

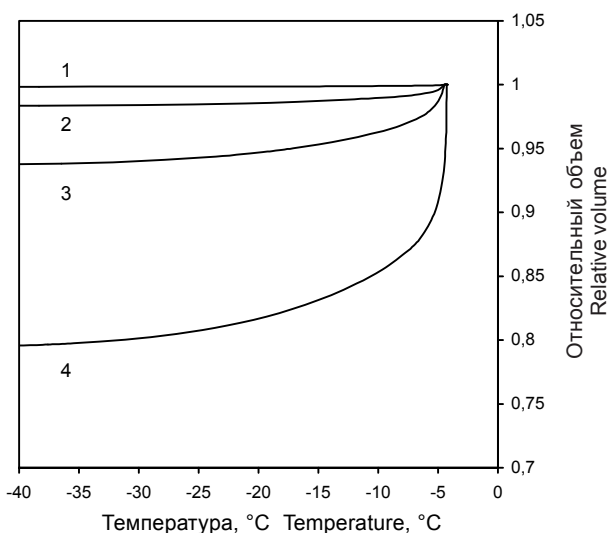


Рис. 3. Осмотическое поведение 8-клеточных эмбрионов мыши при замораживании с различными скоростями охлаждения, °C/мин: 1 – 100; 2 – 10; 3 – 2,5; 4 – 1.

Fig. 3. Osmotic behaviour of 8-cell murine embryos at freezing with different cooling rates, °C/min: 1 – 100; 2 – 10; 3 – 2.5; 4 – 1.

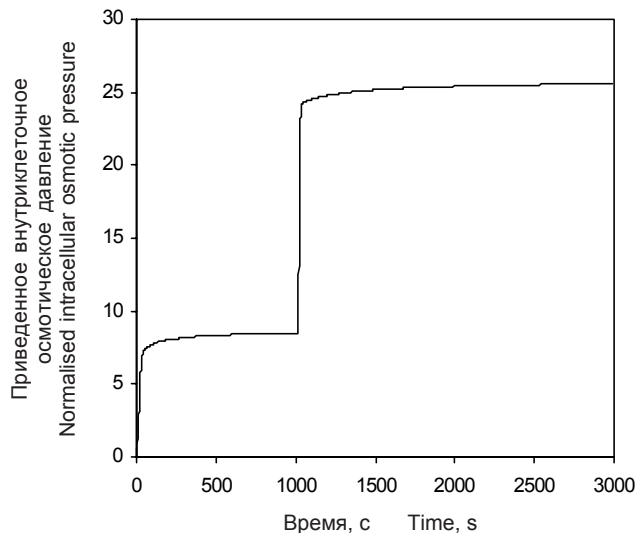


Рис. 2. Изменение приведенного внутриклеточного осмотического давления проникающего криопротектора при двухэтапном добавлении (10%→30%) ЭГ от времени экспозиции.

Fig. 2. Exposition time dependent changes of normalised intracellular osmotic pressure of penetrating cryoprotectant under 2-stage addition (10%→30%) of EG.

the linear cooling regimens are presented in the Fig.3. As it follows from the data shown an efficient dehydration of 8-cell murine embryos (and, consequently, the prevention of intracellular crystal formation) is possible in case of the linear freezing regimens only under cooling rates lower than 1°C/min.

The Fig. 4 presents the dependencies for a relative volume in murine embryos of different development stage on temperature at cooling with 1°C/min rate.

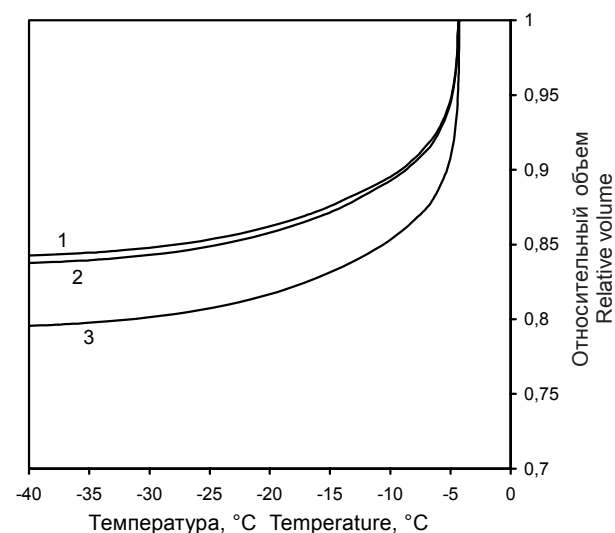


Рис.4. Осмотическое поведение эмбрионов мыши различной стадии развития при охлаждении со скоростью 1°C/мин: 1 – зигота; 2 – 2-клеточный; 3 – 4-клеточный.

Fig.4. Osmotic behaviour in murine embryos of different development stage at cooling with 1°C/min rate: 1 – zygote; 2 – 2-cell embryo; 3 – 8-cell embryo.

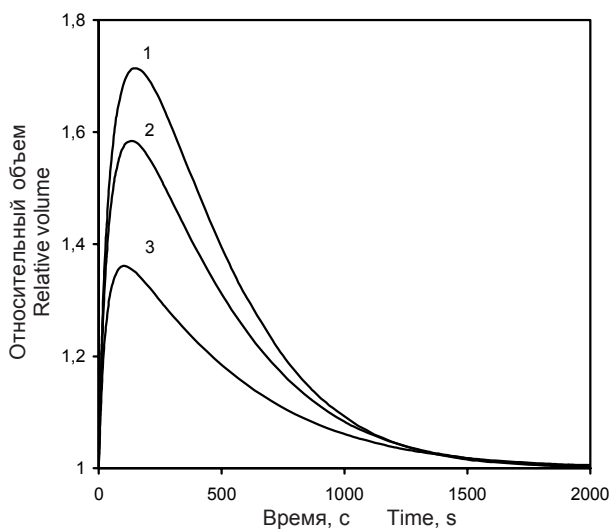


Рис. 5. Осмотическое поведение 2-клеточных эмбрионов мыши на этапе удаления криопротектора. Концентрация ЭГ в клетке 10%. Осмотическое давление, обусловленное непроникающей добавкой в растворе, мОсм: 1 – 300; 2 – 540; 3 – 1075.

Fig. 5. Osmotic behaviour of 2-cell murine embryos at the stage of cryoprotectant removal. EG concentration in a cell is 10%. Osmotic pressure provided by the non-penetrating additive in the solution, mOsm: 1 – 300; 2 – 540; 3 – 1075.

ных эмбрионов мыши (и, следовательно, предотвращение внутриклеточного кристаллообразования) возможна в случае линейных режимов замораживания только при скоростях охлаждения ниже 1°C/мин.

На рис. 4 представлены зависимости относительного объема эмбрионов мыши различной стадии развития от температуры при охлаждении со скоростью 1°C/мин. С увеличением степени дробления эмбрионов мыши скорость их обезвоживания при замораживании возрастает, что позволяет использовать более высокие скорости охлаждения с меньшим риском возникновения внутриклеточной кристаллизации.

Результаты прогнозирования осмотического поведения 2-клеточных эмбрионов мыши на этапе удаления криопротектора из клеток представлены на рис. 5 и 6. Как видно из расчетных данных, концентрация непроникающей добавки в среде отмывания, эффективно предотвращающей чрезмерное набухание клеток, должна быть тем выше, чем большую концентрацию криопротектора содержит клетка.

Выводы

Таким образом, результаты проведенного моделирования подтверждают необходимость применять на втором этапе добавления ЭГ перед быстрым замораживанием непроникающую добавку в концентрации ~750 мОсм. Меньшая эффективность применения медленных режимов

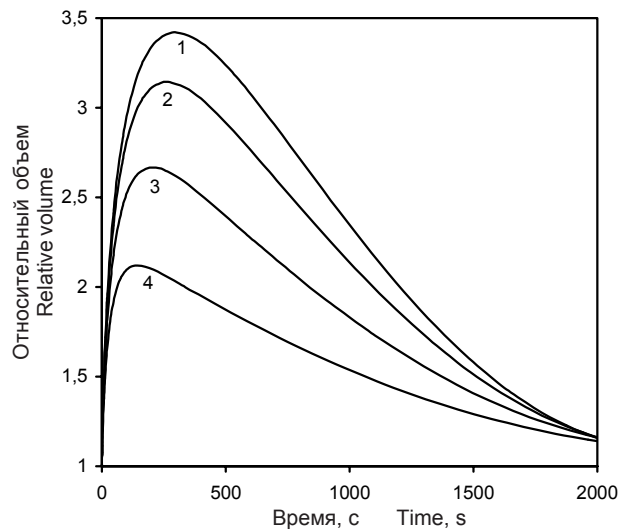


Рис. 6. Осмотическое поведение 2-клеточных эмбрионов мыши на этапе удаления криопротектора. Концентрация ЭГ в клетке 30%. Осмотическое давление непроникающей добавки в растворе, мОсм: 1 – 300; 2 – 540; 3 – 1075; 4 – 2000.

Fig. 6. Osmotic behaviour of 2-cell murine embryos at the stage of cryoprotectant removal. EG concentration in a cell is 30%. Osmotic pressure provided by the non-penetrating additive in the solution, mOsm: 1 – 300; 2 – 540; 3 – 1075; 4 – 2000.

With an augmentation of fission rate in murine embryos the rate of their dehydration at freezing increases as well, that allows to use higher cooling rates with a less risk of the intracellular crystallisation appearance.

The forecasting results of an osmotic behaviour in 2-cell murine embryos at the stage of cryoprotectant removal out of cells are presented in the Fig.5 and 6. The calculating data demonstrate that the concentration of a non-penetrating additive into the washing-out medium, efficiently preventing an exceeded cell swelling, should be the higher, the bigger cryoprotectant concentration is in a cell.

Conclusions

Thus, the results of performed modelling confirm the necessity to apply a non-penetrating additive in 750 mOsm concentration at the second stage of EG addition prior to a rapid freezing. Lower efficiency of slow regimen application when freezing 2-cell embryos and zygotes (in comparison with 8-cell embryos) can be related to their slower dehydration during freezing due to a less surface-volume blastomere ratio. The results of theoretic calculations testify to the fact that the stage of washing-out from a cryoprotectant is the most critical during cryopreservation.

References

1. *Biology of mammalian development*. Methods: Translated from English/Edited by M. Mank.– Moscow: Mir, 1990.– 406 p.

при замораживании 2-клеточных эмбрионов и зигот (по сравнению с 8-клеточными эмбрионами) может быть связана с их более медленным обезвоживанием в процессе замораживания из-за меньшего поверхностно-объемного отношения blastomeres. Результаты теоретических расчетов свидетельствуют, что этап удаления криопротектора является наиболее критичным в процессе криоконсервирования.

2. *Gordienko E.A., Pushkar N.S.* Physical grounds of low temperature preservation.– Kiev: Naukova Dumka, 1994.– 141 p.
3. *Smolyaninova E.I., Khromenkova O.B., Zhernoklev G.V.* Influence of various steps of by a method of ultra-rapid freezing on osmotic resistance and morphofunctional integrity of mouse embryos // Problems of Cryobiology.– 2001.– N2.– P. 49-55.

Accepted in 2.06.2004

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.– Киев: Наук. думка, 1994.– 141 с.
3. *Смолянинова 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.

Поступила 2.06.2004