

УДК 577.352.462/464:57.089.32:547.422

UDC 577.352.462/464:57.089.32:547.422

Проницаемость мембран ооцитов и эмбрионов мыши для молекул 1,2-пропандиола и повреждающее действие его концентрированных растворов

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

Membrane Permeability of Murine Oocytes and Embryos for 1,2-Propane Diol and Damaging Effect of its Concentrated Solutions

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

Определены коэффициенты проницаемости плазматических мембран ооцитов, одно-, двух- и восьмиклеточных эмбрионов мыши для молекул 1,2-пропандиола (1,2-ПД) и воды. Показано, что оплодотворение и стадия развития эмбриона не влияют на транспортные характеристики клеточных мембран.

Ключевые слова: ооцит, эмбрион, 1,2-пропандиол, осмотическое поведение, коэффициент проницаемости.

Визначено коефіцієнти проникності плазматичних мембран ооцитів, одно-, дво- та восьмиклітинних ембріонів миші для молекул 1,2-пропандіолу та води. Показано, що запліднення та стадія розвитку не впливають на транспортні характеристики клітинних мембран.

Ключові слова: ооцит, ембріон, 1,2-пропандіол, осмотична поведінка, коефіцієнт проникності.

The permeability coefficients of plasma membranes of oocytes, 1-, 2- and 8-cell murine embryos for 1,2-propane diol (1,2-PD) and water molecules were determined. The fertilisation and embryo development stage were shown as not affecting the transport characteristics of cell membranes.

Key-words: oocyte, embryo, 1,2-propane diol, osmotic behaviour, permeability coefficient.

Проницаемость плазматических мембран для ионов и неэлектролитов является важнейшим биофизическим параметром клеток, определяющим их электрические, объеморегуляторные и многие другие функциональные свойства [6].

При низкотемпературном консервировании проникновение в клетку внеклеточных ионов в результате нарушений мембранной проницаемости внутриклеточным льдообразованием или дегидратацией сопряжено с набуханием и гибелью клеток. Зная коэффициенты проницаемости для криопротекторов и воды, можно контролировать изменение объема клетки на основных этапах криоконсервирования, чтобы избежать повреждающего действия как внутриклеточной кристаллизации, так и дегидратации.

Проникающий криопротектор 1,2-ПД широко применяется для криоконсервирования эмбрионов различных видов животных [4, 8, 10, 11]. Он является одним из наиболее эффективных криопротекторов, используемых при витрификации

Plasma membrane permeability for ions and non-electrolytes is known to be the most important biophysical parameter, which determines cell electrical, volume regulatory and many other functional properties [6].

During low temperature preservation an extracellular penetration of ions inside a cell as a result of membrane permeability impairments by either ice-formation or dehydration causes cell swelling and death. Being aware of the permeability coefficients for cryoprotectants and water we are able to control cell volume at basic cryopreservation steps in order to avoid the damaging effect of both intracellular crystallization and dehydration.

1,2-propane diol permeating cryoprotectant (1,2-PD) is widely used for embryo cryopreservation of various animal species [4, 8, 10, 11], and it is known to be one of the most effective cryoprotectants used for vitrification of different biological objects vitrification [5, 9]. However the data on frozen-thawed embryo viability after being treated with this cryo-

Адрес для корреспонденции: Пишко О.В., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 772-01-26, факс: +38 (057) 772-00-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Address for correspondence: Pishko O.V., Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the Natl. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 772 0126, fax: +380 57 772 0084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

различных биологических объектов [5,9]. Однако данные по жизнеспособности деконсервированных эмбрионов после обработки их этим криопротектором весьма разноречивы, поэтому исследования, направленные на изучение осмотических реакций ооцитов и эмбрионов в растворах 1,2-ПД, а также его исследование транспорта через плазматическую мембрану клеток могут предоставить дополнительную информацию о влиянии различных этапов криоконсервирования на сохранность и жизнеспособность эмбрионов.

Цель работы – изучить на модели неоплодотворенная яйцеклетка-зигота-2-клеточный эмбрион-8-клеточный эмбрион влияние оплодотворения и стадии развития на проницаемость плазматических мембран эмбрионов для воды и 1,2-ПД.

Материалы и методы

Неоплодотворенные яйцеклетки (ооциты) и эмбрионы мыши получали от самок мышей линии СВА со стимуляцией суперовуляции по стандартной методике [1]. В работе использовали 10%, 20%, 30%-е (объем/объем) растворы 1,2-ПД, приготовленные на физиологической среде Дюльбекко. Кинетику осмотической реакции бластомеров на добавление исследуемого раствора изучали методом световой микроскопии при помощи микроскопа БМИ-13, с последующим анализом фотографических изображений клеток. Исследования проводили при температуре $19 \pm 1^\circ\text{C}$. Коэффициенты проницаемости для молекул криопротектора (k_p) и воды (L_p) определяли при помощи физико-математической модели Kedem-Katchalsky [2].

Эксперименты проведены в соответствии с положениями “Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей” (Страсбург, 1985).

Результаты и обсуждение

Установлено, что при повышении концентрации 1,2-ПД в диапазоне 10-30% возрастает вероятность “аномального” поведения клеточного объема и увеличения проницаемости клеточных мембран для молекул криопротектора.

В растворах 1,2-ПД с концентрацией выше 10% клетки сжимались неравномерно (рис. 1), а превышение клетками исходного объема на этапе регидратации может свидетельствовать о проникновении в клетку непроницающих внеклеточных компонентов (рис. 2). Причины резкого увеличения проницаемости мембран клеток для криопротектора не выяснены. Вследствие увеличения проницаемости плазматических мембран ооцитов

protectant are quite contradictory, therefore the research on studying osmotic responses of embryos and oocytes in 1,2-PD solutions, as well as its transport through cell plasma membrane may provide us the effect of additional information on different cryopreservation stages on embryos integrity and viability.

The research aim was studying the effect of fertilization and development stage on water and 1,2-PD embryo plasma membrane permeability in the following model: unfertilized oocyte-zygote-2-cell embryo-8-cell embryo.

Materials and methods

Mice oocytes and embryos were procured in CBA mice females with superovulation stimulation using standard method [1]. In the work we used 10, 20, 30% physiological Dulbecco's medium-based (volume/volume) 1,2-PD solutions. Kinetics of osmotic reaction of blastomeres on adding the solution under study there was studied by light microscopy (microscope MBI-13) by means of analysis of cell images. Investigations were accomplished under the temperature of $19 \pm 1^\circ\text{C}$. Permeability coefficients for cryoprotectant (k_p) and water (L_p) molecules were determined by Kedem-Katchalsky model [2].

Experiments were performed according to the requirements of the European Convention on Vertebrates Protection used for Experimental and other Purposes (Strasbourg, 1985).

Results and discussion

The probability of “abnormal” cell volume behavior and rise in cell membrane permeability for cryoprotectant molecules was established to increase along with 1,2-PD concentration rise within the range of 10-30%.

In 1,2-PD solutions with the concentration higher than 10% the cells were unequally shrunk (Fig. 1), and exceeding by cells of initial volume at the rehydration stage may testify to the penetration of non-penetrating extracellular components inside a cell (Fig. 2). Reasons for such a sharp increase of cell membrane permeability for cryoprotectant have yet remained unclear. As a result of permeability increase of oocyte plasmatic membranes and embryos for 1,2-PD molecules in 20%, 30% solutions, the k_p calculation was done only for 10% cryoprotectant solution.

The Fig. 3 shows the example how to calculate the permeability coefficient of 1-, 2-, 8-cell murine embryo membranes for 1,2-PD molecules.

The data, shown in the Table testify to the fact that the permeability coefficient of murine embryo plasma membranes for 1,2-PD molecules does not depend on the development stage, at least, within the first three

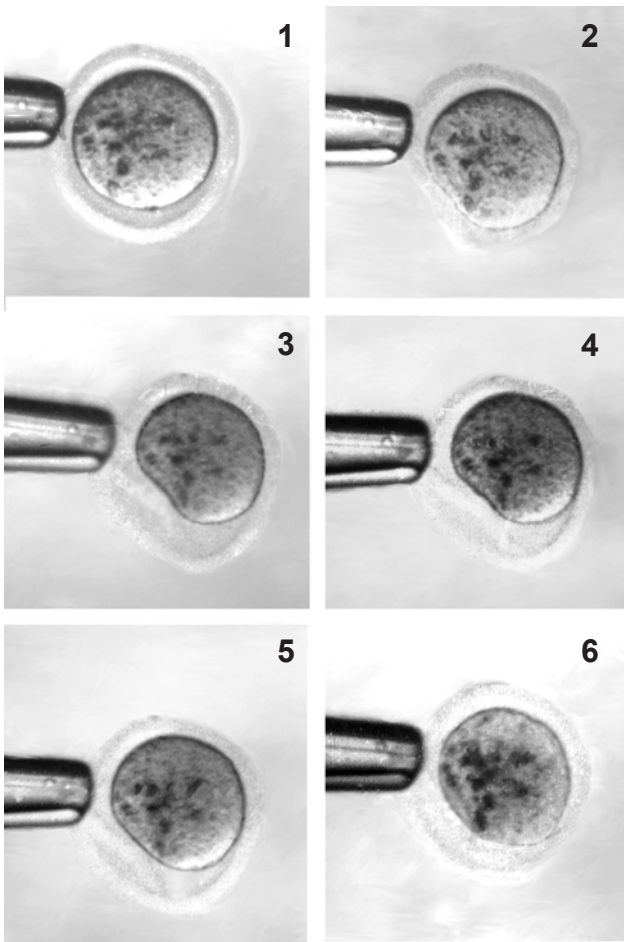


Рис.1. Кинетика осмотической реакции зиготы мыши в 30%-м растворе 1,2-ПД: 1 – натив; 2 – 16 с; 3 – 37 с; 4 – 52 с; 5 – 1 мин. 30 с; 6 – 15 мин экспозиции.

Fig. 1. Kinetics of mouse zygote osmotic reaction in 30% 1,2-PD solution: 1 – native; 2 – 16s; 3 – 37s; 4 – 52s; 5 – 1min 30s; 6 – 15 min of exposure.

и эмбрионов для молекул 1,2-ПД в 20 и 30%-х растворах, расчет k_p производили только для 10%-го раствора криопротектора.

На рис. 3 представлен пример расчета коэффициента проницаемости мембран 1-,2-,8- клеточных эмбрионов мыши для молекул 1,2-ПД.

Данные, приведенные в таблице, свидетельствуют о том, что коэффициент проницаемости плазматических мембран эмбрионов мыши для молекул 1,2- ПД не зависит от стадии развития, по крайней мере, в пределах трех первых делений. Оплодотворение также не оказывает влияния на коэффициент проницаемости клеточных мембран для молекул 1,2- ПД, а величина k_p плазматической мембраны ооцита близка к значению k_p , полученному Paynter et al. [7]. Величина k_p для молекул 1,2-ПД в 1,5 раза выше, чем для молекул этиленгликоля, в то время как значения L_p в растворах ЭГ и 1,2-ПД не отличаются [3].

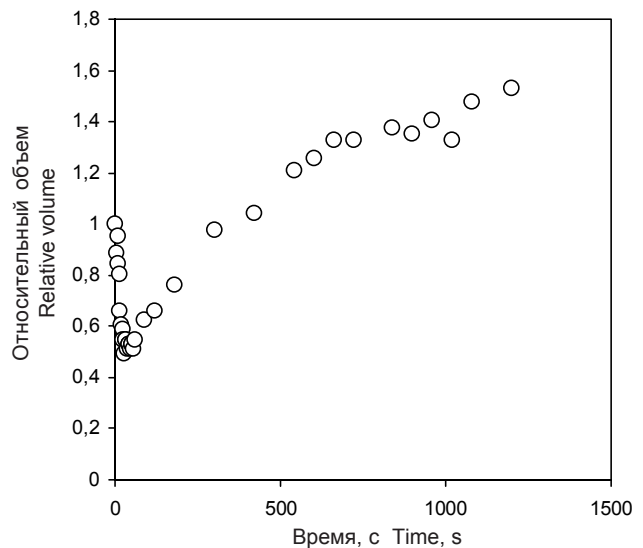


Рис.2. Зависимость относительного объема 1-клеточного эмбриона мыши от времени экспозиции в 30% растворе 1,2-ПД.

Fig. 2. Relative volume dependence of a 1-cell mouse embryo upon the exposure time in 30% 1,2-PD solution.

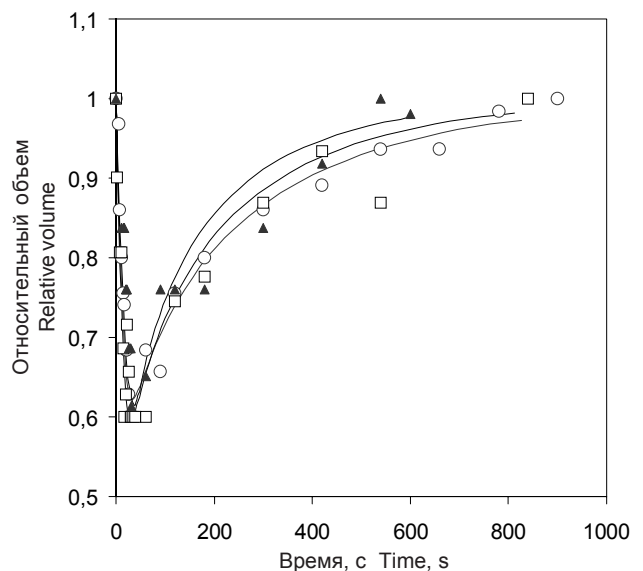


Рис.3. Экспериментальные и теоретические зависимости относительного объема: ○ – одноклеточного; □ – 2-клеточного; ▲ – 8-клеточного эмбрионов мыши от времени экспозиции в 10%-м растворе 1,2-ПД.

Fig. 3. Experimental and theoretical dependencies of relative volume: ○ – 1-cell; □ – 2-cell; ▲ – 8-cell murine embryos upon the exposure time in 10% 1,2-PD solution.

fissions. The fertilisation does not affect the permeability coefficient of cell membranes for 1,2-PD molecules as well, but the k_p value of oocyte plasma membrane is close to the k_p one, obtained by Paynter et al. [7]. The k_p value for 1,2-PD molecules in 1.5 times higher, than for ethylene glycol ones, meanwhile the L_p values in its solutions and in 1,2-PD one have no differences [3].

Сопоставляя данные о хорошей проникающей способности 1,2-ПД и повреждающем действии его концентрированных растворов, следует, вероятно, исключить возможность действия осмотического механизма повреждения. Очевидно, повреждающий эффект 1,2-ПД связан с путями и способом его проникновения в клетки. Не исключено, что 1,2-ПД может нарушать структуру липидного бислоя плазматических мембран эмбрионов, способствуя образованию в нем короткоживущих дефектов, что может приводить к проникновению в клетку внеклеточных растворов.

Выводы

Таким образом, коэффициент проницаемости плазматических мембран ооцитов и эмбрионов мыши для молекул 1,2-ПД в пределах трех первых делений не зависит от стадии развития и в 1,5 раза превышает коэффициент проницаемости для молекул этиленгликоля. Использование повышенных концентраций 1,2-ПД приводит к увеличению проницаемости клеточных мембран для молекул криопротектора и оказывает повреждающий эффект.

Литература

1. *Биология развития млекопитающих*. Методы: Пер. с англ./ Под ред. М. Манк.– М.: Мир, 1990.– 406 с.
2. *Гордиенко Е.А., Пушкар Н.С.* Физические основы низкотемпературного консервирования.– Киев.Наук.думка, 1994.– 141с.
3. *Пижко О.В., Смольянинова Е.И., Коваленко И.Ф.* Прогнозирование осмотического поведения эмбрионов мыши на основных этапах криоконсервирования // Пробл. криобиологии.– 2004.– №3.– С. 3-8.
4. *Duloust E., Toyama K., Busnel M., Moutier R. et al.* Long-term effects of embryo freezing in mice // *Developmental Biology*.– 1995.– Vol. 92.– P.589-593.
5. *Garrisi G.J., Navot D.* Cryopreservation of semen, oocytes, and embryos // *Curr.Opin.Obstet. Gynecol.*– 1992.– Vol. 4,N5.– P. 726-731.
6. *Lang F., Bush G.L., Ritter M., Volkl H. et al.* Functional significance of cell volume regulatory mechanisms // *Physiological Reviews*.– 1988.– Vol. 78, N1.– P. 247-305.
7. *Paynter S.J., Fuller B.J., Show R.W.* Temperature dependence of mature mouse oocyte membrane permeabilities in the presence of cryoprotectant // *Cryobiology*.– 1997.– Vol.34, N2.– P. 122-130.
8. *Stachecki J.J., Willadsen S.M.* Cryopreservation of mouse oocytes using a medium with low sodium content: effect of plunge temperature // *Cryobiology*.– 2000.– Vol. 40.– P. 4-12.
9. *Van den Abbel E., Van der Elst J., Van Steirteghem A.C.* The effect of temperature at which slow cooling is terminated and of thawing rate on the survival of one-cell mouse embryos frozen in dimethyl sulfoxide or 1,2-propane diol solutions // *Cryobiology*.– 1994.– Vol. 31.– P. 423-433.
10. *Van der Elst J., Nerinckx S., Van Steirteghem A.C.* Association of ultrarapid freezing of mouse oocytes with increased polyploidy at the pronucleate stage, reduced cell number and blastocysts and impaired fetal development // *J. Reprod. Fertil.*– 1993.– Vol. 99, N1.– P. 25-32.

Коэффициенты проницаемости мембран ооцитов и эмбрионов мыши для молекул воды и 1,2-ПД
Permeability coefficients of murine oocyte and embryo membranes for water and 1,2-PD molecules

Стадии развития Development stage	$L_p \times 10^{14}, \text{m}^3/\text{H} \times \text{с}$ $L_p^p \times 10^{14}, \text{m}^3/\text{N} \times \text{с}$	$k_p \times 10^7, \text{м/с}$ $k_p^p \times 10^7, \text{м/с}$
Ооцит Oocyte	4,10±0,20	2,50±0,10
Зигота Zygote	4,34±0,51	3,10±0,40
2 – клеточный эмбрион 2 – cell embryo	3,52±0,30	2,08±0,34
8 – клеточный эмбрион 8 – cell embryo	2,94±0,33	2,77±0,21

When comparing the data about high permeating ability of 1,2-PD and a damaging effect of its concentrated solutions, we should probably exclude the effect possible of osmotic mechanism of damaging. Impairing effect of 1,2-PD is obviously related to the ways and means of its permeation into cells. It is not improbable, that 1,2-PD can perturbate a lipid bilayer of embryo plasma membranes, by contributing to the formation in it of short-living defects, that may lead to penetration of extracellular solutions into a cell.

Conclusions

Thus, the permeability coefficient of plasma membranes of oocytes and murine embryos for 1,2-PD molecules within the first three fissions does not depend on the development stage and exceeds in 1.5 times the permeability coefficient for ethylene glycol molecules. The usage of increased 1,2-PD concentrations resulted in the augmentation of permeability in cell membranes for cryoprotectant molecules and causes a damaging effect.

References

1. *Mammalian development*. A practical approach. Edited by M. Monk.– Moscow: Mir, 1990.– 406 p.
2. *Gordienko E.A., Pushkar N.S.* Physical Base of Low Temperature Preservation.– Kiev: Nauk. dumka, 1994. – 141 p.
3. *Rožanov L.F.* Forecasting of murine embryo osmotic behaviour at main stages of cryopreservation // *Problems of Cryobiology*.– 2004.–N3.– P. 3-8.
4. *Duloust E., Toyama K., Busnel M., Moutier R. et al.* Long-term effects of embryo freezing in mice // *Developmental Biology*.– 1995.– Vol. 92.– P.589-593.
5. *Garrisi G.J., Navot D.* Cryopreservation of semen, oocytes, and embryos // *Curr.Opin.Obstet. Gynecol.*– 1992.– Vol. 4,N5.– P. 726-731.
6. *Lang F., Bush G.L., Ritter M., Volkl H. et al.* Functional significance of cell volume regulatory mechanisms // *Physiological Reviews*.– 1988.– Vol. 78, N1.– P. 247-305.

11. *Todorov S.J., Siebzenhnrubl E.R., Koch R.* Comparative results on survival of human and animal egg using different cryoprotectants and freeze-thawing regimens. I. Mouse and hamster // *Hum. Reprod.*– 1988.– Vol. 7, N4.– P. 805-811.

Поступила 10.09.2004

7. *Paynter S.J., Fuller B.J., Show R.W.* Temperature dependence of mature mouse oocyte membrane permeabilities in the presence of cryoprotectant // *Cryobiology.*– 1997.– Vol.34, N2.– P. 122-130.
8. *Stachecki J.J., Willadsen S.M.* Cryopreservation of mouse oocytes using a medium with low sodium content: effect of plunge temperature // *Cryobiology.*– 2000.– Vol. 40.– P. 4-12.
9. *Van den Abbel E., Van der Elst J., Van Steirteghem A.C.* The effect of temperature at which slow cooling is terminated and of thawing rate on the survival of one-cell mouse embryos frozen in dimethyl sulfoxide or 1,2-propane diol solutions // *Cryobiology.*– 1994.– Vol. 31.– P. 423-433.
10. *Van der Elst J., Nerinckx S., Van Steirteghem A.C.* Association of ultrarapid freezing of mouse oocytes with increased polyploidy at the pronucleate stage, reduced cell number and blastocysts and impaired fetal development // *J. Reprod. Fertil.*– 1993.– Vol. 99, N1.– P. 25-32.
11. *Todorov S.J., Siebzenhnrubl E.R., Koch R.* Comparative results on survival of human and animal egg using different cryoprotectants and freeze-thawing regimens. I. Mouse and hamster // *Hum. Reprod.*– 1988.– Vol. 7, N4.– P. 805-811.

Accepted in 10.09.2004