

Влияние различных этапов криоконсервирования методом витрификации на морфофункциональные и электрические параметры ранних эмбрионов мыши

Е.И. СМОЛЯНИНОВА¹, О.А. СТРИХА¹, В.А. ШИГИМАГА², Е.Г. ЛИСИНА², Л.И. ПОПИВНЕНКО¹

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

²Институт животноводства НААН Украины, Харьковская область

Effect of Different Cryopreservation Stages Involved Vitrification on Morphofunctional and Electrical Parameters of Early Mice Embryos

E.I. SMOLYANINOVA¹, O.A. STRIKHA¹, V.A. SHIGIMAGA², E.G. LISINA², L.I. POPIVNEKO¹

¹Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

²Institute of Animal Science of Ukrainian Academy of Agrarian Sciences, Kharkov region, Ukraine

Криоконсервирование ранних эмбрионов млекопитающих методом витрификации является в настоящее время одним из самых распространенных методов, применяемых в современных вспомогательных репродуктивных технологиях. Оптимизация режимных параметров существующих протоколов тесно связана с исследованиями по влиянию сред криоконсервирования на жизнеспособность и морфофункциональные свойства эмбрионов. При этом важную роль играет как композиционный состав криозащитных сред, так и выбор исследуемых клеточных параметров.

Целью настоящей работы было исследование влияния протокола криоконсервирования методом витрификации в этиленгликоль-сахарозной среде на морфофункциональную сохранность и электрическую проводимость 2-клеточных эмбрионов мыши. Криоконсервирование осуществляли по методу Исаченко В.В. и др. (1994 г.) с модификацией некоторых параметров [Смолянинова Е.И. и др., 2007]. Морфофункциональную сохранность эмбрионов оценивали визуально и после культивирования *in vitro* в среде М2 в CO₂-инкубаторе. Электрическую проводимость эмбрионов определяли методом импульсной кондуктометрии в процессе экспозиции эмбрионов в растворе 0,3 М сахарозы. Показано, что основным этапом, влияющим на морфофункциональную сохранность 2-клеточных эмбрионов мыши, является длительность экспозиции эмбрионов в среде замораживания. При увеличении времени экспозиции в среде замораживания от 1,5 до 3 мин существенно уменьшило количество эмбрионов, достигших стадии бластоцисты *in vitro* (89,7 ± 4,0 и 75,5 ± 6,3% соответственно). Значения электрической проводимости как контрольных, так и криоконсервированных эмбрионов мыши составили ((1,54 ± 0,11)–(6,12 ± 0,34)) × 10⁻³ См/м. Однако экспозиция в течение 3 мин в среде замораживания и последующее замораживание-оттаивание приводили к необратимому электрическому пробоев плазматических мембран эмбрионов, что свидетельствует о нарушениях мембранного аппарата в результате сдвига ионного гомеостаза клеток. Полученные результаты свидетельствуют о том, что электрические параметры клеток тесно связаны с их функциональным состоянием и отражают изменения в клеточном метаболизме как в норме, так и под воздействием внешних факторов, в том числе и криоконсервирования.

Cryopreservation of mammalian early embryos by vitrification is currently one of the most common methods used in modern assisted reproductive technologies. Optimization of operating parameters of the existing protocols is closely associated with the research of cryopreservation media effect on viability and morphofunctional properties of the embryos. Moreover a compositional content of cryoprotective media and the choice of the studied cell parameters play an important role.

The research aim was to investigate the effect of cryopreservation protocol involving vitrification in ethylene glycol-sucrose medium on morphofunctional integrity and electrical conductivity of mice two-cell embryos. Cryopreservation was performed by the method of Isachenko V.V. *et al.* (1994) with the modification of certain parameters [Smolyaninova E.I. *et al.*, 2007]. Morphofunctional integrity of embryos was visually evaluated also after culturing *in vitro* in medium M2 in CO₂ incubator. Electrical conductivity of the embryos was determined by pulse conductometry during exposure on embryos in 0.3 M sucrose solution. It has been shown that the main stage affecting morphofunctional integrity of mice two-cell embryos is the duration of exposure on embryos in freezing medium. The increase of exposure time in freezing medium from 1.5 up to 3 min significantly reduced the number of embryos approaching the stage of blastocyst *in vitro* (89.7 ± 4.0 and 75.5 ± 6.3%, respectively). The values of electrical conductivity of the control as well as cryopreserved mice embryos were ((1.54 ± 0.11)–(6.12 ± 0.34)) × 10⁻³ S/m. But 3 min long exposure in the freezing medium and the following freeze-thawing resulted in a non-reversible breakdown of embryo plasma membranes that indicated the presence of damages in the membrane apparatus due to disorder of the cell ionic homeostasis. The obtained results testify to the fact that the cell electrical parameters are closely associated with their functional state and reflect the changes in cellular metabolism in the norm and under the influence of external factors including cryopreservation.