

Импульсная кондуктометрия как экспресс-тест для оценки состояния 2-клеточных эмбрионов мыши

О.А. Стриха

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Impulse Conductometry as the Express-Test to Estimate the State of 2-Cell Murine Embryos

O.A. Strikha

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

В настоящее время метод витрификации для криоконсервирования гамет и ранних эмбрионов млекопитающих является самым распространенным в вспомогательных репродуктивных технологиях [A. Cobo, 2012; S. Dovey, 2012; R. Gosden, 2013]. Наиболее информативный способ определения жизнеспособности деконсервированных эмбрионов – оценка их способности развиваться в условиях *in vivo* или *in vitro* – чрезвычайно трудоемкий и дорогой. В связи с этим актуальна разработка тестов для экспресс-диагностики состояния клеток на основе измерения отдельных клеточных параметров.

Цель работы – исследование влияния продолжительности экспозиции 2-клеточных эмбрионов мышей и криоконсервирования этих клеток методом витрификации в этиленгликоль-сахарозной среде на их электрическую проводимость.

Объектом исследования служили 2-клеточные эмбрионы мышей F1 (C57Bl×CBA) возрастом 6–8 недель. Для стимуляции суперовуляции самок мышей подвергали гормональной обработке путем введения гонадотропина сыворотки жеребых кобыл («Folligon», Нидерланды) и человеческого хорионического гонадотропина (чХГ) («Chorulon», Нидерланды). Самок после введения чХГ подсаживали к самцам для осеменения. Через 46–48 ч после введения чХГ самок выводили из эксперимента. Эмбрионы на стадии двух бластомеров получали по стандартной методике [М. Манк, 1990]. В работе использовали протокол криоконсервирования методом витрификации, описанный ранее [В.В. Исаченко, 1994; А.С. Кривохарченко, 1995; Е.И. Смольянинова, 2007]. Эмбрионы были разделены на пять групп: контрольную и четыре экспериментальные. В первой серии экспериментов исследовали влияние кратковременной экспозиции 2-клеточных эмбрионов мыши в криозащитной среде на их электрическую проводимость. Во второй серии – влияние цикла низкотемпературного консервирования 2-клеточных эмбрионов мыши на их электрическую проводимость.

Показано, что после экспозиции эмбрионов в среде для криоконсервирования значения их электрической проводимости увеличиваются по сравнению с контрольными значениями $((2,24 \pm 0,64) \div (3,86 \pm 0,68) \times 10^{-3})$ и $(1,54 \pm 0,11) \div (6,12 \pm 0,34) \times 10^{-3}$ См/м соответственно. Увеличение времени экспозиции с 1,5 до 3 мин снижает устойчивость плазматических мембран эмбрионов к действию импульсного электрического поля. Этап замораживания-оттаивания не оказывает существенного влияния на численные значения электрической проводимости эмбрионов мыши. Проведенные исследования показали, что электрическая проводимость может быть чувствительным диагностическим клеточным параметром, отражающим нарушения морфофункциональной целостности клеток на различных этапах низкотемпературного воздействия.

Nowadays, the application of vitrification to cryopreserve mammalian gametes and early embryos is one of the most widespread method in the assisted reproductive technologies [A. Cobo, 2012; S. Dovey, 2012; R. Gosden, 2013]. The most informative way to determine the viability of frozen-thawed embryos is the assessment of their capability to develop *in vivo* or *in vitro*. However, these criteria are very time-consuming and expensive. The problem of developing the tests for express diagnostics of cell state in terms of individual cell parameters measuring is still important.

The aim of this study was to investigate the effect of duration of two-cell murine embryos exposure and cryopreservation of these cells using vitrification in ethylene glycol-sucrose medium on their electric conductivity.

Experiments were performed in 2-cell embryos of 6–8 week-old F1 (C57Bl×CBA) mice. Superovulation was stimulated by hormonal treatment: injection of pregnant mare serum gonadotropin (Folligon, Netherlands) and human chorionic gonadotropin (HCG) (Chorulon, Netherlands). After HCG administration the females were transferred to males for insemination. Females were sacrificed by means of cervical dislocation 46–48 hrs post HCG administration. Two cell embryos were isolated using the standard method [M. Mank, 1990].

In the present study we used the cryopreservation protocol based on vitrification method described previously [V.V. Isachenko, 1994; A.S. Krivokharchenko, 1995; E.I. Smolyaninova, 2007]. Embryos were divided into five groups: the control and four experimental groups. First series of experiments were targeted to elucidate the effect of duration of exposure in solution of cryoprotectants and vitrification medium on electric conductivity in the murine embryo. In the second series we investigated the effect of complete cycle of low temperature preservation of two-cell murine embryos on their electric conductivity.

It has been shown that embryo exposure in cryopreservation medium led to an increase in their electric conductivity values in comparison with the control ones $((2.24 \pm 0.64) \div (3.86 \pm 0.68) \times 10^{-3})$ and $(1.54 \pm 0.11) \div (6.12 \pm 0.34) \times 10^{-3}$ S/m, respectively). Extension of exposure time from 1.5 min to 3 min led to a decrease in embryo plasma membrane resistance to impulse electric field action. Freeze-thawing step did not additionally affect the values of the electric conductivity of 2-cell murine embryos. Electric conductivity could be a sensitive diagnostic parameter for the cell, reflecting the impairments in morphological integrity of the cells at different stages of low temperature exposure.

