

Анализ влияния различных этапов криоконсервирования методом витрификации в этиленгликоль-сахарозной среде на жизнеспособность 2-клеточных эмбрионов мыши

UDC 57.043.085:547.422

Ye.I. SMOLYANINOVA^{1*}, O.V. PISHKO¹, E.G. LISINA², A.A. KOLESNIKOVA², L.F. ROZANOV¹

Analysis of Effect of Different Steps of Vitrification Protocol for Cryopreservation in Ethylene Glycol-Sucrose Medium on 2-Cell Murine Embryo Viability

Исследовано влияние различных этапов криоконсервирования методом витрификации в этиленгликоль-сахарозной среде на морфологическую сохранность и жизнеспособность 2-клеточных эмбрионов мыши. Показано, что данная процедура позволяет сохранить жизнеспособными более 70% эмбрионов. Основной вклад в криоповреждение эмбрионов вносят этапы экспозиции в среде замораживания и замораживания-отогрева. На основе литературных и полученных в работе данных обсуждается роль осмотического и механического факторов в повреждении клеток на этапах быстрого замораживания.

Ключевые слова: витрификация, 2-клеточный эмбрион мыши, этиленгликоль, сахароза, криоконсервирование.

Досліджено вплив різних етапів криоконсервування за методом вітрифікації у етиленгліколь-сахарозному середовищі на морфологічну збереженість та життєздатність 2-клітинних ембріонів миші. Показано, що ця процедура дозволяє зберегти життєздатними більш, ніж 70% ембріонів. Основний внесок у крипошкодження ембріонів належить етапам експозиції у середовищі заморожування та заморожування-відігріву. На підставі літературних та отриманих в роботі даних обговорюється роль осмотичного та механічного факторів у пошкодженні клітин на етапах швидкого заморожування.

Ключові слова: вітрифікація, 2-клітинний ембріон миші, етиленгліколь, сахароза, криоконсервування.

The effect of different stages of vitrification protocol for cryopreservation with ethylene glycol-sucrose medium on morphological integrity and viability of 2-cell murine embryos has been studied. This procedure was shown as enabling to preserve viable more than 70% embryos. The stages of exposure in freezing medium and freeze-thawing are mostly responsible for embryo cryoinjury. Basing on the literature reports and own data the role of osmotic and mechanical factors in cell injury at the rapid freezing stages is discussed.

Key-words: vitrification, 2-cell murine embryo, ethylene glycol, sucrose, cryopreservation.

В отличие от медленного программного замораживания криоконсервирование методом витрификации с использованием высоких концентраций криопротекторов позволяет не только сократить длительность цикла криоконсервирования, но и свести к минимуму изменения объема клеток на этапах замораживания и оттаивания. В связи с этим изучение физико-химических факторов, действующих на клетки на этапах добавления и удаления криопротекторов, имеет особое значение [6, 12, 19]. Традиционно при витрификации в качестве криопротекторов применяются глицерин, диметилсульфоксид и 1,2-пропандиол [20–22, 25, 27]. В последнее десятилетие с ними начал конкурировать этиленгликоль (ЭГ) [15, 17, 19, 24]. В работах [19, 20, 24, 27] показано, что этиленгликоль-сахарозная

In contrast to a slow programmed freezing the cryopreservation with vitrification method using high concentrated cryoprotectant solutions enables not only reducing the cryopreservation cycle duration but minimising the changes in cell volume at freezing and freeze-thawing stages as well. Due to this fact studying the physical and chemical factors affecting cells at the stages of cryoprotectant addition and removal is of special importance [6, 12, 19]. Glycerol, dimethyl sulfoxide and 1,2-propane diol are traditionally used as cryoprotectants for vitrification [20–22, 25, 27]. Within recent decades, ethylene glycol (EG) has been competitive with them [15, 17, 19, 24]. As reported in the papers [19, 20, 24, 27] ethylene glycol-sucrose medium may be used for oocyte and early murine embryo cryopreservation. At the same time such parameters as cryoprotectant and non-penetrative

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

²Институт животноводства УААН

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-38-71, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта: cryo@online.kharkov.ua

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

²Institute of Cattle Breeding of Ukrainian Academy of Agrarian Sciences, Kharkov, Ukraine

* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 3871, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

среда может быть использована для криоконсервирования ооцитов и ранних эмбрионов мыши. Вместе с тем такие параметры, как концентрации криопротектора и непроникающей добавки, продолжительность экспозиции в среде замораживания, условия добавления и удаления криопротектора, подбираются, главным образом, эмпирически. Кроме того, для оптимизации различных этапов быстрого замораживания ранних эмбрионов млекопитающих необходимо учитывать, что эмбрионы разных стадий деления (дробления) обладают различной устойчивостью к отдельным этапам цикла криоконсервирования [17].

Цель данного исследования – оценить перспективы использования этиленгликоль-сахарозной среды для криоконсервирования методом витрификации 2-клеточных эмбрионов мыши менее устойчивых к замораживанию по сравнению с эмбрионами других стадий.

Материалы и методы

Объектом исследования служили 2-клеточные эмбрионы мышей линии СВА возраста 6-8 недель. Для стимуляции суперовуляции самок мышей подвергали гормональной обработке путем внутривентрального введения гонадотропных гормонов: folligon (5 ME) и chorulon (7,5 ME) с интервалом 46–48 ч [1]. Двухклеточные эмбрионы получали промыванием отпрепарированных яйцеводов забитых животных физиологической средой при комнатной температуре по стандартной методике [1]. Затем клетки трижды отмывали физиологической средой и немедленно использовали в экспериментах.

В первой серии экспериментов было исследовано осмотическое поведение эмбрионов мыши в процессе последовательной смены растворов, моделирующем условия добавления криопротектора, эквilibрации в среде замораживания и отмывания клеток от криозащитной среды.

Обработка эмбрионов в выбранном методе замораживания включает следующие этапы: 10-минутную эквilibрацию в 10%-м растворе ЭГ; инкубацию в среде замораживания (30% ЭГ и 0,7 М сахарозы); удаление криопротектора в растворе сахарозы 0,5 М; перенос эмбрионов в физиологическую среду. Отдельный эмбрион в малой капле среды Дюльбекко (10–15 мкл) помещали в пластиковую чашку Петри на предметном столике инвертированного биологического микроскопа МБИ-13 и фиксировали с помощью стеклянной микропипетки, закрепленной в микроманипуляторе.

Исходное состояние объекта и кинетику осмотического поведения эмбриона в процессе экспо-

additive concentrations, exposure duration in freezing medium, conditions for cryoprotectant addition and removal are mostly empirically selected. In addition, the fact, that embryos of different cleavage stages have various resistance to some steps of cryopreservation cycle, should be taken into account to optimise different stages for early mammalian embryo rapid freezing [17].

This research was aimed to evaluate the perspectives of ethylene glycol-sucrose medium use for cryopreservation by vitrification method of 2-cell murine embryos, being less resistant to freezing.

Materials and methods

The 6-8 week aged CBA mouse 2-cell embryos served as the research object. The mouse females were hormonally treated via intraperitoneal introduction of gonadotrophic hormones: folligon (5 IU) and chorulon (7.5 IU) with 46–48 hrs interval for stimulating superovulation [1]. The 2-cell embryos were derived by washing the prepared oviducts of perished animals with physiological solution at room temperature according to the standard technique [1]. Then cells were thrice washed-out with physiological medium and used at once in the experiments.

In the first experimental session there was investigated an osmotic behaviour of murine embryos during successive change of solutions, modelling conditions for cryoprotectant addition, equilibration in freezing medium and cell washing out of cryoprotective medium.

Embryo treatment in the selected freezing method comprises the following steps: a 10-min equilibration in 10% EG solution; incubation in freezing medium (30% EG and 0.7 M sucrose); cryoprotectant removal in 0.5 M sucrose solution; embryo transfer into physiological solution. A separate embryo in a small drop of Dulbecco's medium (10–15 μ l) was placed into a plastic Petri dish on an objective table of MBI-13 inverted biological microscope and fixed using the attached in micromanipulator glass micropipette.

Initial state of an object and kinetics of embryo osmotic behaviour during exposure in studied solutions were photo-recorded. After processing the images, the experimental dependencies of a relative volume of some embryo blastomeres on the exposure duration in the studied solutions have been obtained.

In the second experimental session the effect of incubation time in freezing medium on the murine embryo integrity and viability was investigated. The embryos were divided into three groups: one control and two experimental ones. The embryos of experimental groups were subjected to a 10-min treatment with 10% EG solution, then transferred into freezing medium (30% EG + 0.7 M sucrose) and exposed in it for 1.5 and 3 min, correspondingly. Afterwards embryos were placed into drops of 0.5 M sucrose

зиции в исследуемых растворах регистрировали фотографически. После обработки изображений были получены экспериментальные зависимости относительного объема отдельных бластомеров эмбриона от продолжительности экспозиции в исследуемых растворах.

Во второй серии экспериментов исследовали влияние времени инкубации в среде замораживания на сохранность и жизнеспособность эмбрионов мыши. Эмбрионы разделяли на три группы: одну контрольную ($n=52$) и две экспериментальные ($n=58$ и $n=53$). Эмбрионы экспериментальных групп подвергали 10-минутной обработке 10%-м раствором ЭГ, после чего переносили в среду замораживания (30% ЭГ + 0,7 М сахарозы) и выдерживали в ней в течение 1,5 и 3 мин соответственно. Затем эмбрионы помещали в капли раствора сахарозы 0,5 М на 10 мин с последующим переносом в физиологическую среду Дюльбекко. После трехкратного отмывания эмбрионов культуральной средой М16 их немедленно переносили в CO_2 -инкубатор для культивирования. Эмбрионы контрольной группы переносили в CO_2 -инкубатор после 25-минутной экспозиции их в физиологической среде при комнатной температуре. Жизнеспособность эмбрионов оценивали по их способности развиваться *in vitro* до стадии расширенной бластоцисты на 5-е сутки культивирования.

В третьей серии экспериментов исследовали влияние полного цикла низкотемпературного консервирования 2-клеточных эмбрионов мыши на их морфологическую сохранность и жизнеспособность с учетом данных, полученных в предыдущей серии экспериментов. Криоконсервирование осуществляли методом быстрого замораживания, успешно применяемого ранее для 8-клеточных эмбрионов мыши, крыс и коров [2, 3]. Эмбрионы разделяли на две экспериментальные ($n=98$ и $n=74$) группы. Клетки обеих экспериментальных групп после предварительной эквilibрации в 10%-м растворе ЭГ отмывали в капле среды замораживания и затем немедленно переносили (по 5–7 клеток) в заранее подготовленные пластиковые соломинки, содержащие 5 мкл среды замораживания. Соломинки погружали в жидкий азот и хранили в течение 3–7 суток. Время экспозиции в этиленгликоль-сахарозной среде перед замораживанием составило 45 с и 1,5 мин для 1-й и 2-й экспериментальных групп соответственно. Соломинки отогревали в водяной бане (38°C). Для удаления криопротектора эмбрионы, извлеченные из соломинок, переносили в раствор сахарозы 0,5 М и выдерживали в нем в течение 10 мин, а затем трижды отмывали физиологической средой при комнатной температуре. Сохранность деконсерви-

solution for 10 min with following transfer into Dulbecco physiological medium. After a three-fold embryo washing-out with M16 culturing medium they were immediately transferred into CO_2 incubator for culturing. The control group embryos were transferred into CO_2 incubator after their 25-min exposure into physiological medium at room temperature. Embryo viability was estimated by their capability of *in vitro* development up to an extended blastocyst stage to the 5th day of culturing.

In the third experimental session there was investigated the effect of a complete cycle of low temperature preservation of 2-cell murine embryos on their morphological integrity and viability taking into account the data, obtained in the previous experimental sessions. Cryopreservation was done using the method of a rapid freezing, successfully applied previously for murine, rat's and bovine 8-cell embryos [2, 3]. Embryos were divided into two experimental groups. Cells of both experimental groups after preliminary equilibration in 10% EG solution were washed out in a drop of freezing medium with following immediate transfer (by 5–7 cells) in previously prepared plastic straws with 5 μl freezing medium. Straws were immersed into liquid nitrogen and stored for 3–7 days. Exposure time in ethylene glycol-sucrose medium before freezing was 45 sec and 1.5 min for the 1st and 2nd experimental groups, correspondingly. The straws were thawed on water bath (38°C). For cryoprotectant removal the embryos, removed from straws were transferred into 0.5 M sucrose solution and exposed in it for 10 min with following three-fold washing-out with physiological solution at room temperature. The integrity and viability of frozen-thawed cells were estimated by morphological signs and by embryo capability for *in vitro* development up to the extended blastocyst stage, correspondingly.

Cryoprotectant solution and freezing medium were prepared on phosphate-saline physiological Dulbecco's medium base [1].

The results obtained were statistically processed using the Student's method [8].

Results and discussion

The Figure shows a typical change in a relative blastomere volume of 2-cell murine embryo at a successive change of solutions: 10% EG solution, freezing medium, 0.5 M sucrose solution and Dulbecco's physiological medium.

During exposure in 10% EG solution a relative volume of blastomere primarily decreases down to $0.38 V_0 \pm 0.01 V_0$ ($n=5$) as a result of dehydration with following gradual increase up to $0.7 V_0 \pm 0.02 V_0$ ($n=5$) during 10-min equilibration. Transfer into freezing medium results in an additional cell dehydration and cell volume reduction down to $0.41 V_0 \pm 0.02 V_0$, in

рованных клеток оценивали по морфологическим признакам, жизнеспособность – по способности эмбрионов развиваться в условиях *in vitro* до стадии расширенной бластоцисты.

Раствор криопротектора и среду замораживания готовили на основе фосфатно-солевой физиологической среды Дюльбекко [1].

Статистическую обработку полученных результатов проводили по методу Стьюдента [8].

Результаты и обсуждение

На рисунке показано характерное изменение относительного объема бластомера 2-клеточного эмбриона мыши при последовательной смене растворов: 10%-го раствора ЭГ, среды замораживания, раствора сахарозы 0,5 М и физиологической среды Дюльбекко.

При экспозиции в 10%-м растворе ЭГ относительный объем бластомера сначала уменьшается до значений $0,38V_0 \pm 0,01V_0$ ($n=5$) в результате обезвоживания, а затем в процессе 10-минутной эквипирации постепенно увеличивается до $0,7V_0 \pm 0,02V_0$ ($n=5$). Перенос в среду замораживания приводит к дополнительной дегидратации клетки и уменьшению клеточного объема в среднем до $0,41V_0 \pm 0,02V_0$. Бластомеры после завершения этого этапа остаются обезвоженными, что является одним из условий предотвращения внутриклеточной кристаллизации при быстром замораживании. На этапе удаления криопротектора из клетки в растворе сахарозы 0,5 М сначала наблюдается увеличение клеточного объема в результате потока воды внутрь бластомеров, а по мере выхода из клетки ЭГ клеточный объем уменьшается. При возвращении эмбриона в физиологическую среду объем бластомеров постепенно восстанавливается до исходного значения. Представленные зависимости наглядно демонстрируют отсутствие резких и значительных изменений клеточного объема в процессе последовательной смены растворов, что свидетельствует об осмотической устойчивости 2-клеточных эмбрионов мыши к выбранной процедуре добавления растворов ЭГ и его удаления.

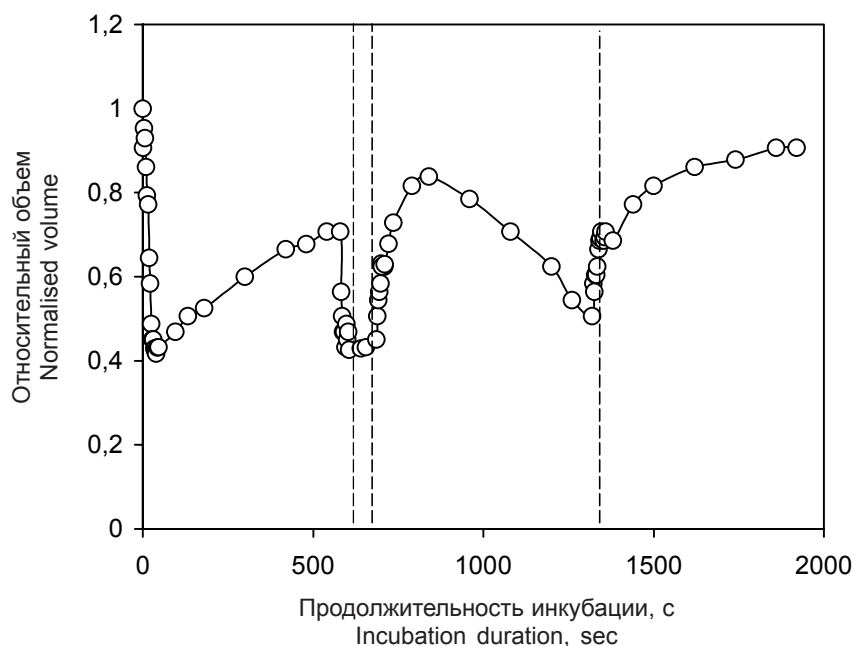
Во второй серии экспериментов определяли влияние экспозиции в среде замораживания и последующего отмывания 2-клеточных эмбрионов от крио-

average. After this stage completed, the blastomeres remain dehydrated, that is one of the conditions for preventing intracellular crystallisation at a rapid freezing. At the stage of cryoprotectant removal out of cell in 0.5 M sucrose solution there is firstly observed an increase in cell volume, resulted from water efflux inside blastomeres, but with EG release out of cell there is cell volume reduction. When placing embryo back into physiological medium the blastomere volume recovers gradually up to the initial value. The shown dependencies visibly demonstrate the absence of any sharp and significant changes in cell volume during successive solution change, that testifies to an osmotic resistance of 2-cell murine embryos to a selected procedure of EG solution adding/removal.

In the second experimental series we have determined the exposure effect in freezing medium and following 2-cell embryo washing-out from a cryoprotectant on their viability. The exposure time effect in freezing medium may be particularly stipulated by cell sensibilization to a post-hypertonic lysis, resulted from additional cryoprotectant entering into them under exposure augmentation.

Experimental results on studying the incubation time in ethylene glycol-sucrose medium on viability of 2-cell murine embryos are presented in the Table 1.

The viability level of 2-cell murine embryos after 1.5 min exposure in freezing medium does not



Характерная зависимость относительного объема бластомера 2-клеточного эмбриона мыши от времени инкубации при последовательной смене растворов: 1 – 10%-й раствор ЭГ на физиологической среде Дюльбекко; 2 – среда замораживания (30% ЭГ и 0,7 М сахарозы); 3 – 0,5 М раствор сахарозы; 4 – физиологическая среда Дюльбекко.

Characteristic dependence of a relative volume of blastomere of 2-cell murine embryo on incubation time at a successive solution change: 1 – 10% EG solution with Dulbecco's physiological medium; 2 – freezing medium (30% EG and 0.7 M sucrose); 3 – 0.5 M sucrose solution; 4 – Dulbecco's physiological medium.

протектора на их жизнеспособность. Влияние времени экспозиции в среде замораживания может быть обусловлено, в частности, сенсбилизацией клеток к постгипертоническому лизису в результате дополнительного поступления в них криопротектора при увеличении экспозиции.

Результаты экспериментов по изучению влияния времени инкубации в этиленгликоль-сахарозной среде на жизнеспособность 2-клеточных эмбрионов мыши представлены в табл. 1.

Уровень жизнеспособности 2-клеточных эмбрионов мыши после 1,5-минутной экспозиции в среде замораживания практически не отличается от уровня жизнеспособности эмбрионов контрольной группы. При увеличении времени экспозиции в среде замораживания до 3-х минут наблюдалось снижение жизнеспособности эмбрионов, она была достоверно ниже, чем в контрольной группе. Подобные результаты были получены при исследовании влияния времени эквilibрации на жизнеспособность криоконсервированных 8-клеточных эмбрионов мыши в этиленгликоль-сахарозной и глицерин-сахарозной средах [3, 12]. Полученные данные можно объяснить влиянием продолжительности экспозиции клеток в гипертонической концентрированной среде на ионный гомеостаз эмбрионов. С помощью метода электронно-зондового микроанализа нами было показано, что увеличение времени эквilibрации 2-клеточных эмбрионов мыши в этиленгликоль-сахарозной среде с 1,5 до 3 мин вызывает трехкратное снижение цитоплазматического содержания основных неорганических элементов – калия и натрия [9, 11, 23]. Было установлено, что внутриклеточная концентрация калия и в норме не является постоянной величиной, претерпевая циклические изменения на стадиях клеточного цикла. Максимум достигается на стадии интерфазы (130±6) мМ, а минимум на стадии митоза (47±3) мМ [9, 10]. Такие изменения концентрации калия имеют, по-видимому, важное физиологическое значение и коррелируют с циклическим изменением активности 240 pS K⁺-канала, а также синхронными молекулярными перестройками в цитоплазме (так называемые “цитоплазматические часы”) в процессе дробления [18]. Следует отметить, что в наших экспери-

Таблица 1. Влияние времени экспозиции в среде замораживания (30% ЭГ и 0,7 М сахарозы) на жизнеспособность 2-клеточных эмбрионов мыши

Table 1. Effect of exposure time in freezing medium (30% EG and 0.7 M sucrose) on 2-cell murine embryo viability

Группы Groups	Время экспозиции эмбрионов в среде замораживания, мин Time of embryo exposure in freezing medium, min	Количество эмбрионов, n Number of embryos, n	Количество эмбрионов, достигших стадии бластоцисты, % (n) Number of embryos, approaching blastocyst stage, % (n)
I	Контроль ¹ Control ¹	52	90,4±4,1 (47)
II	1,5	58	89,7±4,0 (52)
III	3	53	75,5±6,3 ² (38)

Примечания: ¹ – 25 мин экспозиции 2-клеточных эмбрионов в физиологической среде Дюльбекко при комнатной температуре; ² – статистически достоверное отличие в сравнении с контролем, p<0,05.

Notes: ¹ – 25 min of 2-cell embryo exposure in Dulbecco’s physiological medium at room temperature; ² – statistically significant difference compared to the control, p<0.05.

practically differ from that in the control group. With enhancing the exposure time in freezing medium up to 3 min, a decrease in embryo viability was observed, being statistically and significantly lower than for the control group. We obtained the similar results when investigating the effect of equilibration time on viability of 8-cell murine embryos, cryopreserved in ethylene glycol-sucrose and glycerol-sucrose media [3, 12]. The data obtained may be explained by the effect of cell exposure duration in hypertonic concentrated medium on embryo ion homeostasis. Using the method of electron-probe microanalysis we demonstrated an increase in equilibration time of 2-cell murine embryos in ethylene glycol-sucrose medium from 1.5 to 3 min as causing a three-fold decrease in cytoplasm content of the principal inorganic elements: potassium and sodium [9, 11, 23]. Potassium intracellular concentration was established as a non-constant value even in the norm, by undergoing cyclical changes at cell cycle stages. The maximum and minimum are reached at interphase (130±6 mM) and mitosis (47±3 mM) stages, correspondingly [9, 10]. Such changes in potassium concentration are evidently of great physiological importance and correlate with cyclic change in activity of 240 pS K⁺-channel as well as with synchronic molecular rearrangements in cytoplasm (so-called “cytoplasmic clock”) during cleavage [18]. Of note is the fact that in our experiments all 2-cell embryos are at G₁/S cell cycle stage with corresponding content of intracellular potassium (130 mM). Reduction of potassium intracellular concentration down to 47 mM apparently causes an artificial “shift” of embryo blastomere cyto-

ментах все 2-клеточные эмбрионы находились на стадии G₁/S клеточного цикла с соответствующим содержанием внутриклеточного калия (130 мМ). Снижение внутриклеточной концентрации калия до 47 мМ, по-видимому, вызывает искусственный “перевод” цитоплазмы бластомеров эмбриона из состояния, характерного для стадии интерфазы, в состояние, характерное для митоза, минуя соответствующие молекулярные перестройки в цитоплазме и нарушая, тем самым, согласованность процессов кардио- и цитокинеза. Согласно нашим данным, эмбрионы мыши на стадии митоза содержат минимальную цитоплазматическую концентрацию калия. Следовательно, потеря этого элемента под действием осмотического фактора среды может существенно сказаться на криоустойчивости клеток. В пользу этого предположения свидетельствуют результаты работ [13, 14, 16], в которых было показано, что жизнеспособность эмбрионов мыши, выделенных на стадии интерфазы, была значительно выше после криоконсервирования, чем эмбрионов, находившихся на стадии митоза.

В третьей серии экспериментов изучали влияние полного цикла криоконсервирования методом витрификации на жизнеспособность 2-клеточных эмбрионов мыши при использовании ЭГ в качестве проникающего криопротектора. Криоконсервирование с использованием метода быстрого замораживания проводили согласно [2, 3]. Оптимизацию некоторых режимных параметров выполняли на основе проведенных ранее исследований [5-7]. Времена экспозиции эмбрионов в среде замораживания составили 45 с и 1,5 мин. Время экспозиции 3 мин было исключено как не оптимальное на основе полученных результатов во второй серии экспериментов. Время эквilibрации в 10%-м растворе ЭГ было сокращено до 5 мин. Известно, что ступенчатое добавление криопротектора к клеткам перед замораживанием является одним из ключевых подходов в режимах быстрого замораживания, что позволяет избежать появления резких концентрационных перепадов на клеточной мембране при контакте со средой замораживания [12, 19, 26, 27]. Однако время эквilibрации в растворах криопротектора, как правило, подбирается эмпирически. На основе проведенных ранее исследований по определению транспортных характеристик плазматических мембран эмбрионов мыши нами было показано, что насыщение 2-клеточных эмбрионов мыши этиленгликолем в его 10%-м растворе на 95-100% происходит в течение 3 мин эквilibрации [5-7].

В табл. 2 представлены результаты оценки уровня морфологической сохранности и жизнеспособности деконсервированных 2-клеточных эмбрионов мыши.

plasm from the state, inherent to the interphase stage towards that, typical for mitosis, by omitting the corresponding molecular rearrangements in cytoplasm and breaking the conformity in kario- and cytokinesis processes. According to our data, the murine embryos at mitotic stage contain the minimum cytoplasm concentration of potassium. Consequently, this element loss under the medium osmotic factor effect may significantly affect cell cryoresistance. This is testified by the research results [13, 14, 16], where the viability of frozen-thawed murine embryos, isolated at interphase stage was shown as significantly higher than those, being at a mitotic stage.

In the third experimental session we have studied the effect of a complete cryopreservation cycle by vitrification on 2-cell murine embryo viability when using EG as a penetrating cryoprotectant. Cryopreservation with the method of rapid freezing was carried-out according to the papers [2, 3]. The optimisation of some regimen parameters was performed basing on the previous researches [5-7]. Time of embryo exposure in freezing medium was 45 sec and 1.5 min. Exposure time of 3 min was excluded as a non-optimal one basing on the results obtained during the second experimental session. Equilibration time in 10% EG solution was reduced to 5 min. Step-like cryoprotectant addition into cells before freezing is one of the key approaches in rapid freezing regimens, enabling to avoid the occurrence of sharp concentrated differentials on cell membrane when contacting with freezing medium [12, 19, 26, 27]. However as a rule the equilibration time in cryoprotectant solution is empirically selected. Basing on the previous research on determining transport characteristics of murine embryo plasmatic membranes we have demonstrated that the saturation of 2-cell murine embryos with ethylene glycol in its 10% solution occurs by 95-100% within 3 min's equilibration [5-7].

The Table 2 shows the results of estimation of the level of morphological integrity and viability of frozen-thawed 2-cell murine embryos.

Enhancing exposure time in ethylene glycol-sucrose medium from 45 sec to 1.5 min does not result in a visible decrease in the level of morphological integrity of frozen-thawed 2-cell murine embryos but results in a statistically significant reduction of their viability level. The typical embryo injuries after cryopreservation were cracks and ruptures in zona pellucida, blastomere lysis. The contribution in these damages may be assumed as resulted from by both osmotic and mechanical factors, in particular, ice re-crystallisation processes, occurring after devitrification at thawing stage. The vitrification possibility of extra- and intracellular content in the studied ethylene glycol-sucrose medium at the freezing stage even with 5°C/min freezing rate has been cryomicroscopically shown. An appearance of crystallisation structure was noted at thawing stage

Таблица 2. Влияние полного цикла криоконсервирования методом витрификации в этиленгликоль-сахарозной среде (30% ЭГ и 0,7 М сахарозы) на морфологическую сохранность и жизнеспособность 2-клеточных эмбрионов мыши

Table 2. Effect of a complete cryopreservation cycle with vitrification method in ethylene glycol-sucrose medium (30% EG and 0.7 M sucrose) on morphological integrity and viability of 2-cell murine embryos

Группы Groups	Количество эмбрионов Number of embryos	Время экспозиции в среде замораживания, с Exposure time in freezing medium, sec	Количество деконсервированных эмбрионов без морфологических нарушений, % (n) Number of frozen-thawed embryos with no morphological disorders, % (n)	Количество эмбрионов, достигших стадии бластоцисты, % (n) Number of embryos, approaching blastocyst stage, % (n)
I	98	45	78,6±13,1 (82)	74,4±3,6* (61)
II	74	90	73,1±7,2 (56)	55,4±7,6* (31)

Примечание: * – $p < 0,05$.

Notes: * – $p < 0.05$.

Увеличение времени экспозиции в этиленгликоль-сахарозной среде от 45 с до 1,5 мин не приводит к заметному снижению уровня морфологической сохранности деконсервированных 2-клеточных эмбрионов мыши, однако уровень их жизнеспособности достоверно снижается. Характерными повреждениями эмбрионов после криоконсервирования были трещины и разрывы *zona pellucida*, лизис бластомеров. Можно предположить, что вклад в эти повреждения наряду с осмотическим фактором могут вносить механические факторы, в частности, процессы рекристаллизации льда, имеющие место после девитрификации на этапе отогрева. Криомикроскопическими исследованиями показана возможность витрификации вне- и внутриклеточного содержимого в исследуемой этиленгликоль-сахарозной среде на этапе замораживания даже при скорости замораживания 5°C/мин. На этапе отогрева отмечалось появление кристаллизационной структуры [4]. Не исключено также, что причиной трещин и разрывов могут стать термомеханические напряжения, возникающие в витрифицированной фазе при охлаждении или нагреве.

Выводы

Таким образом, криоконсервирование методом витрификации в этиленгликоль-сахарозной среде позволяет сохранить жизнеспособными более 70% 2-клеточных эмбрионов мыши. Основную ответственность за повреждение бластомеров в этой процедуре несут этапы экспозиции в среде замораживания и замораживания-оттаивания. Снижение жизнеспособности эмбрионов с увеличением времени экспозиции в среде замораживания может быть следствием сенсibilизации эмбрионов к постгипертоническому лизису в результате дополнительного поступления в них криопр-

[4]. Thermomechanical tensions, occurring in vitrified phase under cooling down or thawing are not excluded as causing cracks and ruptures as well.

Conclusions

Thus, the vitrification procedure for cryopreservation in ethylene glycol-sucrose medium enables to preserve viable more than 70% of 2-cell murine embryos. The principal responsibility for blastomere damaging during this procedure belongs to stages of exposure in freezing medium and freeze-thawing. A decrease in embryo viability with exposure time increase in freezing medium may result from embryos sensibilization to a post-hypertonic lysis due to additional cryoprotectant entering into them and cell ion homeostasis disorder under osmotic factor effect.

The character of embryo morphologic injuries after a complete cryopreservation cycle testifies to a significant contribution in cell damaging of mechanical factors such as: ice re-crystallisation process at thawing stage and thermomechanical tensions in a sample.

References

1. *Biology of mammalian development*. Methods: Translated from English / Ed. by M. Mank.– Moscow: Mir, 1990.– 406 p.
2. *Isachenko V.V., Grischenko V.I., Ostashko F.I. et al.* Ultrarapid freezing of rat and cow embryos without "standard equilibration" // *Problems of Cryobiology*.– 1994.– N3.– P. 3-6.
3. *Krivokharchenko A.S., Vilianovich L.I., Serobyan G.A. et al.* Murine embryo survival after ultrarapid freezing using different ways and various cryoprotectants // *Problemy Reproduktsii*.– 1995.– N4.– P. 13-18.
4. *Kuleshova L.G., Pishko O.V.* Cryomicroscope analysis of murine embryo freezing of early development stages // *Problems of Cryobiology*.– 2005.– Vol. 15, N2.– P. 119-128.
5. *Pishko O.V.* Effect of ethylene glycol concentration on membrane permeability of one- and two-cell murine embryos // *Problems of Cryobiology*.– 2004.– N2.– P. 56-61.
6. *Pishko O.V., Smolyaninova E.I., Rozanov L.F.* Osmotic behaviour of murine oocytes and embryos in ethylene glycol

тектора и нарушения клеточного ионного гомеостаза под действием осмотического фактора.

Характер морфологических нарушений эмбрионов после полного цикла криоконсервирования свидетельствует о значительном вкладе в повреждение клеток механических факторов: процесса рекристаллизации льда на этапе отогрева и термомеханических напряжений в образце.

Литература

1. *Биология развития млекопитающих*. Методы: пер. с англ. / Под ред. М. Манк.– М.: Мир, 1990.– 406 с.
2. *Исаченко В.В., Грищенко В.И., Осташко Ф.И. и др.* Сверхбыстрое замораживание эмбрионов крыс и коров без "классической эквilibрации" // Пробл. криобиологии.– 1994.– №3.– С. 3-6.
3. *Кривохарченко А.С., Вильянович Л.И., Серобян Г.А. и др.* Выживаемость эмбрионов мышей после сверхбыстрого замораживания разными способами с использованием различных криопротекторов // Пробл. репродукции.– 1995.– №4.– С. 13-18.
4. *Кулешова Л.Г., Пишко О.В.* Криомикроскопический анализ замораживания эмбрионов мыши ранних стадий развития // Пробл. криобиологии.– 2005.– Т. 15, №2.– С. 119-128.
5. *Пишко О.В.* Влияние концентрации этиленгликоля на проницаемость мембран одно-и двухклеточных эмбрионов мыши // Пробл. криобиологии.– 2004.– №2.– С. 56-61.
6. *Пишко О.В., Смольянинова Е.И., Розанов Л.Ф.* Осмотична поведінка ооцитів та ембріонів миші в гіпертонічних розчинах етиленгліколю // Біологія тварин.– 2004.– Т. 6, №1-2.– С. 373-377.
7. *Пишко О.В., Смольянинова Е.И., Коваленко И.Ф. и др.* Прогнозирование осмотического поведения эмбрионов мыши на основных этапах криоконсервирования // Пробл. криобиологии.– 2004.– №3.– С. 3-8.
8. *Плохинский Н.А.* Алгоритм биометрии.– М.: Изд-во Моск. ун-та.– 1980.– 150 с.
9. *Погорелов А.Г., Смольянинова Е.И., Погорелова В.Н., Гольдштейн Д.В.* Электронно-зондовый микроанализ калия и фосфора в ооцитах и зиготах мыши // Онтогенез.– 2005.– Т. 36, №2.– С. 123-127.
10. *Погорелов А.Г., Гольдштейн Д.В., Смольянинова Е.И., Сахарова Н.Ю.* Электронно-зондовый микроанализ внутриклеточной концентрации калия в ранних эмбрионах мыши // ДАН.– 2005.– Т. 400.– С. 38-39.
11. *Смольянинова Е.И., Погорелов А.Г., Лисина Е.Г. и др.* Влияние среды замораживания на жизнеспособность и катионный состав ранних эмбрионов мыши // Пробл. криобиологии.– 2005.– №3.– С. 3-10.
12. *Смольянинова Е.И., Хроменкова О.Б., Жерноклев Г.В., Пишко О.В.* Влияние эквilibрации в среде замораживания на осмотическую устойчивость и жизнеспособность 8-клеточных эмбрионов мыши // Пробл. криобиологии.– 2004.– №1.– С. 3-11.
13. *Balakier H., Zenzes M., Wang P. et al.* The effect of cryopreservation on the development of S- and G₂-phase mouse embryos // J. In Vitro Fert. Embryo Transf.– 1991.– Vol. 8, N2.– P. 89-95.
14. *Bautista J.A., Takahashi Y., Kanagava H.* In vitro viability of mouse zygotes vitrified in ethylene glycol // Jpn. J. Vet. Res.– 1998.– Vol. 45, N4.– P. 193-198.
15. *Bautista J.A., Takahashi Y., Kanagava H.* In vitro viability of mouse 8-cell embryos vitrified in mole solution ethylene glycol // Jpn. J. Vet. Res.– 1997.– Vol. 45, N2.– P. 67-73.
16. *Chedid S., Van den Abel E., Vansteirteghen B.C.* Effects of cryopreservation on survival and development of interphase- and mitotic-stage 1-cell mouse embryos // Hum. Reprod.– 1992.– Vol. 7, N10.– P. 1451-1456.
17. *Cseh S., Wang G., Corselli J. et al.* Rapid freezing of mouse embryos in ethylene glycol at different preimplantation stages // Acta Vet. Hungarica.– 1996.– Vol. 44, N4.– P. 457-465.
18. *Day M.L., Johnson M.H., Cook D.J.* A cytoplasmic cell cycle controls the activity of a K⁺ channel in preimplantation mouse embryos // The EMBO J.– 1998.– Vol. 17, N7.– P. 1952-1960.
19. *de la Pena E.C., Takahashi Y., Atabay E.C. et al.* Vitrification of mouse oocytes in ethylene glycol-raffinose solution: effects of preexposure of ethylene glycol or raffinose on oocyte viability // Cryobiology.– 2001.– Vol. 42, N2.– P. 103-111.
20. *Friedler S., Ciudice L.C., Lamb E.I.* Cryopreservation of embryos and ova // Fertil. Steril.– 1988.– Vol. 49, N5.– P. 743-764.
21. *Leibo S.P., Songsasen V.* Cryopreservation of gametes and embryos of non-domestic species // Theriogenology.– 2002.– Vol. 57, N1.– P. 303-326.
22. *Nakao K., Nakagata N., Katsuki M.* Simple and efficient vitrification procedure for cryopreservation of mouse embryos // Exp. Anim.– 1997.– Vol. 46, N3.– P. 231-234.
23. *Pogorelov A.G., Katkov I.I., Smolyaninova E.I., Goldshtein D.V.* Changes in intracellular potassium and sodium content of 2-cell mouse embryos induced by exposition to vitrification concentrations of ethylene glycol // Cryo-Letters.– 2006.– Vol. 27, N2.– P. 87-98.
24. *Shaw J.M., Ward C., Trounson A.O.* Evaluation of propanediol, ethylene glycole, sucrose and antifreeze proteins on the survival of slow-cooled mouse pronucleare and 4-cell embryos // Hum. Reprod.– 1995.– Vol. 10, N2.– P. 396-402.
25. *Trounson A.O., Peura A., Kirby C.* Ultrarapid freezing a new low-cost and effective method of embryo cryopreservation // Fertil. Steril.– 1987.– Vol. 48, N5.– P. 843-850.

- and mitotic-stage 1-cell mouse embryos // Hum. Reprod.– 1992.– Vol. 7, N10.– P. 1451-1456.
17. Cseh S., Wang G., Corselli J. et al. Rapid freezing of mouse embryos in ethylene glycol at different preimplantation stages // Acta Vet. Hungarica.–1996.– Vol. 44, N4.– P. 457-465.
 18. Day M.L., Johnson M.H., Cook D.J. A cytoplasmic cell cycle controls the activity of a K⁺ channel in preimplantation mouse embryos // The EMBO J.– 1998.– Vol. 17, N7.– P. 1952-1960.
 19. de la Pena E.C., Takahashi Y., Atabay E.C. et al. Vitrification of mouse oocytes in ethylene glycol-*raffinose* solution: effects of preexposure of ethylene glycol or *raffinose* on oocyte viability// Cryobiology.– 2001.– Vol. 42, N2.– P.103-111.
 20. Friedler S., Ciudice L.C., Lamb E.I. Cryopreservation of embryos and ova // Fertil. Steril.– 1988.– Vol. 49, N5.– P. 743-764.
 21. Leibo S.P., Songsasen V. Cryopreservation of gametes and embryos of non-domestic species // Theriogenology.– 2002.– Vol. 57, N1.– P. 303-326.
 22. Nakao K., Nakagata N., Katsuki M. Simple and efficient vitrification procedure for cryopreservation of mouse embryos // Exp. Anim.– 1997.– Vol. 46, N3.– P. 231-234.
 23. Pogorelov A.G., Katkov I.I., Smolyaninova E.I. Goldshtein D.V. Changes in intracellular potassium and sodium content of 2-cell mouse embryos induced by exposition to vitrification concentrations of ethylene glycol // Cryo-Letters.– 2006.– Vol. 27, N2.– P. 87-98.
 24. Shaw J.M., Ward C., Trounson A.O. Evaluation of propanediol, ethylene glycole, sucrose and antifreeze proteins on the survival of slow-cooled mouse pronucleare and 4-cell embryos // Hum. Reprod.– 1995.– Vol. 10, N2.– P. 396-402.
 25. Trounson A.O., Peura A., Kirby C. Ultrarapid freezing a new low-cost and effective method of embryo cryopreservation // Fertil. Steril.– 1987.– Vol. 48, N5.– P. 843-850.
 26. Uechi H., Tsutsumi O., Morita Y. et al. Comparison of the effects of controlled- rate cryopreservation and vitrification on 2-cell mouse embryos and their subsequent development // Hum. Reprod.– 1999.– Vol.14, N11.– P. 2827-2832.
 27. Vasuthevan S., Ng S.C., Bongso A., Ratnam S.S. Embryonic behavior of two-cell mouse embryos frozen by the one- and two-step ultrarapid techniques // J. Assist. Reprod. Genot.- 1992.– Vol. 9, N2.– P. 545-550.

Accepted in 16.11.2007

Поступила 16.11.2007