

## Криомикроскопический анализ замораживания эмбрионов мыши ранних стадий развития

Л.Г. КУЛЕШОВА, О.В. ПИШКО

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

## Cryomicroscopic Analysis of Freezing of Mouse Embryos at Early Developmental Stage

L.G. KULESHOVA, O.V. PISHKO

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

В работе методом криомикроскопии изучено влияние предварительного обезвоживания эмбрионов мыши ранних стадий развития и их насыщения высокой концентрацией проникающего криопротектора этиленгликоля на вероятность внутриклеточного льдообразования. Показано, что предварительное обезвоживание в 0,5 и 1,0 М растворах NaCl и сахарозы не исключает внутриклеточную кристаллизацию. Установлено, что использование криоконсервирующей смеси (100%-го этиленгликоля и 1 М сахарозы в соотношении 3:7) приводит к стеклованию даже при медленных скоростях замораживания (5°C/мин).

**Ключевые слова:** криомикроскопия, эмбрионы мыши ранних стадий развития, дегидратация, внутриклеточная кристаллизация, витрификация.

В роботі методом кріомікроскопії вивчено вплив попереднього зневоднення ембріонів миші ранніх стадій розвитку і їх насичення високою концентрацією проникаючого криопротектора етиленгліколю на вірогідність внутрішньоклітинного льодоутворення. Показано, що попереднє зневоднення в 0,5 і 1,0 М розчинах NaCl і сахарози не виключає внутрішньоклітинної кристалізації. Встановлено, що використання кріоконсервуючої суміші (100%-го етиленгліколю і 1 М сахарози в співвідношенні 3:7) призводить до склування навіть при повільних швидкостях заморожування (5°C/мин).

**Ключові слова:** кріомікроскопія, ембріони миші ранніх стадій розвитку, дегідратація, внутрішньоклітинна кристалізація, вітрифікація.

There was studied the effect of preliminary dehydration of mouse embryos at early stage of development and their saturation with penetrating cryoprotectant, ethylene glycol of high concentration on the probability of intracellular ice formation. It has been shown that preliminary dehydration in 0.5 and 1.0 M NaCl and sucrose solutions does not exclude an intracellular crystallisation. The mixture (100% ethylene glycol and 1M sucrose in the 3:7 ratio) as cryopreserving medium has been found resulting in vitrification even at slow freezing rates (5°C/min).

**Key-words:** cryomicroscopy, mouse early embryos, dehydration, intracellular crystallisation, vitrification.

Фазовый переход “вода-лед”, являющийся неотъемлемым этапом технологического процесса низкотемпературного консервирования биологических объектов, обуславливает возникновение целой цепочки повреждающих факторов, к которым, прежде всего, следует отнести дегидратацию и внутриклеточную кристаллизацию. Оптимальная скорость замораживания, специфичная для конкретного типа клеток, обеспечивает баланс трансмембранного массообмена “клетка-среда”, в результате которого обезвоживание клеток, с одной стороны, является достаточным для исключения вероятности внутриклеточного льдообразования, а с другой – не достигает критического уровня, чтобы привести к неизбежному повреждению клеток. Существенную роль в этом процессе играют особенности строения плазматических мембран клеток, лимитирующих водный поток.

**Адрес для корреспонденции:** Кулешова Л.Г., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.:+38 (057) 373-38-71, факс: +38 (057) 373-30-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

“Water-ice” phase transition being an integral stage of technological process of low temperature preservation of biological objects, stipulates an appearance of the whole chain of damaging factors which are firstly represented by dehydration and intracellular crystallisation. Optimal freezing rate, which is specific for each certain cell type, provides the balance of “cell-medium” transmembrane exchange in the result of which cell dehydration from one side is sufficient for excluding the probability of intracellular ice formation and from another it does not reach critical level to result in an inevitable cell damage. Significant role in this process is played by the peculiarities of the structure of plasma membranes of cells limiting an aqueous flux.

Plasma membranes of mammalian embryos are characterised by low permeability for water molecules [13, 14]. In this connection optimal cooling rates for embryos make 0.2-0.5°C/min [7, 17, 18]. Under cooling

**Address for correspondence:** Kuleshova L.G., Institute for Problems of Cryobiology&Cryomedicine of the Natl. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str.,Kharkov, Ukraine 61015; tel.:+380 57 373-38-71, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Плазматические мембраны эмбрионов млекопитающих характеризуются низкой проницаемостью для молекул воды [13,14]. В связи с этим оптимальные скорости охлаждения эмбрионов составляют 0,2-0,5°C/мин [7,17,18]. При скоростях охлаждения выше 0,5°C/мин вероятность внутриклеточного льдообразования возрастает. Проникающие криопротекторы, замещая или частично связывая внутриклеточную воду, снижают вероятность образования внутриклеточных кристаллов, способствуют измельчению кристаллической структуры, что коррелирует с повышением сохранности биологических объектов.

Известно, что эмбрионы мыши ранних стадий развития очень чувствительны к действию различных физико-химических факторов [3], что может быть связано с возрастанием интенсивности процессов синтеза в клетке. На стадии двух бластомеров осуществляется переход контроля от материнского генома к эмбриональному [8], в результате чего резко увеличивается белковый синтез и появляются характерные белки [9]. На этой стадии эмбрионального развития начинается также синтез РНК. Поэтому криоконсервирование эмбрионов мыши на ранних стадиях развития – весьма сложная задача.

Цель данной работы – изучение влияния предварительного обезвоживания эмбрионов мыши ранних стадий развития и их насыщения высокой концентрацией проникающего криопротектора на вероятность внутриклеточного льдообразования.

### Материалы и методы

Материалом исследований служили одно- и двухклеточные эмбрионы мыши линии СВА, полученные методом суперовуляции [2]. Качество выделенных клеток, а также их сохранность в экспериментальных исследованиях оценивали визуально по общепринятым морфологическим признакам: целостность *zona pellucida* и цитоплазматической мембраны, прозрачность цитоплазмы, правильная форма бластомеров [1]. Различный уровень дегидратации клеток достигали инкубацией эмбрионов в течение 10 мин при 22°C в 0,5 и 1 М растворах сахарозы или NaCl. Насыщение эмбрионов проникающим криопротектором этиленгликолем (ЭГ) проводили ступенчатым повышением его концентрации в среде инкубации [6]. На первом этапе эмбрионы выдерживали в 1,8 М растворе ЭГ 10 мин, а затем на 1,5 мин переносили в среду замораживания, представляющую смесь 100%-го ЭГ и 1 М сахарозы в соотношении 3:7 [4]. Уровень дегидратации клеток в исследуемых средах контролировали волюмометрически по изменению клеточного объема. Для

rates higher than 0.5°C/min the probability of intracellular ice formation increases. Penetrating cryoprotectants by substitution or binding of intracellular water reduce the probability of formation of intracellular crystals, contributing to the lessening of crystal structure, that correlates to a rise in the integrity of biological objects.

It is known that mouse embryos of early developmental stages are very sensitive to the effect of different physical and chemical factors [3], that may be related to the increase in intensity of synthesis processes in a cell. At the stage of two blastomeres there is a control transition from the mother's genome to embryonic one [8], resulting in a sharp increase of protein synthesis and appearance of characteristic proteins [9]. At this stage of embryonic development the RNA synthesis also starts. Therefore cryopreservation of mouse embryos at early developmental stages is quite complicated task.

The research aim of this work was to study the effect of preliminary dehydration of mouse embryos at early developmental stages and their saturation with cryoprotectant of a high concentration on the probability of intracellular ice formation.

### Materials and methods

One- and two-cell embryos of CBA mice obtained by superovulation served as a research material [2]. The quality of isolated cells as well as their integrity in experiments was visually estimated according to traditional morphological parameters: integrity of *zona pellucida* and cytoplasm membrane, cytoplasm transparency, proper shape of blastomeres [1]. Different level of dehydration of cells was achieved by incubation of embryos at 22°C in 0.5M sucrose or NaCl for 10 min. Saturation of embryos with penetrating cryoprotectant: ethylene glycol (EG) was performed stepwise by increasing its concentration in incubation medium [6]. At the first stage embryos were maintained in 1.8M EG for 10 min and then for 1.5 min they were transferred into freezing medium being the mixture of 100% EG and 1M sucrose in the 3:7 ratio [4]. The level of cell dehydration in the studied media was controlled volumetrically on the change of cell volume. Physiological Dulbecco medium was used to prepare the solutions. All preliminary experiments with mouse oocytes and embryos (dehydration, saturation with cryoprotectant) were carried-out on embryonic plates with MBS-9 microscope (LOMO, USSR). Afterwards 2-3 embryos with incubation medium was transferred into a specially designed well, which was placed into operating chamber of cryoassembly to light microscope MBI-15U (LOMO, USSR) [5]. A well prevented drying of preparation and provided in-time search for cells in microscope vision field. Cell suspension was cooled with the rate of 5°C/min down to -30°C. To

приготовления растворов использовали физиологическую среду Дюльбекко. Все предварительные экспериментальные манипуляции с яйцеклетками и эмбрионами мыши (дегидратацию, насыщение криопротектором) проводили в эмбриональных стеклах под микроскопом МБС-9 (ЛОМО, СССР). Затем 2-3 эмбриона со средой инкубации переносили в специально сконструированную ячейку, которую помещали в рабочую камеру криоприставки к световому микроскопу МБИ-15У (ЛОМО, СССР) [5]. Ячейка предохраняла препарат от высыхания и обеспечивала оперативный поиск клеток в поле зрения микроскопа. Суспензию клеток охлаждали со скоростью 5°C/мин до -30°C. Для исключения переохлаждения в ячейку вносили затравочные кристаллы AgJ. Температуру контролировали в рабочей камере криоприставки. Скорость отогрева составляла 5°C/мин. Кинетику процессов замораживания-оттаивания регистрировали фотографически. Увеличение при съемках во всех экспериментах  $\times 100$ .

Эксперименты проведены в соответствии с "Общими принципами экспериментов на животных", одобренными I Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2001) и согласованными с положениями "Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей" (Страсбург, 1985).

### Результаты и обсуждение

Анализ криомикроскопических исследований показал следующее. При замораживании зигот мыши в физиологической среде Дюльбекко фазовый переход происходил одновременно во вне- и внутриклеточной среде (рис. 1, б). Внеклеточный лед представлял собой мелкокристаллическую структуру, которая рекристаллизовалась при дальнейшем понижении температуры (рис. 1, в). Рекристаллизационные процессы внутри клетки отсутствовали. Постепенное просветление зигот на этапе отогрева свидетельствовало об укрупнении внутриклеточных кристаллов (рис. 1, г). В зоне интенсивного плавления полное исчезновение внутриклеточного льда предшествовало плавлению внеклеточного кристаллического матрикса (рис. 1, д). Повреждение зигот прослеживалось сразу же после плавления внутриклеточных кристаллов (рис. 1, д) и сопровождалось полным разрывом плазматических мембран и выходом внутриклеточного содержимого из клетки (рис. 1, е). Аналогичные кристаллизационные процессы и повреждения наблюдались и при замораживании в физиологической среде двухклеточных эмбрионов мыши.

exclude overcooling seeding crystals AgJ were introduced into a well. Temperature was controlled in operating chamber of cryoassembly. Thawing rate was 5°C/min. Kinetics of freeze-thawing processes was recorded photographically, magnification for all experiments made  $\times 100$ .

The experiments were carried-out in accordance with "General principles of experiments in animals", approved by the First National Congress on Bioethics (Kiev, 2001) and co-ordinated with the statements of "European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes" (Strasbourg, 1985).

### Results and discussion

Analysis of cryomicroscopic studies has shown as follows. During freezing of mouse zygotes in physiological Dulbecco medium a phase transition took place simultaneously in extra- and intracellular medium (Fig. 1, b). Extracellular ice was of a fine structure which was re-crystallised at further temperature reduction (Fig. 1, c). Re-crystallisation processes are absent inside a cell. In the zone of intensive melting a complete disappearance of intracellular ice preceded the melting of extracellular crystal matrix (Fig. 1, d). Damage of zygotes was traced just after melting of intracellular crystals (Fig. 1, d) and accompanied with a complete rupture of plasmatic membranes and release of intracellular content out of cell (Fig. 1, e). Analogous crystallisation processes and damages were observed also during freezing of mouse two-cell embryos in physiological medium.

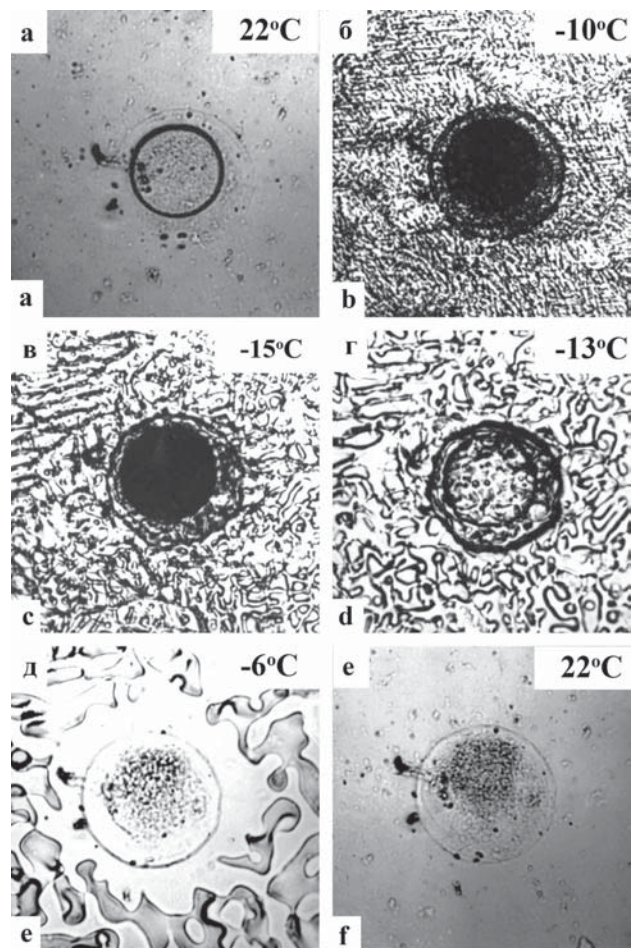
Relative volumes of mouse embryos in dehydrating solutions providing various level of cell dehydration are presented in the Table.

Preliminary dehydration of mouse zygote in 0.5 and 1 M solutions NaCl resulted into reduction of their volume maximum twice (Table, Fig. 2, a; 2, b; 3, a; 3, b). Cell cooling in these solutions was accompanied by loosening of zygote cytomatrix of and insignificant increase in their volume, which at the temperature lower than 0°C was 0.6 of initial volume. Phase transition in NaCl solutions as well as in Dulbecco medium took place simultaneously in extra- and intracellular medium. In 0.5 M NaCl ice formation was accompanied by appearance of small crystals (Fig 2, c) meanwhile in 1M NaCl linear structures of versatile orientation were formed (Fig. 3, c). Re-crystallisation processes in both cases resulted in enlargement of crystal seeds (Fig. 2, d; 3, d). During thawing the damages of plasma membranes of mouse zygotes were also observed just after completing melting of intracellular crystals. In 0.5 NaCl the zygote cytomatrix if even it kept some compactness, but had an improper shape and single granules released out of a cell (Fig. 2, g). In 1M NaCl there was noted a complete



Относительные объемы эмбрионов мыши в дегидратирующих растворах, обеспечивающих различный уровень обезвоживания клеток, приведены в таблице.

Предварительное обезвоживание зигот мыши в 0,5 и 1 М растворах NaCl приводило к уменьшению их объема максимум в 2 раза (таблица, рис. 2, а; 2, б; 3, а; 3, б). Охлаждение клеток в данных растворах сопровождалось разрыхлением цитоматрикса зигот и незначительным увеличением их объема, который при температуре ниже 0°C составлял 0,6 исходного объема. Фазовый переход в растворах NaCl, как и в среде Дюльбекко, происходил одновременно во вне- и внутриклеточной среде. В 0,5 М растворе NaCl льдообразование сопровождалось высыпанием мелких кристаллов (рис. 2, в), в то время как в 1 М растворе NaCl формировались разнонаправленные линейные структуры (рис. 3, в). Рекристаллизационные процессы в обоих случаях приводили к укрупнению кристаллических зерен (рис. 2, г; 3, г). При отогреве повреждения плазматических мембран зигот мыши также наблюдались сразу же после завершения плавления внутриклеточных кристаллов. В 0,5 М растворе NaCl цитоматрикс зиготы хотя и сохранял некоторую компактность, однако имел неправильные очертания, и единичные гранулы выходили из клетки (рис. 2, ж). В 1 М растворе NaCl отмечалась полная дезорганизация внутриклеточных структур зиготы (рис. 3, ж). При температуре 22°C в 0,5 М растворе NaCl *zona pellucida* визуально оставалась не поврежденной (рис. 2, з), в то время как в 1 М растворе NaCl она была полностью разрушена (рис. 3, з). По-видимому, повреждения ранних эмбрионов мыши были связаны не только с образованием внутриклеточных кристаллов льда, но и с непосредственным длительным химическим воздействием



**Fig. 1.** Kinetics of freeze-thawing of mouse zygotes in Dulbecco physiological solution: a – intact cell.

**Fig. 1.** Kinetics of freeze-thawing of mouse zygotes in Dulbecco physiological solution: a – intact cell.

disorganisation of intracellular structures of zygote (Fig. 3, g). At 22°C in 0.5M NaCl *zona pellucida* visually remained undamaged (Fig. 2, h), whilst in 1M NaCl it was completely destroyed (Fig. 3, h).

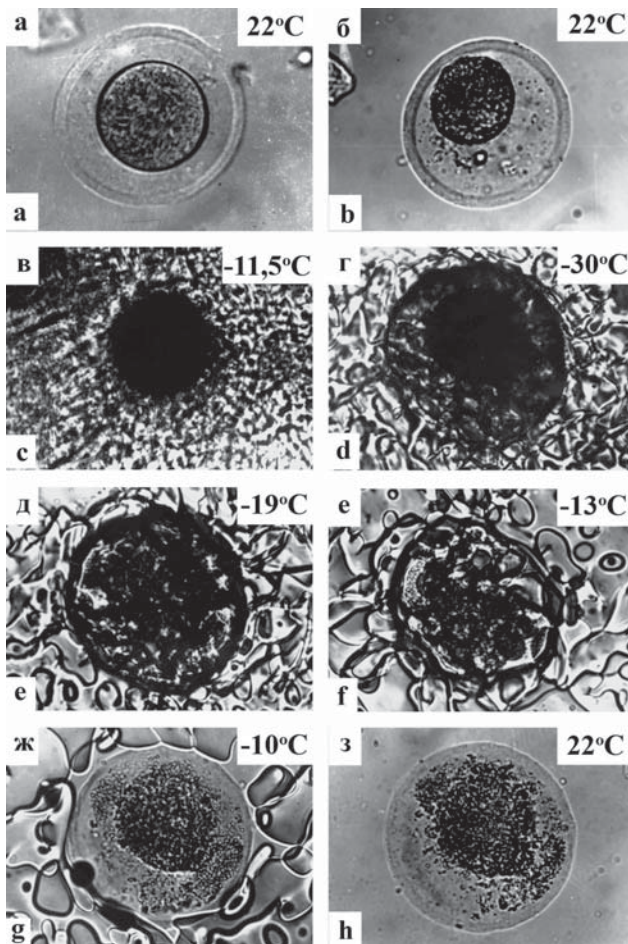
Относительный объем клеток в дегидратирующих растворах  
Relative volume of cells in dehydrating solutions

Концентрация раствора, моль Solution concentration, M	NaCl	Сахароза Sucrose		Этиленгликоль Ethylene glycol		Среда замораживания Freezing medium
	Зигота Zygote	Зигота Zygote	Двухклеточный эмбрион Two – cell embryo	Зигота Zygote	Двухклеточный эмбрион Two – cell embryo	Двухклеточный эмбрион Two – cell embryo
0,5	0,47±0,009	0,77±0,012	0,79±0,011	–	–	–
1	0,50±0,010	0,61±0,010	0,63±0,009	–	–	–
5,37	–	–	–	0,37±0,011	0,33±0,008	–
5,37 ЭГ в 1 М сахарозы 5.37 EG in 1 M sucrose	–	–	–	–	–	0,40±0,007

**Примечание:** результаты достоверны для P<0,05.

**Note:** results are statistically significant for P<0.05.



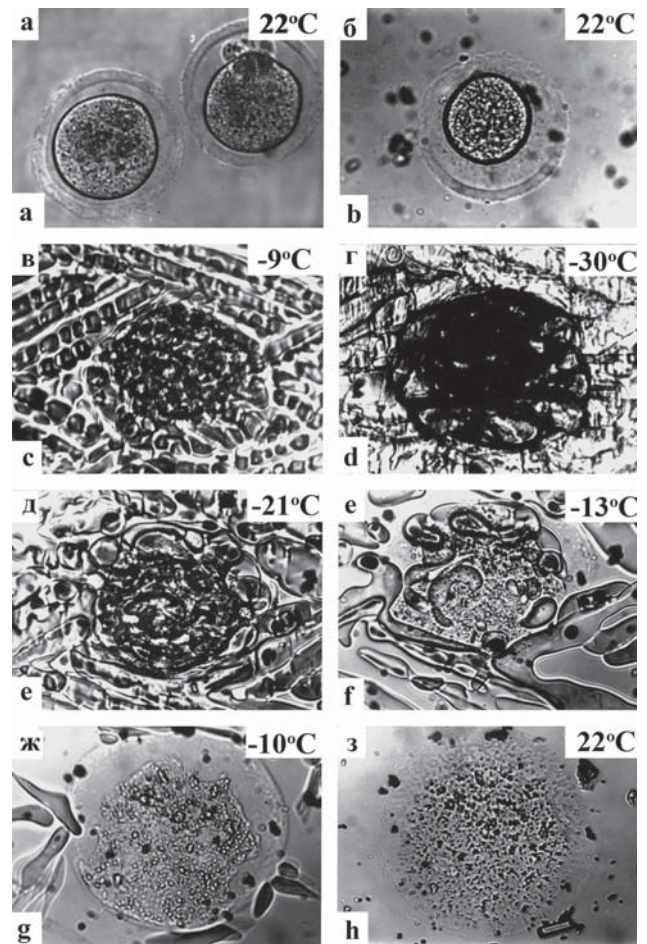


**Рис.2.** Кинетика замораживания-оттаивания зиготы мыши в 0,5 М растворе NaCl: а – интактная клетка; б – обезвоживание зиготы мыши в 0,5 М растворе NaCl.

**Fig. 2.** Kinetics of freeze-thawing of mouse zygotes in 0.5M NaCl: a– intact cell, b – dehydration of mouse zygote in 0.5M NaCl.

высоких концентраций электролита на клеточные структуры.

В растворах 0,5 и 1,0 М сахарозы уровень обезвоживания зигот и двухклеточных эмбрионов был ниже, чем в NaCl (таблица, рис.4, б; 5, б; 6, б), что естественно, поскольку эти растворы менее осмотически активны. При охлаждении размер и морфология дегидратированных клеток сохранялись. Льдообразование во внеклеточном растворе сопровождалось формированием более измельченной структуры (рис. 4, г, 5, в, 6, в), чем в солевом, что обусловлено повышенной вязкостью криозащитной среды, содержащей сахарозу. При замораживании в данных средах как зигот, так и двухклеточных эмбрионов отмечали смещение температуры внутриклеточного фазового перехода относительно температуры кристаллизации во внеклеточном растворе. Переохлаждение цитоплазмы эмбрионов составляло не более 1°C (рис.4, д; 5, г; 6, г). Важно отметить, что внутриклеточная кристаллизация в двухклеточных



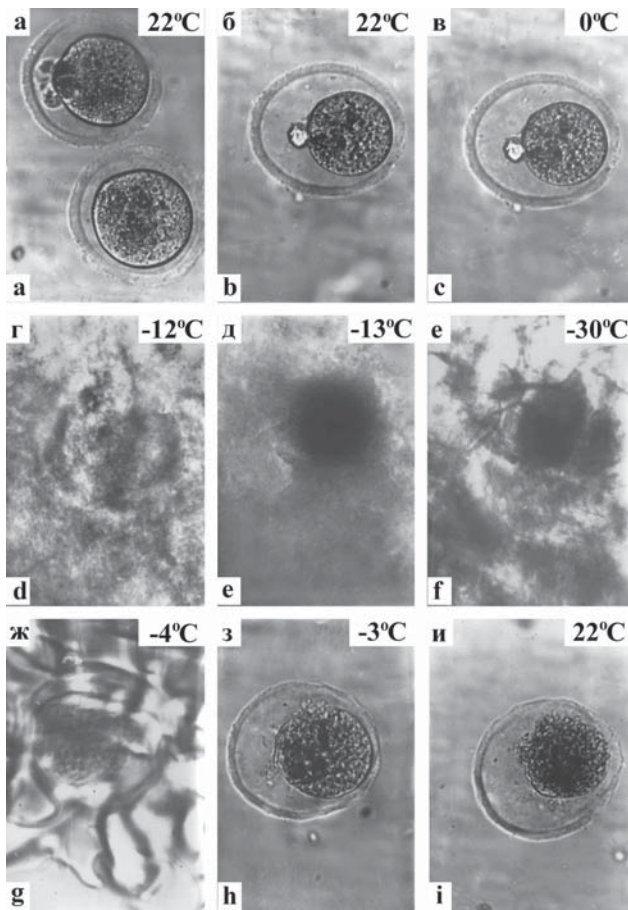
**Рис.3.** Кинетика замораживания-оттаивания зиготы мыши в 1,0 М растворе NaCl: а – интактная клетка; б – обезвоживание зиготы мыши в 1,0 М растворе NaCl.

**Fig. 3.** Kinetics of freeze-thawing of mouse zygotes in 1.0M NaCl: a – intact cell, b – dehydration of mouse zygote in 1.0M NaCl.

Impairments of mouse early embryos were associated evidently with not only the formation of intracellular ice crystals but also with a direct chemical effect of electrolyte high concentrations on cell structures.

In 0.5 and 1.0 M sucrose the dehydration level for zygotes and two-cell embryos was lower than the one for NaCl (Table, Fig. 4, б; 5, б; 6, б), that is quite natural because these solutions are less osmotically active. During cooling the size and morphology of dehydrated cells were kept. Ice formation in extracellular solution was accompanied with the formation of finer structure (Fig. 4, д; 5, в; 6, в) in comparison with saline one, that is explained by an increased viscosity of sucrose-containing cryo-protective medium. During freezing in these media of both zygotes and two-cell embryos there was noted a temperature shift of intracellular phase transition in respect of crystallisation temperature in extracellular solution. Overcooling of embryo cytoplasm made not more that 1°C (Fig. 4, е; 5, г; 6, г). It is important to note that intracellular crystallisation in

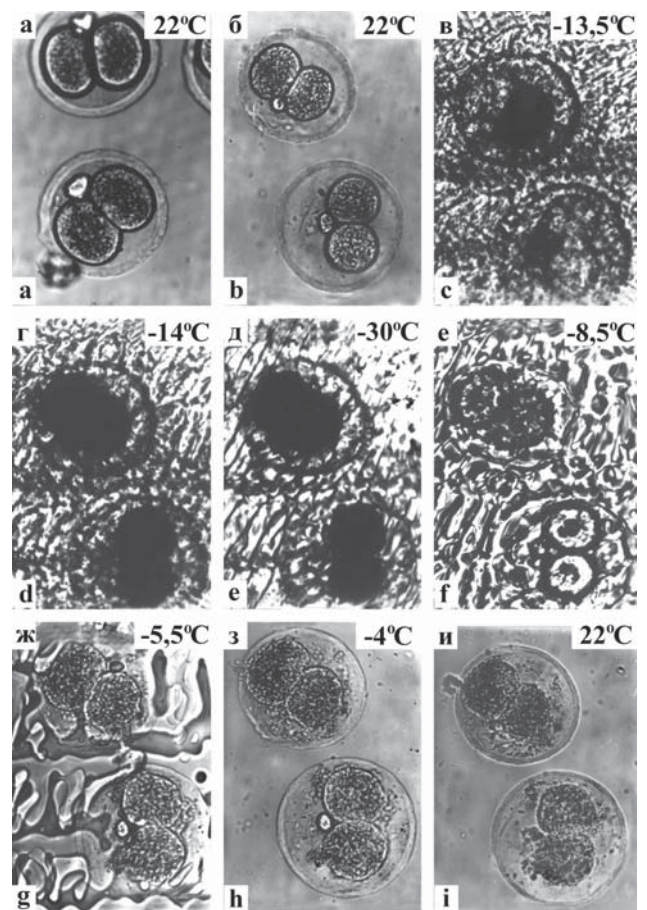




**Рис. 4.** Кинетика замораживания-оттаивания зиготы мыши в 0,5 М растворе сахарозы: а – интактная клетка; б – обезвоживание зиготы мыши в 0,5 М растворе сахарозы.

**Fig. 4.** Kinetics of freeze-thawing of mouse zygotes in 0.5 M sucrose: a- intact cell, b – dehydration of mouse zygote in 0.5M sucrose.

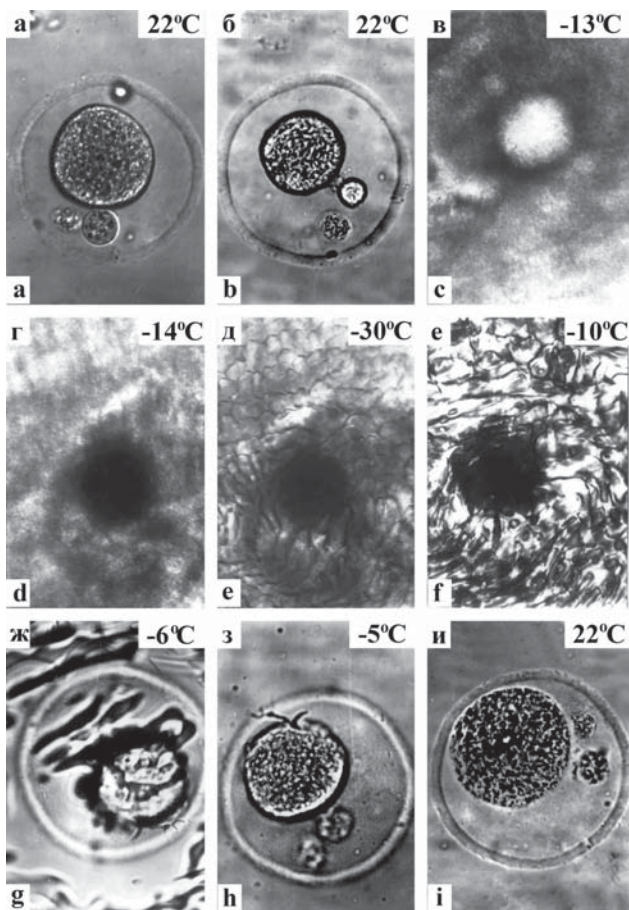
эмбрионах происходила последовательным закристаллизовыванием бластомеров, что могло быть следствием как различной степени переохлаждения их цитоплазмы, так и вероятностного характера внутриклеточного льдообразования (рис.5, в; 5, г). На этапе отогрева в зоне фазового перехода “лед-вода” плавление внутриклеточных кристаллов закономерно завершалось быстрее, чем внеклеточных (рис.4, ж; 5, ж; 6, ж). Повреждения зигот и двухклеточных эмбрионов, замороженных в 0,5 М растворах сахарозы, фиксировались еще в зоне плавления внеклеточных кристаллов (рис.4, ж; 5, ж) и усугублялись по мере повышения температуры (рис 4, з; 5, з). При температуре 22°C *zona pellucida* зигот имела нерегулярные границы, а плазматические мембраны – локальные разрывы. Тем не менее, внутриклеточное содержимое зигот оставалось компактным (рис.4, и). Повреждения двухклеточных эмбрионов мыши сопровождалось потерей границ между бластомерами



**Рис. 5.** Кинетика замораживания-оттаивания двухклеточных эмбрионов мыши в 0,5 М растворе сахарозы: а – интактная клетка; б – обезвоживание двухклеточных эмбрионов мыши в 0,5 М растворе сахарозы.

**Fig. 5.** Kinetics of freeze-thawing of mouse two-cell embryos in 0.5 M sucrose: a- intact cell, b – dehydration of mouse two-cell embryos in 0.5 M sucrose.

two-cell embryos occurred with a subsequent crystallisation of blastomeres that may be the result of both various overcooling degree of their cytoplasm and probable character of intracellular ice formation (Fig. 5, c; 5, d). At the stage of thawing in the area of “ice-water” transition the melting of intracellular crystals regularly completed more rapidly than in extra-cellular (Fig. 4, g; 5, g; 6, g) ones. Impairments of zygotes and two-cell embryos frozen in 0.5M sucrose were fixed even in the melting zone of extracellular crystals (Fig. 4, g; 5, g) and were aggravated with a temperature rise. At 22°C *zona pellucida* of zygotes had irregular boundaries and plasma membranes did local ruptures. Never-theless intracellular content of zygotes remained compact (Fig 4, i). Impairments of mouse two-cell embryos were accompanied with the loss of boundaries between blastomeres, multiple ruptures of plasmat membranes and disorder of the compactness of granuloplasm (Fig. 5, h; 5, j).



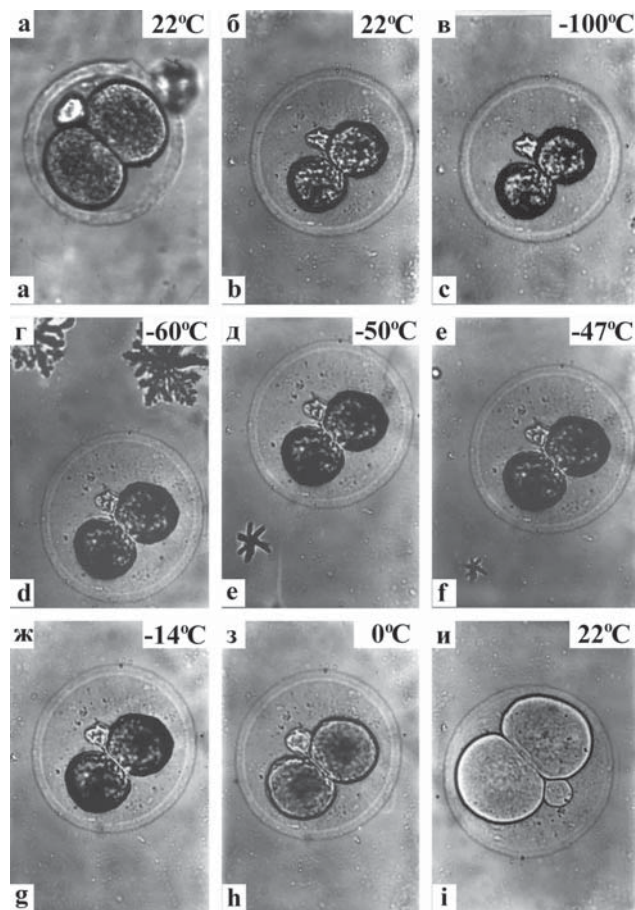
**Рис. 6.** Кинетика замораживания-оттаивания зиготы мыши в 1,0 М растворе сахарозы: а – интактная клетка; б – обезвоживание зиготы мыши в 1,0 М растворе сахарозы.

**Fig. 6.** Kinetics of freeze-thawing of mouse zygotes in 1.0M sucrose: a – intact cell, b – dehydration of mouse zygote in 1.0M sucrose.

рами, множественными разрывами плазматических мембран и нарушением компактности гранулоплазмы (рис. 5, з; 5, и).

В зиготах, замороженных в 1 М растворах сахарозы, после плавления внутриклеточных кристаллов грубые повреждения плазматической мембраны отсутствовали. Однако по мере повышения температуры отмечалось постепенное набухание клеток. Так, уже при  $-5^{\circ}\text{C}$  объем зиготы был сравним с объемом интактной клетки (рис. 6, з), а при  $22^{\circ}\text{C}$  он превышал его в 1,27 раза. Морфологически внутриклеточное содержимое выглядело несколько разрыхленным. Видимых повреждений *zona pellucida* и плазматической мембраны не наблюдалось (рис. 6, и). Двухклеточные эмбрионы, замороженные в 1 М растворе сахарозы, имели такие же характерные морфологические повреждения, как и при замораживании в 0,5 М растворе сахарозы.

Таким образом, предварительное обезвоживание ранних эмбрионов мыши в растворах



**Рис. 7.** Кинетика замораживания-оттаивания двухклеточного эмбриона мыши в этиленгликоль-сахарозной среде: а – интактная клетка; б – обезвоживание двухклеточного эмбриона мыши в этиленгликоль-сахарозной среде.

**Fig. 7.** Kinetics of freeze-thawing of mouse two-cell embryo in ethylene-glycol-sucrose medium: a – intact cell, b – dehydration of mouse two-cell embryo in ethylene-glycol medium.

In zygotes, frozen in 1 M sucrose after melting of intracellular crystals rough impairments of plasma membrane were absent. However with a temperature rise there was observed a gradual swelling of cells. Even at  $-5^{\circ}\text{C}$  the volume of zygote was comparable with that for an intact cell (Fig. 6, h) and at  $22^{\circ}\text{C}$  it was exceeded by 1.27 times. Morphologically intracellular content was a little bit loosened. No visible damages of *zona pellucida* and plasma membrane were observed (Fig. 6, i). Two-cell embryos frozen with 1 M sucrose had the same morphological damages as during freezing in 0.5 M sucrose.

Thus preliminary dehydration of early mouse embryos in the solutions of non-penetrating substances of sucrose and NaCl did not allow the preventing of intracellular crystallisation which inevitably would lead to manifested damage of cells. In this connection there was used the approach of combined effect of two factors: simultaneous dehydration and saturation of mouse early embryos



непроникающих веществ сахарозы и NaCl не позволило предотвратить внутриклеточную кристаллизацию, которая неизбежно приводила к выраженным повреждениям клеток. В связи с этим был использован подход сочетанного воздействия двух факторов: одновременного обезвоживания и насыщения ранних эмбрионов мыши проникающим криопротектором в высококонцентрированных растворах. В качестве такого раствора была применена криоконсервирующая среда на основе ЭГ и сахарозы.

Этиленгликоль в высоких концентрациях, обеспечивая витрификацию вне- и внутриклеточной среды, успешно используется при криоконсервировании различными методами ооцитов и эмбрионов многих млекопитающих [10,11]. Смесь сахарозы и ЭГ оказалась эффективной при замораживании эмбрионов пони [12]. Одно из преимуществ ЭГ – его наименьшая токсичность по сравнению с другими проникающими криопротекторами. Этот факт был подтвержден в работе [15] при исследовании влияния проникающих криопротекторов: диметилсульфоксида, ЭГ, 1,2-пропандиола, глицерина и ацетамида, входящих в состав витрификационной смеси (40% проникающего криопротектора + 30% Ficoll+сахароза), на состояние деконсервированных эмбрионов. Максимальная сохранность клеток была достигнута при использовании ЭГ и глицерина. Как считают авторы [15], все другие криопротекторы в таких высоких концентрациях оказывают токсическое действие на внутриклеточные органеллы эмбрионов, нарушая функции последних. Известно, что эмбрионы мыши выдерживают экспозицию в растворах ЭГ с концентрацией до 7 М [16]. Ооциты мыши, в отличие от эмбрионов, выдерживают лишь непродолжительную экспозицию в 7 М растворе ЭГ, а при увеличении времени экспозиции до 5 мин в растворах ЭГ с концентрацией более 4 М приводит к формированию бляшек и нарушению микрофиламентов.

Исходя из вышеизложенного, попытка использовать при подготовке к замораживанию эмбрионов мыши ранних стадий развития в качестве дегидратирующего раствора высокоосмотичную среду, содержащую 5,37 М ЭГ и 1 М сахарозы, явилась вполне обоснованной. Это позволило уменьшить объем клетки, при котором она входила в процесс замораживания, до объема, составляющего 0,40 исходного, одновременно частично заместив внутриклеточную воду проникающим криопротектором (таблица).

Кинетика замораживания двухклеточного эмбриона мыши в криозащитной смеси представлена на рис.7. Видно, что охлаждение

with cryoprotectant in highly concentrated solutions. EG and sucrose-based cryopreserving medium was used a such a solution.

Ethylene glycol under high concentrations providing vitrification of extra- and intracellular medium is successfully used to cryopreserve oocytes and embryos of many mammals by means of various methods [10, 11]. Mixture of sucrose and EG occurred to be efficient when freezing pony embryos [12]. One of the advantages of EG is its the lowest toxicity in comparison with other penetrating cryoprotectants. This fact was confirmed in the paper [15] when studying the effect of penetrating cryoprotectants: dimethyl sulfoxide, EG, 1,2-propane diol, glycerol, acetamide, composing the vitrification mixture (40% penetrating cryoprotectant + 30% Ficoll + sucrose) on the state of frozen-thawed embryos. Maximum integrity of cells was reached using EG and glycerol. The authors believe [15] all other cryoprotectants under such high concentrations affect toxically intracellular organelles of embryos thereby impairing the functions of latter. It is known that mouse embryos survive the exposure with EG solution of the concentration up to 7 M [16]. Mouse erythrocytes in contrast to embryos survive only a short-term exposure in 7 M EG and when increasing the exposure time up to 5 min in EG solutions with the concentration higher than 4M results in the formation of blebs and impairment of microfilaments.

Summarising all mentioned above the attempt to use during preparing to freezing the mouse embryos of early developmental stages highly osmotic medium containing 5.37 M EG and 1 M sucrose was quite reasonable as dehydrating solution. This enabled decreasing a cell volume at which it entered freezing process, down to the volume comprising 0.40 of initial one simultaneously substitute intracellular water by penetrating cryoprotectant (Table).

Freezing kinetics of mouse two-cell embryo in cryoprotective mixture is presented in Fig. 7. It is seen that cooling of mouse two-cell embryos down to temperature of  $-100^{\circ}\text{C}$  was not accompanied by the changes both of extracellular and intracellular medium: cryoprotective mixture remained optically transparent and blastomeres kept initial optical density (Fig. 7, c). This provided a ground to believe that the cryoprotective mixture is capable of vitrifying. But at thawing stage within the temperature range of  $-66^{\circ}\text{C}$ – $-60^{\circ}\text{C}$  there were fixed small crystals' appearance as dendritic rosettes (Fig. 7, d). With further temperature rise the crystal structures with no development gradually melted (Fig. 7, e, 7, f), that excluded the probability of direct cell contact with formed ice crystals. Embryos kept their morphology within range of negative temperatures up to (Fig. 7, g). At



двухклеточных эмбрионов мыши до температуры  $-100^{\circ}\text{C}$  не сопровождалось изменениями как внеклеточной, так и внутриклеточной среды: криозащитная смесь оставалась оптически прозрачной, а бластомеры сохраняли исходную оптическую плотность (рис. 7, в). Это дало основание считать, что данная криозащитная смесь способна стекловаться. Однако на этапе отогрева в области температур  $-62 \div -60^{\circ}\text{C}$  было зафиксировано немногочисленное высывание во внеклеточной среде кристаллических зародышей в виде дендритных розеток (рис. 7, г). При дальнейшем повышении температуры кристаллические структуры, не успев развиться, постепенно расплавились (рис. 7, д, 7, е), что исключило вероятность непосредственного контакта клеток с образовавшимися кристаллами льда. Эмбрионы сохраняли свою морфологию в области отрицательных температур вплоть до  $0^{\circ}\text{C}$  (рис. 7, ж). При температуре выше  $0^{\circ}\text{C}$  отмечалось постепенное просветление бластомеров, сопровождающееся увеличением их размера (рис. 7, з). При достижении  $22^{\circ}\text{C}$  объем бластомеров превосходил интактный практически в 1,22 раза, что свидетельствовало о проникновении внеклеточного раствора в клетки (рис. 7, и). Тем не менее, граница между бластомерами оставалась четкой, а плазматическая мембрана и *zona pellucida* не имели разрывов.

Таким образом, криомикроскопические исследования процесса замораживания эмбрионов мыши ранних стадий развития показали, что наиболее эффективным способом исключения выраженных повреждений клеток, обусловленных кристаллообразованием, является применение криозащитной среды на основе 100%-го ЭГ и 1 М сахарозы в соотношении 3:7, склонной к стеклованию даже при медленных скоростях замораживания ( $5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ ). Наблюдаемое в данной среде при отогреве формирование кристаллической структуры можно избежать при прохождении этого температурного интервала с большой скоростью.

Указанная этиленгликоль-сахарозная среда была нами использована при криоконсервировании двухклеточных эмбрионов мыши в пластиковых соломинках методом прямого погружения в жидкий азот ( $-196^{\circ}\text{C}$ ). Клетки к замораживанию готовили согласно рекомендациям [4] соломинки отогревали 20 с на водяной бане при  $37^{\circ}\text{C}$ . Культивирование клеток в условиях *in vitro* показало, что после размораживания жизнеспособными остаются не менее 60% эмбрионов.

## Выводы

Криомикроскопические исследования позволили обосновать эффективность использования этиленгликоль-сахарозной среды при криоконсервировании

temperature higher than  $0^{\circ}\text{C}$  there was found a gradual enlightening of blastomeres accompanied with an increase in their sizes (Fig. 7, f). When reaching  $22^{\circ}\text{C}$  the volume of blastomeres exceeded an intact one practically in 1.22 times that testified to a penetration of extracellular solution into cells (Fig. 7, h). Nevertheless the boundary between blastomeres remained distinct and there were no ruptures plasmatic membrane and *zona pellucida*.

Thus cryomicroscopic studies of freezing process for mouse embryos of early stages have shown that the most efficient way to exclude manifested damage of cells, stipulated by crystal formation is the use of cryoprotective medium basing on 100% EG and 1 M sucrose in the 3:7 ratio, inclined to vitrification even at slow freezing rates ( $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ).

Observed in this medium formation of crystal structure during thawing may be avoided when passing-by this temperature interval with a high rate.

The mentioned above ethylene-sucrose medium was used by us for cryopreservation of mouse two-cell embryos in plastic straws by the method of direct plunging into liquid nitrogen ( $-196^{\circ}\text{C}$ ). The cells were prepared to freezing as recommended [4]. The straws were thawed at  $20^{\circ}\text{C}$  on water bath at  $37^{\circ}\text{C}$ . *In vitro* cell culturing demonstrated that after freeze-thawing not less than 60% of embryos remained viable.

## Conclusions

Cryomicroscopic studies enabled the substantiation of efficiency of using ethylene-glycol medium during cryopreservation of early mouse embryos by a direct plunging into liquid nitrogen, thereby achieving high cooling rates.

## References

1. Amstislavsky C.Ya., Maksimovsky L.F., Vorotnikov M.T. Methods of biotechnology in practice of animal breeding.— Novosibirsk, 1991.— 170 p.
2. *Biology of mammalian development. Methods* / Ed. by M. Mank.— Moscow: Mir, 1990.— 406 p.
3. Karlson B. Patten's Bases of Embryology.— Moscow, 1983.— 357 p.
4. Krivokharchenko A.S., Vilyanovich L.I., Serobyay G.A. et al. Survival of embryos after ultrarapid freezing by various cryoprotectants // Problemy reproduktiv.— 1995.— N4.— P. 13-18.
5. Kuleshova L.G. Cryomicroscopic complex for cryobiological studies // Cytologiya.— 2004.— Vol.46, N9.— P. 809-810.
6. Smolyaninova E.I., Khromenkova O.B., Zhernoklev G.V. Effect of various cryopreservation stages by the method of ultrarapid freezing on osmotic resistance and morphological integrity of mouse embryos // Problems of Cryobiology.— 2001, N2.— P. 49-55.
7. Agca Y. Cryobiology of embryos, germ cells, and ovaries // ILAR Journal.— 2000.— Vol.41, №4.— P. 207-220.
8. Clegg K.B., Piko L. Quantitative aspects of RNA synthesis and polyadenylation in 1-cell and 2-cell mouse embryos // J. Embryol. Exp. Morph.— 1983.— Vol. 74.— P. 169-182.

ранних эмбрионов мыши методом прямого погружения в жидкий азот, при котором реализуются высокие скорости охлаждения.

### Литература

1. Амстиславский С.Я., Максимовский Л.Ф., Воротников М.Т. Методы биотехнологии в практике разведения животных.– Новосибирск, 1991.– 170 с.
2. Биология развития млекопитающих. Методы: Пер. с англ./ Под ред. М. Манк.– М.: Мир, 1990.– 406 с.
3. Карлсон Б. Основы эмбриологии по Пэттену : В 2 т.– М., 1983.– 357 с.
4. 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.
5. Кулешова Л.Г. Криомикроскопический комплекс для криобиологических исследований // Цитология.– 2004.– Т. 46, №9.– С. 809-810.
6. Смольянинова 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.
7. Agca Y. Cryobiology of embryos, germ cells, and ovaries // ILAR Journal.– 2000.– Vol.41, N4.– P. 207-220.
8. Clegg K.B., Piko L. Quantitative aspects of RNA synthesis and polyadenylation in 1-cell and 2-cell mouse embryos // J. Embryol. Exp. Morph.– 1983.– Vol. 74.– P. 169-182.
9. Conover J.E., Temeles G.L., Zimmerman J.W. Stage specific expression on a family of proteins that are major products of zygotic gene activation in the mouse embryos // Devel. Biol.– 1991.– Vol. 144.– P. 392-404.
10. Hochi S. Cryopreservation of follicular oocytes and preimplantation embryos in cattle and horses // J. of Reprod. and Devel.– 2003.– Vol. 49, N1.– P. 13-21.
11. Hochi S., Fujimoto T., Braun J., Oguri N. Pregnancies following transfer of equine embryos cryopreserved by vitrification // Theriogenology.– 1994.– Vol. 42.– P. 483-488.
12. Hochi S., Maruyama K., Oguri N. Direct transfer of equine blastocysts frozen – thawed in the presence of ethylene glycol and sucrose // Theriogenology.– 1994.– Vol. 46.– P. 1217-1224.
13. Leibo S.P., Mazur P., Jacovsky S. C. Factors affecting survival of mouse embryos during freezing and thawing // Exp. Cell. Res.– 1974.– Vol. 89.– P. 79.
14. Mazur P., Rall W.F., Leibo S.P. Kinetics of water loss and the likelihood of intracellular freezing in mouse ova: Influence of the method of calculating the temperature dependence of water permeability // Cell. Biophys.– 1984.– Vol. 6.– P.197-214.
15. Mukaida T., Wada S., Takahashi K. et al. Vitrification of human embryos based on the assessment of suitable conditions for 8-cell mouse embryos // Hum. Reprod.– 1998.– Vol.13, N10.– P. 2874-2879.
16. Nowshari M.A., Brem G. Effects of cryoprotectants and their concentration on post- thaw survival and development of expanded mouse blastocysts frozen by a simple rapid-freezing procedure // Theriogenology.– 1998.– Vol. 50, N7.– P. 1001-1013.
17. Show J.M., Oranratnachai A., Trounson A.O. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue // Theriogenology.– 2000.– Vol. 53.– P. 59-72.
18. Wilmut I. The effect of cooling rate, warming rate, cryoprotective agent and stage of development on survival of mouse embryos during freezing and thawing // Life Sci.– 1972.– Vol. 11, Part II, N22.– P. 1072-1079.

Accepted in 29.03.2005

Поступила 29.03.2005