

УДК 57.043:611.013:577.352.5

Е.И. Смольянинова^{1*}, В.А. Шигимага³, А.А. Колесникова²,
Л.И. Попивненко¹, А.Ф. Тодрин¹

Электрическая проводимость и устойчивость мембран ооцитов мыши к действию импульсного электрического поля в растворах криопротекторов

UDC 57.043:611.013:577.352.5

Ye.I. Smolyaninova^{1*}, V.A. Shigimaga³,
A.A. Kolesnikova², L.I. Popivnenko¹, A.F. Todrin¹

Electric Conductivity and Resistance of Mouse Oocyte Membranes to Effect of Pulsed Electric Field in Cryoprotectant Solutions

Реферат: В работе методом импульсной кондуктометрии определены значения электрической проводимости ооцитов мыши в 1,0 М растворах проникающих в клетку криопротекторов, а также исследована устойчивость их плазматических мембран к действию импульсного электрического поля возрастающей напряженности. Для ооцитов, инкубированных в растворах этиленгликоля (ЭГ), 1,2-пропандиола (1,2-ПД), 2,3-бутандиола (2,3-БД) и диметилсульфоксида (ДМСО), значения удельной электрической проводимости составили $(23,6 \pm 3,4)$, $(21,3 \pm 5,8)$, $(21,0 \pm 2,3)$ и $(23,6 \pm 7,1)$ мкСм/см соответственно. В растворах ацетамида (АЦ) и формамида (ФА) значения электрической проводимости ооцитов мыши составили $(16,5 \pm 6,1)$ и $(16,9 \pm 10,7)$ мкСм/см соответственно. Показано, что растворы криопротекторов, принадлежащих к классу спиртов (ЭГ, 2,3-БД), а также ДМСО оказывают стабилизирующее влияние на плазматические мембраны ооцитов мыши при действии электрического поля. Растворы АЦ и ФА не оказывают стабилизирующего действия на мембраны ооцитов мыши, что проявляется в развитии необратимого электрического пробоя плазматических мембран при увеличении напряженности электрического поля.

Ключевые слова: ооциты мыши, плазматическая мембрана, электрическая проводимость, криопротектор, электропорация, электрический пробой, импульсное электрическое поле, напряженность.

Реферат: У роботі методом імпульсної кондуктометрії вперше визначено значення електричної провідності ооцитів миші в 1,0 М розчинах проникаючих у клітину криопротекторів, а також досліджено стійкість їх плазматичних мембран до дії імпульсного електричного поля зростаючої напруженості. Для ооцитів, експонованих у розчинах етиленгліколю (ЕГ), 1,2-пропандіолу (1,2-ПД), 2,3-бутандіолу (2,3-БД) і диметилсульфоксиду (ДМСО), значення питомої електричної провідності склали $(23,6 \pm 3,4)$, $(21,3 \pm 5,8)$, $(21,0 \pm 2,3)$ та $(23,6 \pm 7,1)$ мкСм/см відповідно. У розчинах ацетаміду (АЦ) і формаміду (ФА) значення електричної провідності ооцитів миші склали $(16,5 \pm 6,1)$ та $(16,9 \pm 10,7)$ мкСм/см відповідно. Показано, що розчини криопротекторів, які належать до класу спиртів (ЕГ, 2,3-БД), а також ДМСО здійснюють стабілізуючий вплив на плазматичні мембрани ооцитів миші в умовах дії електричного поля. Розчини АЦ і ФА не чинять стабілізуючого впливу на мембрани ооцитів миші, що проявляється в розвитку необоротного електричного пробоя при збільшенні напруженості електричного поля.

Ключові слова: ооцити миші, плазматична мембрана, електрична провідність, криопротектор, електропорация, електричний пробой, імпульсне електричне поле, напруженість.

Abstract: Using the method of pulsed conductometry, the values of electric conductivity of mouse oocytes in 1.0 M solutions of penetrating cryoprotectants have been first determined and the stability of their plasma membranes to the effect of pulsed electric field of increasing intensity has been investigated. For the oocytes, incubated in ethylene glycol (EG), 1,2-propane diol (1,2-PD), 2,3-butane diol (2,3-BD) and dimethyl sulfoxide (DMSO) solutions, the specific electric conductivity values were (23.6 ± 3.4) , (21.3 ± 5.8) and (21.0 ± 2.3) and (23.6 ± 7.1) $\mu\text{S}/\text{cm}$ respectively. The values of electric conductivity for mouse oocytes in acetamide (AC) and formamide (FA) solutions were (16.5 ± 6.1) and (16.9 ± 10.7) $\mu\text{S}/\text{cm}$, respectively. Cryoprotectant solutions, belonging to alcohols (EG, 2,3-BD), as well as DMSO, were shown to have a stabilizing effect on the mouse oocyte plasma membranes under electric field action. The AC and FA solutions caused no stabilizing effect on mouse oocyte membranes, which was manifested in development of irreversible electric breakdown of plasma membranes with increasing electric field intensity.

Key words: mouse oocytes, plasma membrane, electric conductivity, cryoprotectant, electroporation, electric breakdown, pulsed electric field, intensity.

¹Відділ низькотемпературного консервування, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

²Інститут тваринництва НААН України, м. Харків

³Харківський національний технічний університет сільського господарства ім. П. Василенка

¹Department of Low Temperature Preservation, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

²Institute of Animal Science of National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

³P. Vasylenko National Technical University of Agriculture, Kharkiv, Ukraine

*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52
електронна пошта: esmolyaninova@ukr.net

*To whom correspondence should be addressed:

23, Pereyaslavska str., Kharkiv, Ukraine 61016;
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952
e-mail: esmolyaninova@ukr.net

Надійшла 18.04.2018

Прийнята до друку 13.11.2018

Received April, 18, 2018

Accepted November, 13, 2018

© 2018 Ye.I. Smolyaninova et al. Published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Оптимизация программ криоконсервирования ооцитов и эмбрионов млекопитающих тесно связана с поиском эффективных криопротекторов, разработкой комбинированных сред замораживания и способов снижения их токсичного влияния на клетки [13, 16, 17, 20, 21]. Решение данной проблемы особенно актуально в связи с разработкой протоколов криоконсервирования ооцитов и эмбрионов методом витрификации, в которых используют высокие концентрации проникающих криопротекторов [16, 20, 21]. Как правило, эффективность криопротекторов и степень их токсичности определяют после полного цикла низкотемпературного консервирования по морфологической целостности ооцитов и их способности к оплодотворению, а эмбрионов – к дальнейшему развитию [19, 25]. Однако эти критерии не позволяют отделить «истинную» химическую токсичность криопротектора от других сопутствующих факторов, действующих на разных этапах цикла криоконсервирования. Использование гипертонических растворов приводит к появлению больших концентрационных градиентов растворенных веществ, что может стать причиной нарушения барьерных свойств мембран и ионного гомеостаза [22], повышения сенсibilизации клеток на этапах отогрева и удаления криозащитного раствора. В литературе приводятся экспериментальные данные по влиянию различных концентраций криопротекторов, температуры и длительности экспозиции в криозащитных растворах ооцитов и эмбрионов млекопитающих на морфологическую сохранность внутриклеточных органелл и, прежде всего, мейотического веретена [16, 19]. Таким образом, вопрос о том, как отличить повреждения, вызванные действием осмотического фактора, от повреждений, обусловленных химическим действием криозащитных агентов, остается открытым, а для его решения необходим поиск новых параметров оценки состояния клеток и адекватных методических подходов их определения.

В настоящее время в биотехнологических операциях широко применяется электропорация – обработка живых клеток электрическим полем. Этот метод используют для введения в клетки непроникающих в норме веществ, создания гибридом, диэлектрофореза, а также слияния клеток [14, 23, 28].

В предыдущих работах нами показано, что электрическая проводимость является информативным параметром, характеризующим морфофункциональное состояние ооцитов мыши на разных стадиях зрелости [6, 7, 10], эмбрионов

The optimization of cryopreservation programs for mammalian oocytes and embryos is tightly related to discovering the efficient cryoprotectants, the development of the combined freezing media, and the ways to reduce their toxic effect on cells [1, 6, 7, 12, 14]. This task may be solved by designing the cryopreservation protocols for oocytes and embryos using vitrification, where the penetrating cryoprotectants of high concentration are used [6, 12, 14]. The efficiency of cryoprotectants and degree of their toxicity are generally determined after a complete cycle of low-temperature preservation according to the morphological integrity and the fertilization ability of oocytes and the capability of embryos for further development [10, 25]. However, these criteria do not enable distinguishing the ‘true’ chemical toxicity of cryoprotectant from other related factors, acting at various stages of cryopreservation. The use of hypertonic solutions entails the appearance of large solute gradients, which may provoke a disorder of semi-permeability properties of membranes and ionic homeostasis [16], an increased cell sensitization during thawing and removal of cryoprotective solution. There are the reported experimental data on the effect of the cryoprotectants of various concentrations, temperature and exposure duration in cryoprotective solutions of mammalian oocytes and embryos on morphological integrity of intracellular organelles and, first of all, meiotic spindle [6, 10]. Thus, the question of distinguishing the damages, caused by osmotic factor impact from those, stipulated by chemical action of cryoprotective agents has still remained open, and to solve it new cell parameters and adequate methodological approaches to determine them should be found.

To date, the electroporation, *i. e.* the living cell treatment with electric field, is widely used in biotechnology. This method is applied to introduce the substances, normally not penetrating into the cells, for activation, creating hybridomas, dielectrophoresis, cell fusion [3, 17, 28].

In previous research, we demonstrated the electric conductivity to be an informative cell parameter, characterizing the morphofunctional state of mouse oocytes at different stages of maturity [20, 21, 24], mouse embryos during cleavage [23], as well as at various stages of cryopreservation [22].

This research aim was to determine the electric conductivity of mouse oocytes in 1.0 M solutions of penetrating cryoprotectants, as well as to study the resistance of their plasma membranes to the effect of pulsed electric field of increasing intensity.



мышь в процессе деления дробления [9], а также на разных этапах цикла криоконсервирования [8].

Цель работы – определение электрической проводимости ооцитов мышь в 1,0 М растворах проникающих криопротекторов, а также исследование устойчивости их плазматических мембран к действию импульсного электрического поля возрастающей напряженности.

Материалы и методы

Эксперименты на животных проводили в соответствии с «Общими принципами экспериментов на животных», одобренными I-III Национальными конгрессами по биоэтике (Киев, 2001–2007) и согласованными с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986).

Ооциты на стадии МII мейоза получали от самок 6–8-недельных мышь линии СВА. Для стимуляции суперовуляции животных подвергали гормональной обработке путем внутрибрюшинного введения 5 МЕ гонадотропина сыворотки жеребых кобыл («Folligon», «Intervet», Нидерланды) и 7,5 МЕ человеческого хорионического гонадотропина (чХГ) («Chorulon» «Intervet», Нидерланды) с интервалом 46–48 ч. Через 13 ч после введения чХГ самок забивали дислокацией шейных позвонков.

Ооциты получали путем прокалывания стенок ампулярных отделов яйцеводов в среде Дюльбекко с добавлением 5% фетальной телячьей сыворотки («Sigma», США) при комнатной температуре [4]. Затем клетки трижды отмывали физиологической средой Дюльбекко и немедленно использовали в эксперименте.

Исследования проводили в 0,3 М растворе сахарозы и 1,0 М растворах следующих проникающих криопротекторов: этиленгликоль (ЭГ); 1,2-пропандиол (1,2-ПД); 2,3-бутандиол (БД); ацетамид (АЦ); формамид (ФА); диметилсульфоксид (ДМСО). Растворы криопротекторов готовили на изотоническом растворе сахарозы (0,3 М).

Электрическую проводимость ооцитов мышь в растворах криопротекторов определяли методом импульсной кондуктометрии с использованием аппаратного комплекса [24], включающего генератор одиночных прямоугольных импульсов, напряжение от которого подавалось на микроэлектроды из тонкой золотой нити, запаянной в стеклянные капилляры.

Ооциты мышь инкубировали в исследуемых растворах криопротекторов в течение 10–15 мин. Длительность выдерживания гамет в растворах

Materials and methods

Experiments in animals were carried out in compliance with the General Principles of Experiments in Animals, approved by the 1st–3rd National Congresses in Bioethics (Kyiv, 2001–2007) and agreed with the statements of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986).

The MII oocytes were derived from the 6–8-week-old CBA female mice. To stimulate superovulation, the animals were hormonally treated via intraperitoneal administration of 5 IU pregnant mare serum gonadotropin (Folligon, Intervet, Netherlands) and 7.5 IU of human chorionic gonadotropin (hCG) (Chorulon, Intervet, Netherlands) with 46–48 hrs interval. In 13 hrs after hCG administration the females were sacrificed by cervical dislocation.

The oocytes were procured by piercing the walls of oviduct ampullar segments in Dulbecco's medium, supplemented with 5% fetal bovine serum (Sigma, USA) at room temperature [13]. Then the cells were thrice washed out with physiological medium and used immediately in the experiment.

The studies were performed in 0.3 M sucrose solution and 1.0 M solutions of penetrating cryoprotectants: ethylene glycol (EG); 1,2-propandiol (1,2-PD); 2,3-butanediol (BD); acetamide (AC); formamide (FA); dimethyl sulfoxide (DMSO). Cryoprotectant solutions were prepared with isotonic sucrose solution (0.3 M).

The electric conductivity of mouse oocytes in cryoprotectant solutions was determined by pulsed conductometry using the device [19], consisting of the generator of single rectangular pulses, the voltage from which was supplied to the gold thread microelectrodes sealed into glass capillaries.

The mouse oocytes were exposed to the studied cryoprotectant solutions for 10–15 min. The duration of gamete exposure in cryoprotectant solutions was determined by the time, required for a complete equilibration of extra- and intracellular concentrations of penetrating substances and oocyte volume renewal. Then, the oocytes in a drop of solution were placed between microelectrodes, where to the single voltage pulses were supplied, the amplitude of which increased uniformly from zero with 50 μ s duration. The mode parameters of the field were selected in such a way that the energy value of initial electric pulse was significantly lower than the threshold one, causing an electric breakdown of membrane.



криопротекторов определялась временем, необходимым для полного уравнивания вне- и внутриклеточных концентраций проникающих веществ и восстановления объема ооцита. Затем ооциты в капле раствора помещали между микроэлектродами, на которые подавали одиночные импульсы напряжения с равномерно возрастающей от нуля амплитудой длительностью 50 мкс. Режимные параметры поля выбирали таким образом, чтобы величина энергии первоначального электрического импульса была значительно меньше порогового значения, вызывающего электропробой мембраны.

Для определения удельной проводимости ооцитов измеряли амплитуду напряжения на калибровочном резисторе, соединенном последовательно с микроэлектродами.

Морфологическую целостность ооцитов в процессе эксперимента оценивали методом световой микроскопии.

Искомая величина удельной проводимости одиночной клетки равна разности между проводимостью объекта и проводимостью раствора, которую измеряют в одном и том же образце, поскольку согласно закону Кольрауша данный параметр представляет собой аддитивную величину [1]. Алгоритм расчета электрической проводимости подробно описан ранее [24].

На основании полученных данных были построены зависимости рассчитанных значений удельной проводимости отдельных ооцитов от величины напряженности поля между электродами. По характеру зависимости оценивали устойчивость ооцитов мыши в растворах криопротекторов.

Данные представлены в виде средних значений \pm стандартное отклонение с использованием программы «Excel» («Microsoft», США).

Результаты и обсуждение

Действие электрического поля на клетку приводит к резкому увеличению мембранного потенциала и росту электрической проводимости клеточной мембраны. Это явление связано с формированием в мембране кратковременных дефектов типа сквозных пор вследствие локальных перестроек в липидном бислое под действием электрического импульса. В настоящее время большинство исследователей придерживается мнения, что наиболее вероятное место электрического пробоя мембраны – липидный бислой [14, 26–28]. Известно, что два свойства липидного бислоя мембраны определяют чувствительность мембран к действию электрического поля: заряды или диэлектрические диполи липидных

The specific conductivity of oocytes was determined by measuring the voltage amplitude on the calibration resistor, sequentially connected with microelectrodes.

The morphological integrity of oocytes during experiment was assessed by light microscopy.

The required value of specific conductivity of a single cell equals to the difference between the object's conductivity and that of the solution, measured in the same specimen, since this parameter is an additive value according to the Kohlrausch's law [5]. The algorithm for electric conductivity calculation was specified previously [19].

Proceeding from these findings, there were plotted the curves of calculated values of specific conductivity for individual oocytes vs. the field intensity between electrodes. The mouse oocyte resistance in cryoprotectant solutions was assessed by the curve features.

The data are presented as mean values \pm standard deviation using Excel software (Microsoft, USA).

Results and discussion

The effect of electric field on cell cause a sharp rise of membrane potential and an increase in electric conductivity of cell membrane. This phenomenon is associated with the formation of short-term defects of a kind of transverse pores in membrane due to the local rearrangements in lipid bilayer under electric impulse impact. Currently, most researchers consider the lipid bilayer to be the most probable place for electric breakdown in membrane [3, 26–28]. It is known that two features of membrane lipid bilayer determine the membrane sensitivity to electric field effect, *i. e.* existing of the charges or dielectric dipoles of lipid molecules and a low permeability of membranes to ions [27]. The walls of membrane pore may be formed either by hydrocarbon tails of lipids (hydrophobic pores) or by polar heads of lipid molecules (hydrophilic ones). For relatively large pore radii (> 0.5 nm), the free energy of hydrophilic pore is significantly lower vs. hydrophobic one, *i. e.* according to thermodynamic principle of minimum energy, the existence of hydrophilic pore is more energy-efficient [27]. The reported findings prove the fact, that the large pores, resulting in lipid bilayer rupture during its electric breakdown are hydrophilic [3, 26]. If the radius of a hydrophilic pore does not exceed a certain critical value, then it disappears after some time, *i. e.* there is a reversible electric breakdown of the membrane. If the pore radius exceeds a certain critical value, then the irreversible electric breakdown, accompanied by a cell destruction, occurs. It is known that the value of critical voltage



молекул и малая проницаемость мембран для ионов [27]. Стенки мембранной поры могут быть образованы либо углеводородными хвостами липидов (гидрофобные поры), либо полярными головками липидных молекул (гидрофильные поры). Для относительно больших радиусов пор ($> 0,5$ нм) свободная энергия гидрофильной поры значительно меньше, чем энергия гидрофобной, т. е. в соответствии с термодинамическим принципом минимума свободной энергии существование гидрофильной поры энергетически более выгодно [27]. В литературе представлены экспериментальные данные, доказывающие, что большие поры, которые приводят к разрыву липидного бислоя при его электрическом пробое, являются гидрофильными [14, 26]. Если радиус гидрофильной поры не превышает некоторого критического значения, то она исчезает через определенное время, т. е. имеет место обратимый электрический пробой мембраны. Если радиус поры превышает некоторое критическое значение, то происходит необратимый электрический пробой, который сопровождается разрушением клетки. Известно, что значение критического напряжения может служить важным параметром, характеризующим структуру мембраны и степень ее целостности. L.V. Chernomordik [14] показал, что изменения в структуре мембраны под влиянием внешних химических агентов или физических факторов отражаются на значении критического напряжения пробоя. Н.Р. Чекурова и соавт. [11] показали, что криопротекторы, принадлежащие к различным классам химических веществ, оказывают существенное влияние на мембранный потенциал 2-клеточных эмбрионов мыши. Изменение мембранного потенциала под действием криозащитных растворов может оказывать влияние на величину напряжения электрического пробоя при действии электрического поля.

Известно, что степень повреждения клеток в гипертонических растворах криопротекторов зависит от их концентрации, поэтому в данной работе концентрация растворов всех исследуемых криопротекторов составила 1,0 М. Согласно литературным данным такая концентрация позволяет избежать повреждения клеток как за счет осмотического фактора, так и токсического действия [16].

Зависимость электрической проводимости ооцитов мыши от напряженности импульсного электрического поля (ИЭП) в изотоническом растворе сахарозы (рис. 1) имеет возрастающий, но не линейный характер. Для большинства ооцитов мыши по достижению напряженности поля

may be an important parameter, characterizing the membrane structure and the degree of its integrity. L.V. Chernomordik [3] showed that the changes in membrane structure under the effect of either external chemical agents or physical factors affected the value of critical breakdown voltage. N.R. Chekurova et al. [2] demonstrated the cryoprotectants belonging to different classes of chemicals to have a significant effect on membrane potential of 2-cell mouse embryos. Changes in membrane potential under cryoprotective solution impact may affect the electric breakdown voltage during electric field action.

The cell damage degree in hypertonic solutions of cryoprotectants is known to depend on their concentration, therefore, in this research the concentration of solutions for all the studied cryoprotectants was 1.0 M. According to the reported data, this concentration enables avoiding the cell damage both due to osmotic factor and toxic effect as well [6].

The dependency of electric conductivity of mouse oocytes on the pulsed electric field intensity in isotonic sucrose solution (Fig. 1) was of increasing, but not linear character. For most mouse oocytes, upon reaching the field intensity of 3.5 kV/cm, a sharp increase in conductivity, accompanied with the gamete swelling and plasma membrane destruction, was observed, suggesting thereby an irreversible electric breakdown. Within the range of initial values of field intensity (0.2–0.5 kV/cm), the

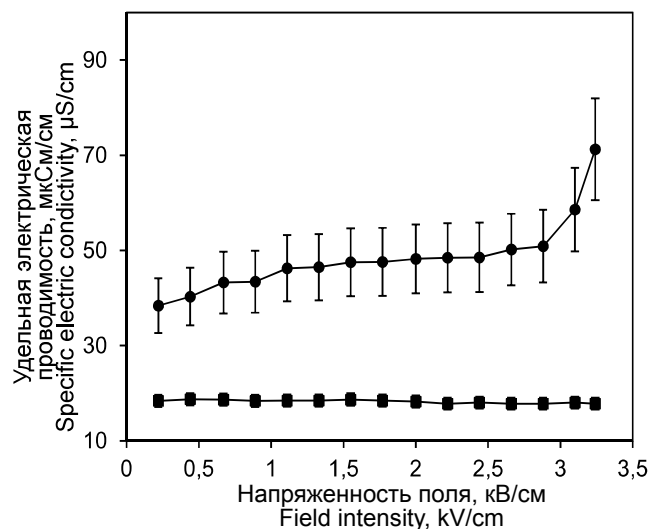


Рис. 1. Зависимость удельной электрической проводимости ооцитов мыши от напряженности ИЭП в 0,3 М растворе сахарозы: ● – проводимость ооцитов; ■ – проводимость 0,3 М раствора сахарозы.

Fig. 1. Dependency of specific electric conductivity of mouse oocytes vs. pulsed electric field intensity in 0.3 M sucrose solution: ● – oocyte conductivity; ■ – conductivity of 0.3 M sucrose.

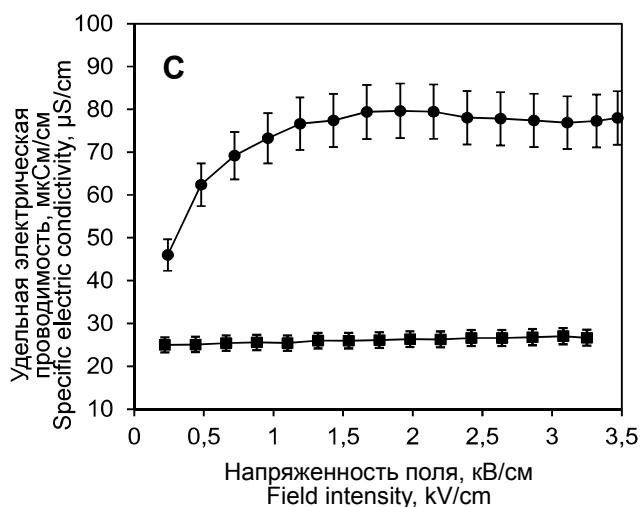
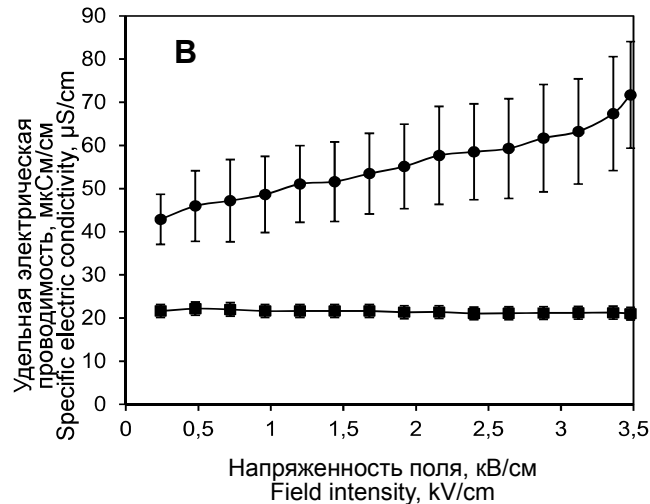
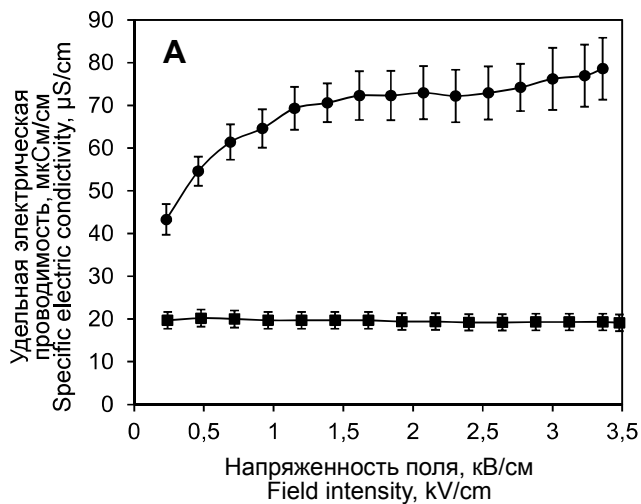


Рис. 2. Зависимость удельной электрической проводимости ооцитов мыши от напряженности ИЭП в 1,0 М растворе ЭГ (А), 1,2-ПД (В) и 2,3-БД (С): ● – проводимость клетки; ■ – проводимость 1 М раствора ЭГ.

Fig. 2. Dependency of specific electric conductivity of mouse oocytes vs. pulsed electric field intensity in 1.0 M EG (A), 2-PD (B) and 2,3-BD (C) solution: ● – cell conductivity; ■ – conductivity of 1.0 M EG solution.

3,5 кВ/см наблюдалось резкое увеличение проводимости, сопровождающееся набуханием гамет и разрушением их плазматических мембран, что свидетельствует о необратимом электрическом пробое. В диапазоне начальных значений напряженностей поля (0,2–0,5 кВ/см) индуцированное на мембране напряжение недостаточно для электрического пробоя, поэтому регистрируемая проводимость обусловлена собственной проводимостью мембраны. Начальное значение удельной электрической проводимости ооцитов в растворе сахарозы составили $(20,0 \pm 4,5)$ мкСм/см.

В растворах ЭГ (рис. 2, А), 1,2-ПД (рис. 2, В), 2,3-БД (рис. 2, С) наблюдается относительно быстрое увеличение проводимости уже в области малых значений напряженности поля. При максимальном значении напряженности 3,5 кВ/см необратимый электрический пробой мембраны не происходит, а проводимость ооцитов, достигая некоторой величины в диапазоне напряженности 2–3,5 кВ/см, далее не меняется. Можно предположить, что растворы ЭГ и 2,3-БД оказывают ста-

volage, induced on membrane was not enough for electric breakdown, therefore, the recorded conductivity was stipulated by membrane's own conductivity. An initial value of specific electric conductivity of oocytes in sucrose solution was (20.0 ± 4.5) $\mu\text{S}/\text{cm}$.

In EG (Fig. 2A), 1,2-PD (Fig. 2B), 2,3-DB (Fig. 2C) solutions a relatively rapid increase in conductivity was observed even within the range of low values of field intensity. With the maximum intensity value of 3.5 kV/cm, no irreversible membrane electric breakdown occurred, and, after reaching a certain value within the intensity range of 2–3.5 kV/cm, the oocyte conductivity then remained unchanged. The EG and 2,3-BD solutions may be assumed to have a stabilizing effect on mouse oocyte membranes. In a 1.0 M solution of 1,2-PD, the reaching of maximum field intensity (3.5 kV/cm) was critical for several oocytes: a sharp increase in conductivity was observed, accompanied by oocyte destruction, *i. e.* an irreversible electric breakdown occurred.

The values of specific electric conductivity for oocytes within the range of initial values of field intensity were (23.6 ± 3.4) , (21.3 ± 5.8) and (21.0 ± 2.3) $\mu\text{S}/\text{cm}$ in EG, 1,2-PD and 2,3-BD solutions, respectively. The obtained values are comparable with those, corresponding to oocyte conductivity in sucrose solution.

The numerical values of electric conductivity of mouse oocytes in DMSO solutions (Fig. 3) and an increase in conductivity depending on pulsed electric

билизирующее действие на мембраны ооцитов мышцы. Однако в 1,0 М растворе 1,2-ПД для отдельных ооцитов по достижении максимального значения напряженности поля (3,5 кВ/см) наблюдается резкий рост проводимости, сопровождающийся разрушением ооцитов, т. е. имеет место необратимый электрический пробой.

Значения удельной электрической проводимости ооцитов в области начальных значений напряженности поля составили $(23,6 \pm 3,4)$, $(21,3 \pm 5,8)$ и $(21,0 \pm 2,3)$ мкСм/см в растворах ЭГ, 1,2-ПД и 2,3-БД соответственно. Полученные значения сравнимы с соответствующими величинами проводимости ооцитов в растворе сахарозы.

Численные значения электрической проводимости ооцитов мышцы в растворах ДМСО (рис. 3) и рост проводимости в зависимости от напряженности импульсного электрического поля аналогичны полученным в растворах спиртов. Величина удельной электрической проводимости в области начальных значений напряженности поля составляет $(23,6 \pm 7,1)$ мкСм/см, а по достижении максимальных значений напряженности поля необратимый пробой мембраны не наблюдается, что свидетельствует о стабилизирующем действии растворов ДМСО на мембраны ооцитов.

В растворах АЦ и ФА (рис. 4) значения электрической проводимости ооцитов мышцы в области начальных значений напряженности поля были несколько ниже, чем в растворах спиртов и ДМСО, и составили $(16,5 \pm 6,1)$ и $(16,9 \pm 10,7)$ мкСм/см соответственно. Рост проводимости ооцитов в растворах амидов в зависи-

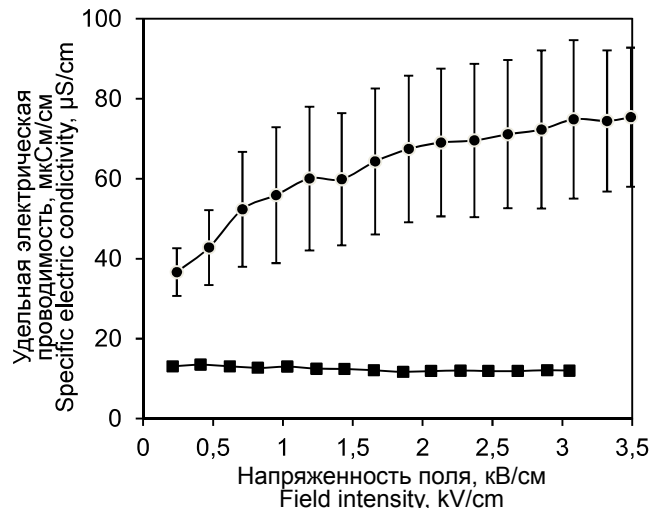


Рис. 3. Зависимость удельной электрической проводимости ооцитов мышцы от напряженности ИЭП в 1,0 М растворе ДМСО: ● – проводимость ооцитов; ■ – проводимость 1 М раствора ДМСО.

Fig. 3. Dependency of specific electric conductivity of mouse oocytes vs. pulsed electric field intensity in 1.0 M DMSO solution: ● – oocyte conductivity; ■ – conductivity of 1.0 M DMSO.

мости от напряженности импульсного электрического поля были аналогичны полученным в растворах спиртов. Величина удельной электрической проводимости в области начальных значений напряженности поля составляет $(23,6 \pm 7,1)$ мкСм/см, а по достижении максимальных значений напряженности поля необратимый пробой мембраны не наблюдается, что свидетельствует о стабилизирующем действии растворов ДМСО на мембраны ооцитов.

In AC and FA solutions (Fig. 4), the electric conductivity for mouse oocytes within the range of initial values of field intensity was slightly lower

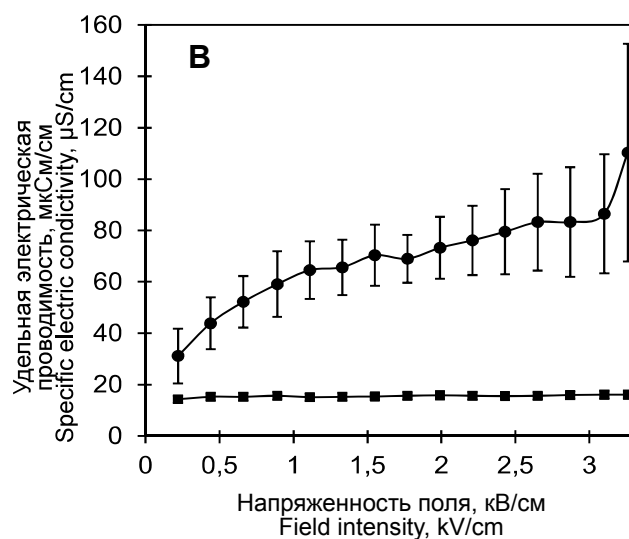
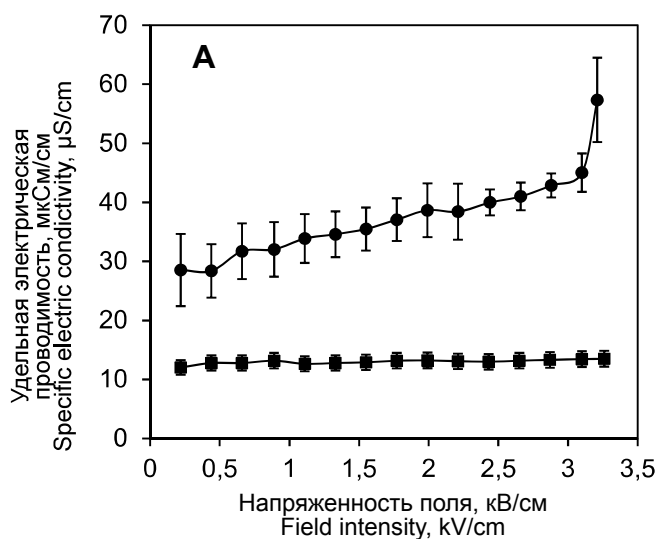


Рис. 4. Зависимость удельной электрической проводимости ооцитов мышцы от напряженности ИЭП в 1,0 М растворе АЦ (А) и ФА (В): ● – проводимость ооцита в растворе; ■ – проводимость 1 М раствора АЦ.

Fig. 4. Dependency of specific electric conductivity of mouse oocytes vs. pulsed electric field intensity in 1.0 MAC (A) and FA (B) solution: ● – oocyte conductivity in solution; ■ – conductivity of 1.0 M AC solution.

мости от напряженности поля заметно меньше, чем в растворах спиртов и ДМСО, вплоть до необратимого электрического пробоя, который наблюдался при напряженности поля около 3,5 кВ/см. Необратимый электрический пробой и разрушение ооцитов свидетельствуют о нестабильности мембран ооцитов в растворах амидов.

Полученные результаты по влиянию растворов криопротекторов на электрические параметры ооцитов мыши можно объяснить физико-химическими свойствами их молекул. Гидрофильно-гидрофобный баланс, характеризующийся коэффициентом распределения веществ в системе «октанол-вода», коэффициент адсорбции и диэлектрическая проницаемость отражают гидрофобные свойства молекул криопротекторов и их способность взаимодействовать с гидрофобными участками мембран [3, 5]. Удлинение углеводородной цепи в молекулах спиртов повышает их гидрофобные свойства, увеличивает соответствующие значения коэффициентов распределения и вследствие этого усиливает гидрофобные взаимодействия с мембранными структурами. Для молекул ДМСО характерно относительно высокое значение коэффициента распределения [12]. Можно предположить, что растворы спиртов и ДМСО оказывают стабилизирующее действие на мембраны ооцитов мыши благодаря выраженному гидрофобному взаимодействию с мембранными структурами. Данное предположение хорошо согласуется с литературными данными. J.H. Crowe и соавт. [15], используя метод Фурье ИК-спектроскопии, показали, что стабилизирующее влияние трегалозы и некоторых аминокислот на мембраны клеток обусловлено именно гидрофобными взаимодействиями. Авторы выдвинули гипотезу, что молекулы таких криопротекторов, как ДМСО, взаимодействуют с мембранными липидами, оказывая тем самым стабилизирующее действие на мембраны клеток. M.L. Fernández и R. Reigada [18], моделируя методом молекулярной динамики процесс электропорации липидных мембран в присутствии ДМСО, показали, что под его действием в липидных мембранах могут формироваться устойчивые гидрофобные поры малого радиуса, вследствие чего меняются свойства мембран, увеличивается их проницаемость для различных агентов, а также электрическая проводимость. Исходя из литературных данных можно предположить, что стабилизирующее действие растворов криопротекторов, в частности ДМСО, предотвращение необратимого электрического пробоя, а также быстрый рост электрической проводимости в области началь-

than in alcohols and DMSO ones and made (16.5 ± 6.1) and (16.9 ± 10.7) $\mu\text{S}/\text{cm}$, respectively. An increase in oocyte conductivity in amide solutions depending on the intensity was noticeably lower than in those of alcohols and DMSO up to irreversible electric breakdown, observed at the field intensity of about 3.5 kV/cm. An irreversible electric breakdown and oocyte destruction testified to the oocyte membrane instability in amide solutions.

Our findings on the cryoprotectant solution impact on electric parameters of mouse oocytes may be explained by physical and chemical properties of their molecules. Hydrophilic-hydrophobic balance, being characterized by the partition coefficient of substances in the octanol-water system, the adsorption coefficient and the permittivity reflect the hydrophobic properties of cryoprotectant molecules and their capability to interact with hydrophobic membrane areas [11, 15]. The hydrocarbon chain extension in alcohol molecules increases their hydrophobic properties, augments the corresponding values of distribution coefficients and, as a result, enhances hydrophobic interactions with membrane structures. For DMSO molecules, a relatively high value of distribution coefficient is characteristic [18]. The alcohols and DMSO solutions may be assumed to have a stabilizing effect on mouse oocyte membrane due to a pronounced hydrophobic interaction with membrane structures. This assumption agrees well with the reported data. J.H. Crowe et al. [4] used the Fourier-transform infrared spectroscopy and showed a stabilizing effect of trehalose and some aminoacids on cell membranes to be stipulated namely by hydrophobic interactions. The authors hypothesized that the molecules of such cryoprotectants as DMSO interacted with membrane lipids heads, thereby causing a stabilizing effect on cell membranes. M.L. Fernández and R. Reigada [8] simulated the lipid membrane electroporation in DMSO presence using the molecular dynamics method, and showed that under its effect the stable hydrophobic pores of small radius might be formed in lipid membrane, entailing a change in membrane properties, an increase in their permeability for various agents, and electric conductivity as well. Proceeding from the reported data, we may assume that a stabilizing effect of cryoprotectant solutions, in particular DMSO, the prevention of irreversible electric breakdown, as well as a rapid growth of electric conductivity within the range of initial values of fields intensity can be mediated by formation of stable hydrophobic pores.

The AC and FA molecules are characterized by relatively low values of partition coefficients [11, 18]. It is also known that the permittivity and the



ных значений напряженности поля могут быть опосредованы формированием стабильных гидрофобных пор.

Для молекул АЦ и ФА характерны относительно невысокие значения коэффициентов распределения [3, 12]. Известно, что диэлектрическая проницаемость и дипольный момент молекул определяют полярность среды экспозиции. Среди исследованных в работе криопротекторов наиболее высокие значения диэлектрической проницаемости характерны для молекул АЦ и ФА [2]. Проникая через мембраны, эти вещества могут существенно изменять диэлектрическую проницаемость липидного бислоя и механические свойства мембран, влияя на конформационное состояние мембранных белков и белков цитоскелета, создавая условия для появления структурных мембранных дефектов и тем самым понижая величину напряжения электрического пробоя.

Таким образом, импульсная кондуктометрия представляет собой перспективный экспериментальный подход к исследованию влияния криозащитных сред на плазматические мембраны клеток, в частности гамет и эмбрионов млекопитающих. Преимущество данного метода состоит в том, что он позволяет оценить устойчивость мембраны одиночной клетки в растворах криопротекторов по характеру ее проводимости при равномерном изменении напряженности поля. При этом электрическая проводимость может рассматриваться как информативный параметр, характеризующий состояние биологических мембран и их изменение под действием различных внешних факторов, в том числе и криоконсервирования.

Выводы

1. Растворы криопротекторов, принадлежащие к классу спиртов, а также ДМСО в концентрации 1,0 М оказывают стабилизирующее действие на плазматические мембраны ооцитов мыши, что проявляется в устойчивости плазматических мембран ооцитов к действию электрического поля возрастающей напряженности. Стабилизирующее действие, вероятно, обусловлено гидрофобным взаимодействием между молекулами криопротекторов и гидрофобными участками мембран.

2. Растворы криопротекторов класса амидов в концентрации 1,0 М не оказывают стабилизирующего действия на мембраны ооцитов мыши, возможно, из-за высокой гидрофильности молекул и слабого взаимодействия молекул криопротекторов с мембранными структурами.

dipole moment of molecules determine the exposure medium polarity. Among the cryoprotectants we studied here, the highest values of permittivity belong to AC and FA molecules [9]. By penetrating into a cell, these substances may significantly change the lipid bilayer permittivity and mechanical properties of membranes, affect the conformational state of membrane protein and cytoskeletal ones, by creating conditions for appearance of structural membrane defects and thereby lowering the electric breakdown voltage.

Thus, the pulsed conductometry is a promising experimental approach to studying the impact of cryoprotective media on cell plasma membranes, in particular gametes and mammalian embryos. This method advantage is to enable the evaluation of membrane stability of a single cell in cryoprotectant solutions according to the nature of change in its conductivity when the field intensity changes uniformly. Herewith, an electric conductivity may be considered as an informative cell parameter, characterizing the state of biological membranes and their change under the effect of various external factors, including cryopreservation.

Conclusions

1. Solutions of the cryoprotectants, being alcohol-containing compounds, as well as 1.0 M DMSO stabilized the plasma membranes of mouse oocytes, that was manifested thereby in the oocyte plasma membrane resistance to the effect of increasing electric field. This stabilizing effect was likely due to a hydrophobic interaction between cryoprotectant molecules and hydrophobic membrane sites.

2. Solutions of the cryoprotectants, belonging to amides had no stabilizing effect on mouse oocyte membranes at 1.0 M concentration, possibly due to a high hydrophilicity of molecules and a weak interaction of cryoprotectant molecules with membrane structures.

References

1. Best BP. Cryoprotectant toxicity: facts, issues, and questions. *Rejuvenation Res* 2015; 18(5): 422–36.
2. Chekurova NR, Kislov AN, Veprintsev BN. [The effect of cryoprotectants on electric parameters of mouse embryo cell membranes]. *Kriobiologia*. 1990; (1): 25–9. Russian.
3. Chernomordik LV. Electropores in lipid bilayers and cell membranes. in: Chang. DC, Chassy BM, Saunders JA, Sowers AE, editors. *Guide to electroporation and electrofusion*. London: Academic Press. 1992. p 63–76.
4. Crowe JH, Hoekstra FA, Crowe LM, et al. Lipid phase-transitions measured in intact-cells with Fourier-transform infrared-spectroscopy. *Cryobiology*. 1989; 26(1): 76–84.



Литература

1. Дамаскин ББ, Петрий ОА, Цирлина ГА. Электрохимия. Москва: Химия КолоС; 2006. 672 с.
2. Карапетян ЮА, Эйчис ВН. Физико-химические свойства электролитных неводных растворов. Москва: Химия; 1989. 256 с.
3. Линник ТП, Бизикина ОВ. Криоконсервирование спермы пещуров. I. Цитотоксичность диолов и амидов. Проблемы криобиологии. 2001; (2): 72–9.
4. Манк М, редактор. Биология развития млекопитающих. Методы. Москва: Мир, 1990. 406 с.
5. Пичугин ЮИ. Итоги и перспективы поиска новых эндоцеллюлярных криопротекторов. Проблемы криобиологии. 1999; (2): 3–10.
6. Смольянинова ЄІ, Шигимага ВО, Колеснікова АО, та ін. Вплив ступеня зрілості на електричну провідність ооцитів мишей. Біологія тварин. 2015; 17(1): 118–25.
7. Смольянинова ЕИ, Шигимага ВА, Стриха ОА, и др. Электрическая проводимость как диагностический параметр оценки качества ооцитов и эмбрионов млекопитающих в биотехнологических операциях. Биофизика живой клетки. 2014; (10): 193–5.
8. Смольянинова ЕИ, Шигимага ВА, Стриха ОА, и др. Влияние этапов криоконсервирования методом витрификации в этиленгликоль-сахарозной среде на электрическую проводимость 2-клеточных эмбрионов мышей. Проблемы криобиологии и криомедицины. 2013; 23(3): 228–39.
9. Смольянинова ЄІ, Стриха ОА, Шигимага ВО, та ін. Визначення електричної провідності ембріонів мишей доімплантаційних стадій розвитку після гормональної стимуляції яєчників тварин. *Biotechnologia Acta*. 2013; 6(1): 105–12.
10. Смольянинова ЄІ, Шигимага ВО, Колеснікова АО. Вплив гормональної стимуляції на морфологічні та електричні параметри ооцитів миші. Біологія тварин. 2009; 11(1–2): 329–38.
11. Чекурова НР, Кислов АН, Вепринцев БН. Действие криопротекторов на электрические характеристики клеточной мембраны эмбрионов мыши. Криобиология. 1990; (1): 25–9.
12. Шевченко НА, Стрибуль ТФ, Розанов ЛФ. Действие многоатомных спиртов и ДМСО на сохранность меристем винограда и картофеля. Проблемы криобиологии. 2004; (3): 79–85.
13. Best BP. Cryoprotectant toxicity: facts, issues, and questions. *Rejuvenation Res* 2015; 18(5): 422–36.
14. Chernomordik LV. Electropores in lipid bilayers and cell membranes. in: Chang. DC, Chassy BM, Saunders JA, Sowers AE, editors. *Guide to electroporation and electrofusion*. London: Academic Press. 1992. p 63–76.
15. Crowe JH, Hoekstra FA, Crowe LM, et al. Lipid phase-transitions measured in intact cells with Fourier transform infrared spectroscopy. *Cryobiology*. 1989; 26(1): 76–84.
16. Elliott GD, Wang S, Fuller BJ. Cryoprotectants: a review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures. *Cryobiology*. 2017; 76: 74–91.
17. Fahy GM. The relevance of cryoprotectant «toxicity» to cryobiology. *Cryobiology*. 1986; 23(1): 1–13.
18. Fernández ML, Reigada R. Effect of dimethyl sulfoxide on lipid membrane electroporation. *J Phys Chem*. 2014; 118(31): 9306–12.
19. Larman MG, Minasi MG, Rienzi L, Gardner DK. Maintenance of the meiotic spindle during vitrification in human and mouse oocytes. *Reprod Biomed Online* [Internet]. 2007 Dec [Cited 13.09.2018]; 15(6): 692–700. Available from: www.rbmonline.com/Article/2987.
20. Mandawala AA, Harvey SC, Roy TK, Fowler KE. Cryopreservation of animal oocytes and embryos: Current progress and future prospects. *Theriogenology*. 2016; 86(7): 1637–44.
21. Moussa M, Shu J, Zhang X, Zeng F. Cryopreservation of mammalian oocytes and embryos: current problems and future perspectives. *Sci China Life Sci*. 2014; 57(9): 903–14.
22. Damaskin BB, Petriy JF, Tsirlina GA. [Electrochemistry]. Moscow; Khimia KoloS, 2006. 672 p. Russian
23. Elliott GD., Wang S., Fuller BJ. Cryoprotectants: a review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures. *Cryobiology* 2017; 76: 74–91.
24. Fahy GM. The relevance of cryoprotectant 'toxicity' to cryobiology. *Cryobiology*. 1986; 23(1):1–13.
25. Fernández ML, Reigada R. Effect of dymethyl sulfoxide on lipid membrane electroporation. *J Phys Chem*. 2014; 118(31): 9306–12.
26. Karapyetyan YuA, Eichys VN. [Physico-chemical properties of electrolyte non-aqueous solutions]. Moscow; Khimia; 1989. 256 p. Russian.
27. Larman MG, Minasi MG, Rienzi L, Gardner DK. Maintenance of the meiotic spindle during vitrification in human and mouse oocytes. *Reprod Biomed Online* [Internet]. 2007 Dec [Cited 13.09.2018]; 15(6): 692–700. Available from: www.rbmonline.com/Article/2987.
28. Linnik TP, Bizikina OV. Fowl sperm cryopreservation. I. Cytotoxicity of diols and amides. *Problems of Cryobiology*. 2001; (2): 72–9.
29. Mandawala AA, Harvey SC, Roy TK, Fowler KE. Cryopreservation of animal oocytes and embryos: Current progress and future prospects. *Theriogenology*. 2016; 1586(7): 1637–44.
30. Mank M, editor. [Developmental biology of mammals. Methods]. Moscow; 1990. 406 p. Russian.
31. Moussa M, Shu J, Zhang X, Zeng F. Cryopreservation of mammalian oocytes and embryos: current problems and future perspectives. *Sci China Life Sci*. 2014; 57(9): 903–14.
32. Pichugin Yul. Results and perspectives in searching of new endocellular cryoprotectants. *Problems of Cryobiology* 1999; (2): 3–10.
33. Pogorelov AG, Katkov II, Smolyaninova EI, Goldshtein DV. Changes in intracellular potassium and sodium content of 2-cell mouse embryos induced by exposition to vitrification concentrations of ethylene glycol. *Cryo-Letters*. 2006; 27(2): 87–98.
34. Rols MP. Electroporabilization, a physical method for the delivery of therapeutic molecules into cells. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1758 (3): 423–8.
35. Shevchenko NA, Strybul TF, Rozanov LF. Effect of multiatom alcohols, amides and DMSO on grape and potato meristems integrity. *Problems of Cryobiology*. 2004; (3): 79–85.
36. Shigimaga VA. Pulsed conductometer for biological cells and liquid media. *Measurement Techniques*. 2013; 55(11): 1294–300.
37. Smolaninova EI, Shigimaga VF, Kolesnikova AA, et al. [The stage of murine oocyte maturation correlates with their electric conductivity.] *The Animal Biology* 2015; 17(1): 118–25. Ukrainian.
38. Smolyaninova EI, Shigimaga VA, Strikha OA et al. [Electric conductivity as a diagnostic parameter for mammalian oocyte and embryo quality estimation in biotechnology operations.] *Biophysika zhivoi kletki* 2014; (10): 193–5. Russian.
39. Smolyaninova EI, Shigimaga VA, Strikha OA, et al. Effect of cryopreservation stages by vitrification in ethylene glycoland sucrose medium on 2-cell murine embryos electric conductivity. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2013; 23(3): 228–39.
40. Smolyaninova EI, Strikha OA, Shigimaga VA, et al. Electric conductivity of murine embryos at preimplantation developmental stages after ovary hormonal stimulation in animal. *Biotechnologia Acta*. 2013; 6(1): 105-12.
41. Smolyaninova EI, Shigimaga VA, Kolesnikova AA. [The effect of Hormone stimulation on morphological and electric parameters of murine oocytes.] *The Animal Biology*. 2009; 11(1-2): 329–38. Ukrainian.
42. Szusek EF, Eroglu A. Comparison and avoidance of toxicity of penetrating cryoprotectants. *PLoS One*[Internet]. 2011 Nov 16 [Cited 13.09.2018]; 6(11): e27604. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0027604>.



22. Pogorelov AG, Katkov II, Smolyaninova EI, Goldshtein DV. Changes in intracellular potassium and sodium content of 2-cell mouse embryos induced by exposition to vitrification concentrations of ethylene glycol. *CryoLetters*. 2006; 27(2): 87–98.
23. Rols MP. Electroporabilization, a physical method for the delivery of therapeutic molecules into cells. *Biochim Biophys Acta*. 2006; 1758(3): 423–8.
24. Shigimaga VA. Pulsed conductometer for biological cells and liquid media. *Measurement Techniques*. 2013; 55(11): 1294–300.
25. Szusek EF, Eroglu A. Comparison and avoidance of toxicity of penetrating cryoprotectants. *PLoS One*[Internet]. 2011 Nov 16 [Cited 13.09.2018]; 6(11): e27604 Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0027604>.
26. Tsong TY. Electroporation of cell membrane. *Biophys J*. 1991; 60(2): 297–306.
27. Weaver JC. Theory of electroporation: a review. *Bioelectrochem Bioenerg*. 1996; 41(2): 135–160.
28. Zimmermann U. Electric field mediated fusion and related electrical phenomena. *Biochim Biophys Acta*. 1982; 694(3): 227–77.