

УДК 57.086.13

Ю.Ю. Шахова^{1,*}, А.П. Палій², А.П. Палій³,
В.О. Шигимага³, В.М. Кісь³, В.І. Іванов³

Використання багатокомпонентних криозахисних середовищ під час криоконсервування ембріонів миші методом вітрифікації

UDC 57.086.13

Yu.Yu. Shakhova^{1*}, A.P. Paliy², A.P. Paliy³,
V.O. Shigimaga³, V.M. Kis³, V.I. Ivanov³

Use of Multicomponent Cryoprotective Media During Cryopreservation of Murine Embryos by Vitrification

Ключові слова: ембріони, вітрифікація, багатокомпонентне криозахисне середовище.

Key words: embryos, vitrification, multicomponent cryoprotective medium.

Кріоконсервування методом вітрифікації має переваги порівняно з повільним заморожуванням. Успішні результати використання цього методу отримані в допоміжних репродуктивних технологіях під час відтворення сільськогосподарських тварин [3, 9]. Так, після вітрифікації життєздатність (здатність до розвитку *in vitro*) для ембріонів овець становить 26,6% [4]; корів – 77,3% [5]; кроликів – 24% [8]; свиней – 27,5% [6]. Використовують суміші з 3–4-х криопротекторів, що зменшує токсичний ефект кожного із компонентів та забезпечує високу частоту виживання ембріонів після впливу факторів кріоконсервування [2, 7].

Мета роботи – вивчення впливу кріоконсервування ембріонів мишей методом вітрифікації з використанням різних багатокомпонентних вітрифікуючих середовищ на морфофункціональні характеристики ембріонів мишей *in vitro*.

Експерименти проводили відповідно до Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3447-IV від 21.02.2006 р.) та положення «Європейської конвенції з захисту хребетних тварин, які використовуються в експериментальних та інших наукових цілях» (Страсбург, 1986).

Cryopreservation by vitrification has advantages over slow freezing. During the reproduction of farm animals in assisted reproductive technologies successful results have been obtained using this method [7, 9]. Thus, after vitrification, the viability (ability to develop *in vitro*) for sheep embryos is 26.6% [8]; for cows it is 77.3% [6]; for rabbits it makes 24% [3] and for pigs it is 27.5% [1]. These are used the mixtures of 3–4 cryoprotectants, reducing the toxic effect of each of the components and providing a high survival rate of embryos after exposure to cryopreservation factors [2, 5].

The research aim was to study the effect of murine embryos cryopreservation by vitrification using different multicomponent vitrifying media on the morpho-functional characteristics of murine embryos *in vitro*.

The experiments were performed in accordance with the Law of Ukraine ‘On the Protection of Animals Against Cruelty’ (N3447-IV dated of February 21, 2006) agreed to the statements of ‘European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes’ (Strasbourg, 1986).

Murine embryos of pre-implantation developmental stages (morula and early blastocyst) were obtained

¹ Луганський національний аграрний університет, м. Старобільськ, Україна

² Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків, Україна

³ Харківський національний технічний університет сільського господарства імені Петра Василенка, м. Харків, Україна

***Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:**

вул. Слобожанська, 68, м. Старобільськ, Україна 92703;
тел.: (+38 097) 498-29-47
електронна пошта: yuliaschach@ukr.net

Надійшла 20.02.2019

Прийнята до друку 23.04.2020

¹ Luhansk National Agrarian University, Starobilsk

² National Scientific Center ‘Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine’, Kharkiv

³ Kharkiv Petro Vasylenko National Technical University of Agriculture, Kharkiv

***To whom correspondence should be addressed:**

68, Slobozhanska str., Starobilsk, Ukraine 92703;
tel.: +380 97 498 2947
e-mail: yuliaschach@ukr.net

Received February, 20, 2019

Accepted April, 23, 2020

Ембріони мишей передімплантаційних стадій розвитку (морули та ранньої бластоцисти) отримували від самок мишей гібриду F1 (C57BL × CBA). У самок викликали суперовуляцію (без урахування стадії естрального циклу) внутрішньочеревним уведенням гонадотропних гормонів: 5 МО гонадотропіну сироватки жеребих кобил («Folligon», Нідерланди) і через 48 годин – 7,5 МО хоріонічного гонадотропіну людини («Chorulon», Нідерланди). Для одержання ембріонів самок підсаджували до самців на ніч для запліднення. День виявлення копуляційної пробки вважали першим днем вагітності. Ембріони отримували через 80–96 годин після ін'єкції хоріонічного гонадотропіну людини [1]. Прижиттєве морфологічне оцінювання ембріонів проводили візуально під мікроскопом. Відмічали прозорість цитоплазми, деформацію мембрани, лізис та дегенерацію бластомерів.

На першому етапі визначали частоту зберігання ембріонів миші після їх експозиції у криозахисних розчинах: розчин 1 – 25% етиленгліколю + 25% гліцерину + 0,3 М сахарози на фосфатно-сольовому буфері (ФСБ) («Sigma-Aldrich», США) з 10% фетальної телячої сироватки (ФТС) («Sigma-Aldrich», США); розчин 2 – 20% етиленгліколю + 20% диметилсульфоксиду + 0,5 М сахарози на ФСБ із 20% ФТС. Залежно від використаного криозахисного розчину тварин розділили на групи: 1А ($n = 11$) – час експозиції 30 с; 1В ($n = 5$) – час експозиції 45 с; 2А ($n = 10$) – час експозиції 30 с; 2В ($n = 26$) – час експозиції 45 с; 2С ($n = 15$) – час експозиції 60 с; 3 (контроль, $n = 23$) – свіжовиділені ембріони витримували у стандартному середовищі культивування (ФСБ із 20% ФТС).

Ембріони груп 1А, В та 2А–С поміщали у відповідні розчини криопротекторів на зазначений термін і проводили етап видалення криозахисного розчину (переносили у розчин 0,5 М сахарози на ФСБ із 10% ФТС на 5 хв, далі трикратно піпетували ембріони у розчині ФСБ із 20% ФТС). Після попереднього оцінювання ембріони культивували у ФСБ + 20% ФТС при 37°C протягом 4–6 год (до стадії бластоцисти) (табл. 1).

Встановлено, що у групах 1А та 2В збереженість ембріонів миші за морфологічними характеристиками склала $(81,82 \pm 11,63)$ та $(80,0 \pm 17,89)\%$ відповідно. У групах 2А–С виживання ембріонів залежно від часу експозиції у розчинах криопротекторів становило $(90,00 \pm 9,94)$, $(88,00 \pm 6,37)$ та $(80,00 \pm 8,45)\%$ відповідно. У контрольному розчині $(95,65 \pm 4,21)\%$ ембріонів мали нормальні морфологічні характеристики.

На другому етапі роботи було вивчено вплив криоконсервування без етапу експозиції у багато-

from female F1 hybrid mice (C57BL × CBA). In females, the superovulation (excluding the stages of estrous cycle) was induced by intraperitoneal administration of gonadotropic hormones such as: 5 IU of gonadotropin of pregnant mare serum (Folligon, the Netherlands) and, after 48 h, 7.5 IU of human chorionic gonadotropin (Chorulon, the Netherlands). To obtain embryos, the females were transplanted to males at night for fertilization. The first day of pregnancy was the day of a copulation plug detection. Embryos were obtained 80–96 h after injection of human chorionic gonadotropin [4]. Lifetime morphological evaluation of embryos was performed visually using a microscope. Cytoplasmic transparency, membrane deformation, lysis and blastomere degeneration were found.

At the first stage, the storage frequency of mice embryos was determined after their exposure in the cryoprotective solutions such as: the 1st solution was 25% ethylene glycol + 25% glycerol + 0.3 M sucrose in phosphate-buffered saline (PBS) (Sigma-Aldrich, USA) with 10% fetal bovine serum (FBS) (Sigma-Aldrich, USA); the 2nd solution was 20% ethylene glycol + 20% dimethyl sulfoxide + 0.5 M sucrose in PBS with 20% FBS. Depending on the used cryoprotective solution, the animals were divided into the groups: 1A ($n = 11$) – exposure time was 30 s; 1B ($n = 5$) – exposure time was 45 s; 2A ($n = 10$) – exposure time was 30 s; 2B ($n = 26$) – exposure time was 45 s; 2C ($n = 15$) – exposure time was 60 s; 3 (control, $n = 23$) – freshly isolated embryos were kept in a standard culture medium (PBS with 20% FBS).

Embryos of groups 1A, B and 2A–C were placed into appropriate cryoprotective solutions for the specified period and there was performed the stage of cryoprotective solution removal (transferred to a solution of 0.5 M sucrose in PBS with 10% FBS for 5 min, then the embryos were pipetted three times in PBS solution with 20% FBS). After preliminary evaluation, the embryos were cultured in PBS + 20% FBS at 37°C for 4–6 h (up to the blastocyst stage) (Table 1).

It was found that in groups 1A and 2B the integrity of mice embryos by morphological characteristics was (81.82 ± 11.63) and $(80.0 \pm 17.89)\%$, respectively. In groups 2A–C, the survival of embryos depending on the exposure time in cryoprotective solutions was (90.00 ± 9.94) , (88.00 ± 6.37) and $(80.00 \pm 8.45)\%$, respectively. In the control solution $(95.65 \pm 4.21)\%$ the embryos had normal morphological characteristics.

At the second stage, the cryopreservation effect without exposure stage in multicomponent vitrifying media on the frequency of blastocyst formation *in vitro* was studied. Therefore, four experimental groups



компонентних вітрифікуючих середовищах на частоту формування бластоцист *in vitro*. З цією метою формували чотири дослідні групи: 1 (вітрифікація у розчині 25% етиленгліколю + 25% гліцерину + 0,3 М сахарози на ФСБ з 10% ФТС); 2 (20% етиленгліколю + 20% диметилсульфокси-

were formed: the 1st group (vitrification with 25% ethylene glycol + 25% glycerol + 0.3 M sucrose solution in PBS with 10% FBS), the 2nd group (20% ethylene glycol + 20% dimethyl sulfoxide + 0.5 M sucrose in PBS with 20% FBS), the 3rd group (direct plunging into liquid nitrogen of embryos with pre-equilibra-

Таблиця 1. Частота зберігання ембріонів після експозиції з багатокомпонентними криозахисними розчинами
Table 1. Frequency of embryo storage after exposure with multicomponent cryoprotective solutions

Група Group	Кількість ембріонів Number of embryos	Час експозиції у криозахисних середовищах, с Exposure time in cryoprotective media, s	Частота зберігання, % Storage frequency, %
1A	11	30	81,82 ± 11,63
1B	5	45	80,00 ± 17,89
2A	10	30	90,00 ± 9,94
2B	26	45	88,00 ± 6,37
2C	15	60	80,00 ± 8,45*
3 (контроль) 3 (control)	23	-	95,65 ± 4,21

Примітка: * – відмінності значущі порівняно з контролем, $p < 0,05$.

Note: * – differences are significant if compared with the control, $p < 0.05$.

ду + 0,5 М сахарози на ФСБ із 20% ФТС); 3 (пряме занурення ембріонів у рідкий азот із попередньою еквілібрацією у розчині ФСБ із 20% ФТС + 25% гліцерину + 3,0 М сахарози); 4 – свіжоотримані ембріони (табл. 2).

Визначено, що частота виживання та показник життєздатності ембріонів миші у групах 1 та 2 були значущо нижчими порівняно з групами 3 та 4. Тоді як зазначені показники ембріонів групи 3 відповідали таким групи 4. Отже, можна стверд-

tion in PBS solution with 20% FBS + 25% glycerol + 3.0 M sucrose), the 4th group (freshly obtained embryos) (Table 2).

It was determined that the survival rate and viability index of mice embryos in the groups 1 and 2 were significantly lower if compared with the groups 3 and 4. Whereas these indices for embryos of the 3rd group corresponded to those of the 4th group. Therefore, it can be confirmed that the proposed embryo vitrification method without exposure stage to cryo-

Таблиця 2. Частота формування бластоцист *in vitro* після криоконсервування методом вітрифікації
Table 2. Frequency of blastocyst formation *in vitro* after cryopreservation by vitrification

Група Group	Кількість ембріонів, шт. Number of embryos, units	Збереженість, % Integrity, %	Життєздатність, % Viability, %
1	12	75,0 ± 9,37*	41,7 ± 11,23*
2	15	66,6 ± 8,15*	40,0 ± 9,67*
3	20	95,0 ± 3,62	78,9 ± 6,37
4	17	100,0 ± 7,63	88,2 ± 9,21

Примітка: * – різниця значуща порівняно з групами 3 та 4, $p < 0,05$.

Note: * – differences are significant if compared with groups 3 and 4, $p < 0.05$.



жувати, що запропонований метод вітрифікації ембріонів без етапу експозиції у кріозахисних середовищах позитивно впливає на частоту їх виживання та здатність до подальшого розвитку *in vitro*, оскільки показники відповідають контрольному рівню.

Таким чином, використання методу вітрифікації без етапу експозиції у зазначених розчинах за частотою виживання та формування бластоцист *in vitro* не дозволяє досягнути рівня показників виживання та життєздатності ембріонів, кріоконсервованих із попередньою експозицією. Проте слід зазначити, що в умовах експедиційної роботи не завжди можливо проводити усі технологічні етапи кріоконсервування, тому отримані результати можна вважати задовільними та перспективними для подальшої роботи.

Результати досліджень будуть використані для кріоконсервування ембріонів ссавців в умовах кріобанків дослідних лабораторій.

Література

1. Манк М. Биология развития млекопитающих. Методы. Москва: Мир; 1990. 406 с.
2. Носкова ЮО, Кривохарченко ИС, Захарова ЕЕ, и др. Мультипротекторная витрификация ооцитов. Создание и использование криобанка ооцитов доноров: опыт клиники МАМА. Проблемы репродукции. 2012; (5): 59–67.
3. Смольянинова ЕИ, Стриха ОА, Шигимага ВА, и др. Влияние различных этапов кріоконсервирования методом витрификации на морфофункциональные и электрические параметры эмбрионов мыши. Проблемы криобиологии. 2012; 22 (3): 275.
4. Тойшибеков Е, Тойшибеков М. Изучение влияния медленного замораживания и витрификации на жизнеспособность эмбрионов овец. Научные труды Всероссийского института животноводства. 2004; 62 (2): 105–11.
5. Шелудяков МВ. Кріоконсервация эмбрионов методом витрификации у коров после завершения продуктивного периода. Научные труды Всероссийского института животноводства. 2004; 62 (2): 89–94.
6. Gajda B, Smorag Z. Survive al of pig morula and blastocyst after exposure to vitrification media or vitrification. CryoLetters. 2000; 21 (4): 231–6.
7. Hocht S. Cryopreservation of follicular oocytes and preimplantation embryos in cattle and horses. J Reprod Develop. 2003; 49 (1): 13–21.
8. Hocht S. Successful vitrification of pronuclear stage rabbit zygotes by minimum volume cooling procedure. Theriogenology. 2004; 61 (2–3): 267–75.
9. Yurchuk T, Petrushko M, Fuller B. Science of cryopreservation in reproductive medicine – Embryos and oocytes as exemplars. Early Hum Dev. 2018; 126: 6–9.

protective media positively affects their survival rate and ability to further develop *in vitro*, whereas the indices correspond to the control level.

Thus, the use of vitrification method without the exposure stage in selected solutions on the survival rate and formation of blastocysts *in vitro* does not allow to achieve the survival and viability levels for embryos cryopreserved with pre-exposure. However, it should be noted that under fieldwork conditions it is not always possible to carry out all technological stages of cryopreservation, therefore the obtained results can be considered as adequate and promising for further work.

The obtained research results will be used for cryopreservation of mammalian embryos under conditions of cryobanks of research laboratories.

References

1. Gajda B, Smorag Z. Survive al of pig morula and blastocyst after exposure to vitrification media or vitrification. CryoLetters. 2000; 21 (4): 231–6.
2. Hocht S. Cryopreservation of follicular oocytes and preimplantation embryos in cattle and horses. J Reprod Develop. 2003; 49 (1): 13–21.
3. Hocht S. Successful vitrification of pronuclear stage rabbit zygotes by minimum volume cooling procedure. Theriogenology. 2004; 61 (2–3): 267–75.
4. Mank M. [Developmental biology of mammals. Methods]. Moscow: Mir; 1990. 406 p. Russian.
5. Noskova YuO, Krivoharchenko IS, Zakharova EE, et al. [Multiprotective vitrification of oocytes. Creation and use of a cryobank of donor oocytes: the experience of the MAMA clinic]. Problemy Reprodukci. 2012; (5): 59–67. Russian.
6. Sheludyakov MB. [Cryopreservation of embryos by vitrification in cows after the end of the productive period]. Nauchnyetrudyy Vserossiyskogo instituta zhivotnovodstva. 2004; 62 (2): 89–94. Russian.
7. Smolyaninova Yel, Striha OA, Shigimaga VA, et al. Effect of different cryopreservation stages involved vitrification on morphofunctional and electrical parameters of early mice embryos. Problems of Cryobiology. 2012; 22 (3): 275.
8. Tosibekov E, Tosibekov M. [Study of the effect of slow freezing and vitrification on the viability of sheep embryos]. Nauchnyetrudyy Vserossiyskogo instituta zhivotnovodstva. 2004; 62 (2): 105–11. Russian.
9. Yurchuk T, Petrushko M, Fuller B. Science of cryopreservation in reproductive medicine – Embryos and oocytes as exemplars. Early Hum Dev. 2018; 126: 6–9.

