Probl Cryobiol Cryomed 2022; 32(4):256–266
https://doi.org/10.15407/cryo32.04.256

оригінальне дослідження research article

УДК 57.086.13599.323.4-131:577.352.4:576.52

Є.І. Смольянінова[1]*, В.О. Шигимага[2], Л.І. Попівненко[1], І.Ф. Коваленко[1]

Міжклітинна адгезія та електричні параметри мембран ембріонів миші після кріоконсервування методом вітрифікації

UDC 57.086.13599.323.4-131:577.352.4:576.52

Ye.I. Smolyaninova[1]*, V.O. Shigimaga[2], L.I. Popivnenko[1], I.F. Kovalenko[1]

Cell-to-Cell Adhesion and Electrical Parameters of Murine Embryo Membranes After Cryopreservation by Vitrification

Реферат: У роботі проведено дослідження впливу різних етапів кріоконсервування методом вітрифікації в етиленгліколь-сахарозному середовищі на адгезивні властивості плазматичних мембран та питому електричну провідність 8-клітинних ембріонів мишей. Ембріони були розподілені на контрольну, групи 1 (інкубація у середовищі вітрифікації) та 2 (повний цикл кріоконсервування) експериментальні групи. Експозиція у середовищі вітрифікації не впливала на їхню здатність до міжклітинної адгезії. Після повного циклу кріоконсервування адгезія ембріонів була відсутня. Електричну провідність мембран зародків визначали методом імпульсної кондуктометрії. Показано, що після інкубації у середовищі вітрифікації знижується їхня стійкість до дії електричного імпульсу, що проявляється у явищі необоротного електричного пробою. Середні значення електричної провідності змінювалися у діапазонах: ((12,1 ± 1,5)…(55,5 ± 2,6)), ((28,7 ± 5,7)...(44,9 ± 8,9)), ((31,0 ± 9,3)...(87,9 ± 26,1)) мкСм/см у контрольній, групах 1 та 2 відповідно. Отримані результати можна пояснити тим, що вже на етапі інкубації ембріонів у середовищі вітрифікації з'являються перші структурні порушення ліпідного бішару їхніх мембран. Відсутність адгезивних властивостей бластомерів після вітрифікації-відігріву свідчить про пошкодження мембранних білків адгезії.

Ключові слова: ембріон, адгезія, вітрифікація, електропорація, електричний пробій, електрична провідність, етиленгліколь, кріоконсервування.

Abstract: In this work, we have studied the impact of various stages of cryopreservation by vitrification in ethylene glycol-sucrose medium on plasma membranes adhesive properties of 8-cell murine embryos and their specific electrical conductivity. Embryos were divided into the following experimental groups: the control, group I (incubation in vitrification medium) and group 2 (complete cycle of cryopreservation). The embryo exposure to vitrification medium did not affect their ability to cell-to-cell adhesion. After a complete cycle of cryopreservation, no embryo adhesion was observed. Electrical conductivity of embryo membranes was determined using the pulsed conductometry. After incubation in vitrification medium, their resistance to electric pulse was shown to decrease, that was manifested in the phenomenon of irreversible electric breakdown. The average values of electrical conductivity varied within the following ranges: ((12.1 ± 1.5)...(55.5 ± 2.6)), ((28.7 ± 5.7)...(44.± 8.9)), ((31.0 ± 9.3)...(87.9 ± 26.1)) μS/cm in the control, groups I and 2, respectively. These findings may be explained by appearance of first structural disorders in lipid bilayer of embryo membranes even at the stage of their incubation in vitrification medium. The lack of adhesive properties of blastomeres after vitrification-warming testified to a damage to the membrane adhesion proteins.

Key words: embryo, adhesion, vitrification, electroporation, electrical breakdown, electrical conductivity, ethylene glycol, cryopreservation.

Ембріони миші передімплантаційних стадій розвитку є зручною моделлю для вивчення механізмів адгезії та міжклітинної взаємодії [12, 16, 24]. Висока адгезивність, яка була виявлена у ембріонів мишей передімплантаційних стадій розвитку, обумовлена наявністю Ca^{2+}-залежних білків сімейства Е-кадгеринів, які відіграють ключову роль у формуванні міжклітинних контактів, компактизації ембріона та подальшій диференціації бластомерів на стадії бластоцисти [10, 24]. Найбільш виражені адгезивні властивості притаманні зародкам мишей на стадії

Preimplantation mouse embryos are a convenient model to explore the adhesion mechanisms and cell-to-cell interaction [5, 11, 24]. High adhesiveness, revealed in pre-implantation murine embryos is due to the presence of Ca^{2+}-dependent proteins of E-cadherin family, which play a key role in cell-to-cell contact formation, embryo compaction, and further blastomere differentiation at blastocyst stage [3, 24]. The 8-blastomere murine embryos are characterized by most pronounced adhesive properties, which are the basis to create the artificial animal chimeras, used to solve

[1] Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків, Україна
[2] Державний біотехнологічний університет, м. Харків, Україна

***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

Надійшла 14.12.2021
Прийнята до друку 28.10.2022

[1] Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine
[2] State Biotechnological University, Kharkiv, Ukraine

***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

Received 14, December, 2021
Accepted 28, November, 2022

© Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, 2022
© Publisher: Publishing House 'Akademperiodyka' of the National Academy of Sciences of Ukraine, 2022

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.

восьми бластомерів, що стало підставою для створення штучних химер тварин, яких використовують для вирішення багатьох задач біології розвитку: дослідження експресії генів, визначення механізмів морфогенезу та диференціації, створення трансгенних тварин [9, 16, 21, 24]. Простим у виконанні методом створення химер є агрегаційний, який передбачає злиття ембріонів в умовах *in vitro*.

Під час розгляду механізмів адгезії також важливо враховувати біофізичні параметри клітин. Так, мембранний потенціал забезпечує координацію агезивної взаємодії клітина-клітина, клітина-позаклітинний матрікс протягом запліднення і раннього фолікулогенезу ссавців та обумовлює адгезію бластомерів ембріонів протягом передімплантаційного розвитку та імплантації [11, 15]. Визначення електричних параметрів мембран ембріонів із застосуванням адекватних методів вимірювання може надати додаткову інформацію про стан плазматичних мембран після дії фізико-хімічних чинників кріоконсервування.

Використання передімплантаційних ембріонів ссавців у біотехнологічних операціях і експериментальних роботах потребує достатньої кількості зародків, яку можна забезпечити за допомогою технології кріоконсервування [14]. Наразі в літературі існує небагато повідомлень про успішне використання деконсервованих ембріонів у біотехнологічних операціях із створення реконструйованих зародків [13, 17]. У свою чергу, вплив умов низькотемпературного зберігання на здатність зародків до адгезії може стати критерієм оптимізації режимів кріоконсервування. Плазматична мембрана клітин — основна мішень дії фізико-хімічних чинників, тому оцінка її стану на окремих етапах кріоконсервування з використанням різних клітинних параметрів є важливою складовою кріобіологічних досліджень.

Раніше за допомогою методу імпульсної кондуктометрії (ІК) в зростаючому за напруженістю імпульсному електричному полі (ІЕП) ми показали, що електрична провідність є параметром, який віддзеркалює стан мембран ооцитів під час фолікулогенезу [4, 6], ембріонів миші впродовж раннього ембріогенезу [3], а також за умов дії розчинів кріопротекторів [7] та на різних етапах кріоконсервування [5].

У даному дослідженні ми визначали електричну провідність та адгезивні властивості 8-клітинних ембріонів миші для оцінки стану їхніх мембран за умов кріоконсервування методом вітрифікації.

Мета роботи — дослідження впливу різних етапів кріоконсервування методом вітрифікації

many tasks in developmental biology, namely to investigate the gene expression, detect the morphogenesis and differentiation mechanisms, create transgenic animals [2, 11, 21, 24]. The aggregation method, foreseeing the embryo fusion *in vitro* is an easy-to-implement way for chimera creation.

When considering the adhesion mechanisms, the cell biophysical parameters should be taken into account as well. For example, the membrane potential provides coordination of the cell-cell, cell-extracellular matrix adhesive interactions during fertilization and early folliculogenesis in mammals and stipulates the embryo blastomere adhesion during preimplantation development and implantation [4, 10]. Detecting the electrical parameters of embryo membranes using the adequate measurement methods may provide additional information about plasma membrane state after exposure to physical and chemical factors of cryopreservation.

The use of mammalian preimplantation embryos in biotechnological operations and experimental work requires a sufficient number of embryos, which can be provided by cryopreservation technology [8]. Currently, there are few reports about successful application of frozen-thawed embryos in biotechnological operations to create the reconstructed embryos [7, 12]. In turn, the impact of low-temperature storage conditions on the ability of embryos to adhere may become a criterion to optimize the cryopreservation regimens. The cell plasma membrane is the main target for physical and chemical factors, therefore evaluating its state at the certain stages of cryopreservation using various cell parameters is a key component in cryobiological research.

Previously, using the pulsed conductometry (PC) technique in a pulsed electric field (PEF) of increasing intensity, we showed the electrical conductivity to be the parameter, reflecting the state of oocyte membranes during folliculogenesis [17,19], murine embryos throughout an early embryogenesis [16], as well as under exposure to cryoprotectant solutions [20] and at different stages of cryopreservation [18].

In this study, we determined the electrical conductivity and adhesive properties for 8-cell murine embryos to evaluate their membrane state under cryopreservation by vitrification.

This study aimed to explore the impact of different stages of cryopreservation by vitrification in ethylene glycol-sucrose medium on the cell-to-cell adhesion, fusion and specific electrical conductivity of blastomere plasma membranes in 8-cell murine embryos.

в етиленгліколь-сахарозному середовищі на міжклітинну адгезію, злиття та питому електричну провідність плазматичних мембран бластомерів ембріонів миші 8-клітинної стадії розвитку.

Матеріали і методи

Експерименти на тваринах проводили з дотриманням вимог комітету по біоетики Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України та відповідно до закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3447-IV від 21.02.2006), узгоджених із положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986).

У самок мишей ліній СВА і С57Bl викликали суперовуляцію шляхом внутрішньочеревного введення 5 МЕ гонадотропіну сироватки жеребих кобил (Folligon, Нідерланди) та 7 МЕ хоріонічного гонадотропіну людини (лХГ, Chorulon, Нідерланди) з інтервалом 48 годин. Після введення лХГ самок підсаджували до самців для запліднення. На наступний день перевіряли наявність копуляційних пробок, що свідчило про настання у тварин вагітності. Ембріони на стадії восьми бластомерів отримували з відпрепарованих яйцепроводів за стандартним методом [2] після інєкції лХГ. Усі маніпуляції з ембріонами проводили у фізіологічному середовищі Дюльбеко з додаванням 5% фетальної телячої сироватки (ФТС) при кімнатній температурі.

Основні етапи протоколу кріоконсервування зародків миші у етиленгліколь-сахарозному середовищі методом вітрифікації були детально описані у попередніх дослідженнях [1, 5].

Було проведено дві серії експериментів. У першій серії визначали вплив окремих етапів протоколу кріоконсервування методом вітрифікації на адгезивні властивості 8-клітинних ембріонів миші. Зародки були розподілені на контрольну та дві експериментальні групи. Контрольну групу склали 8-клітинні ембріони (n = 18) відразу після виділення. Ембріони експериментальної групи 1 (n = 22) інкубували протягом 5 хв у 10%-му розчині етиленликолю (ЕГ), після чого їх переносили до середовища вітрифікації (30% ЕГ + 0,7М сахарози) і витримували 3 хв. До експериментальної групи 2 увійшли ембріони (n = 25), які піддавали повному циклу кріоконсервування. Інкубовані у розчині ЕГ та середовищі вітрифікації зародки переносили в об'ємі 5 мкл середовища у пластикові соломини (Pacific Vet,

Materials and methods

Experiments in animals were carried out in compliance with the requirements of the Bioethics Committee of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine and in accordance with the Law of Ukraine 'On the Protection of Animals against Cruelty' (No. 3447-IV of February 21, 2006), agreed to the statements of 'European Convention on the Protection of Vertebrates Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes' (Strasbourg, 1986).

The superovulation was induced in CBA and C57Bl female mice by intraperitoneal administration of 5 IU of pregnant mare serum gonadotropin (PMSG, Folligon, The Netherlands) and 7 IU of human chorionic gonadotropin (hCG, Chorulon, The Netherlands) with 48 hrs interval. After hCG injection, the females were placed with males for fertilization. The next day, the presence of copulation plugs was checked, which indicated the onset of pregnancy in animals. The 8-blastomere embryos were isolated from the cut-out oviducts in 72 hrs after hCG administration using the standard technique [9]. All the manipulations with embryos were performed in Dulbecco's phosphate-buffered saline supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS) at room temperature.

The main steps of protocol for murine embryo cryopreservation in ethylene glycol-sucrose medium by vitrification were specified in previous studies [6, 18].

Two series of experiments were conducted. In the first series, we have studied the impact of certain steps of the cryopreservation by vitrification protocol on adhesive properties of 8-cell murine embryos. Embryos were divided into the control and two experimental groups. The control group consisted of 8-cell embryos (n = 18) immediately after being isolated. Embryos of experimental group 1 (n = 22) were incubated for 5 min in a 10% ethylene glycol (EG) solution, then transferred into vitrification medium (30% EG + 0.7M sucrose) and exposed for 3 min. Experimental group 2 included the ones (n = 25), subjected to a complete cycle of cryopreservation. The embryos, incubated in EG solution and vitrification medium were transferred in a 5 μl volume of medium into plastic straws (Pacific Vet, Australia), then immersed into liquid nitrogen, and stored there for 3–7 days. Embryos were warmed by immersing straws in a water bath (37°C). To remove the cryoprotectant, they were transferred into drops (100 μl) of 0.5 M sucrose solution, kept for 10 min, and washed three times with Dulbecco's

Австралія), занурювали у рідкий азот, у якому зберігали протягом 3–7 діб. Ембріони відігрівали зануренням соломинок у водяну баню (37°С). Для видалення кріопротектора ембріони переносили у краплі (100 мкл) 0,5 М розчину сахарози на 10 хв та тричі відмивали у фізіологічному середовищі Дюльбеко з додаванням 5% ФТС.

Збереженість деконсервованих ембріонів оцінювали за морфологічними ознаками: цілісність бластомерів та прозорість цитоплазми.

Для дослідження адгезивних властивостей ембріонів прозору оболонку (*zona pellucida*) видаляли шляхом їх інкубації в кислому розчині Тіроде протягом кількох секунд за стандартним методом [2]. Потім зародки переносили в краплі сольового середовища Дюльбеко із додаванням 5% ФТС, попарно гуртували голкою один з одним і витримували 3 години при 37°С. Процес адгезії ембріонів контролювали методом світлової мікроскопії через 1,5 та 3 години.

У другій серії експериментів визначали питому електричну провідність 8-клітинних ембріонів миші після інкубації у розчині кріопротектора та середовищі вітрифікації. Після отримання зародки розподіляли на групи відповідно до першої серії експериментів.

Питому електричну провідність ембріонів визначали методом ІК, основний принцип якого та умови експерименту було детально описано раніше [18, 20]. Ембріони контрольної та експериментальних груп двічі відмивали в краплях (100 мкл) фізіологічного середовища Дюльбеко з подальшим дворазовим відмиванням в 0,3 М розчині сахарози на деіонізованій воді для видалення решток електролітів. Потім зародки на предметному склі переносили на предметний столик світлового мікроскопа. В краплю розчину сахарози з ембріоном занурювали мікроелектроди таким чином, щоб ембріон знаходився між ними. До виходу генератора прямокутних імпульсів напруги послідовно з мікроелектродами підключали калібрований резистор, на якому вимірювали амплітуду електричного імпульсу. Питому електричну провідність поодиноких ембріонів розраховували згідно з раніше визначеним алгоритмом [19]. Були побудовані залежності електричної провідності 8-клітинних ембріонів миші від напруженості імпульсного електричного поля.

Аналіз даних проводили за кінцевими значеннями електричної провідності окремих ембріонів. Дані представляли у вигляді середніх значень ± стандартне відхилення. Для оцінки

phosphate-buffered saline supplemented with 5% FBS.

The survival of frozen-thawed embryos was assessed by morphological features, *i. e.* blastomere integrity and cytoplasm transparency.

To investigate the adhesive properties of embryos, the *zona pellucida* was removed by incubating them in acidic Tyrode's solution for several seconds using the standard technique [9]. After that, embryos were transferred into the drops of Dulbecco's phosphate-buffered saline supplemented with 5% FBS, paired with each other using a needle and kept for 3 hrs at 37°C. Embryo adhesion was monitored by light microscopy 1.5 and 3 hrs later.

In the second series of experiments, a specific electrical conductivity of 8-cell murine embryos after incubation in cryoprotectant solution and vitrification medium was determined. After receiving, the embryos were divided into the groups according to the first series of experiments.

The PC method was used to measure the specific electrical conductivity in embryos, the basic principle of which and the experiment conditions were described in detail earlier [13, 15]. Embryos of the control and experimental groups were washed twice in drops (100 μl) of Dulbecco's phospate-buffered saline, followed by two-fold washing out in 0.3 M sucrose solution in deionized water to remove residual electrolytes. Then, the embryos were transferred on a glass slide to the light microscope stage. Microelectrodes were immersed into a drop of sucrose solution with an embryo in such a way that the embryo was between them. A calibrated resistor was connected with the output of rectangular pulse generator sequentially with microelectrodes, using which the electric pulse amplitude was measured. The specific electrical conductivity of individual embryos was calculated according to the previously designed algorithm [14]. The dependences of electrical conductivity of 8-cell murine embryos on the pulsed electric field intensity were plotted.

Data were analyzed based on the final values of electrical conductivity of individual embryos. Data were presented as mean values ± standard deviation. To evaluate significance of differences, the groups were pairwise compared using the Student's t-test. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

Results and discussion

Fig. 1 presents the microphotographs of 8-cell murine embryos of the control group after imme-

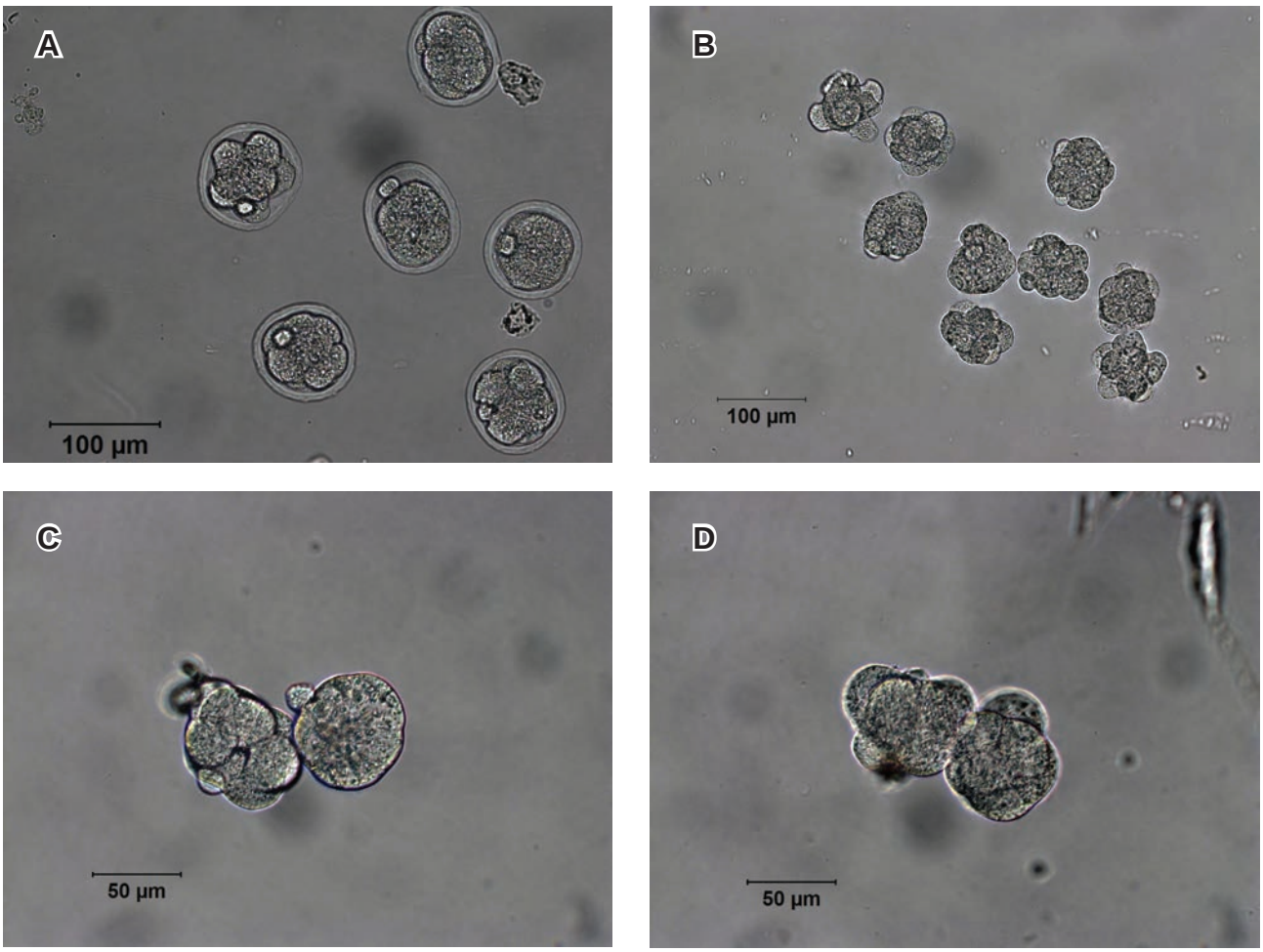


Рис. 1. 8-клітинні ембріони миші контрольної групи: після виділення з яйцепроводів (**A**); після видалення прозорої оболонки (**B**); через 1,5 години (**C**) і 3 години (**D**) інкубації в середовищі Дюльбеко при 37°C.

Fig. 1. The 8-cell murine embryos of control group: after isolation from oviducts (**A**); after *zona pellucida* removal (**B**); in 1.5 (**C**) and 3 hrs (**D**) after incubation in Dulbecco's medium at 37°C.

значущості відмінностей проводили попарне порівняння між групами з використанням t-критерію Стьюдента. Відмінності вважали значущими при $p < 0,05$.

Результати та обговорення

На рис. 1 представлені мікрофотографії 8-клітинних ембріонів мишей контрольної групи відразу після виділення з яйцепроводів (рис. 1, A) та видалення прозорої оболонки (рис. 1, B).

Через 1,5 години інкубації при 37°C зародки контрольної групи демонстрували усі ознаки міжклітинної адгезії (рис. 1, C), а через 3 години — ознаки злиття (рис. 1, D), оскільки відокремити їх один від одного було неможливо.

Ембріони миші експериментальної групи 1 після експозиції в розчині ЕГ і середовищі вітрифікації також демонстрували ознаки адгезії через 1,5 години інкубації (рис. 2, A), а через 3 години — ознаки злиття (рис. 2, B).

diate isolation from oviducts (Fig. 1A) and zona pellucida removal (Fig. 1B).

After a 1.5-hour incubation at 37°C, the control group embryos showed all the signs of cell-to-cell adhesion (Fig. 1C), and those of fusion 3 hrs later (Fig. 1D), since their separation from each other was impossible.

Murine embryos from the experimental group I after exposure in EG solution and vitrification medium also demonstrated the signs of adhesion in 1.5 hrs after incubation (Fig. 2A), and those of fusion 3 hrs later (Fig. 2B).

These data show the incubation of murine embryos in vitrification medium not to affect their ability to adhere and fuse, that may testify to the preservation of membrane proteins, ensuring the cell-to-cell adhesion.

Just after a full cycle of cryopreservation (experimental group 2), no morphological changes in embryos were observed (Fig. 3A). However, following embryo incubation at 37°C for 1.5 hrs

Як видно з поданих даних, інкубація ембріонів миші в середовищі вітрифікації не впливає на їхню здатність до адгезії та злиття, що може свідчити про збереження мембранних білків, які забезпечують міжклітинну адгезію.

Відразу після повного циклу кріоконсервування (експериментальна група 2) ми не спостерігали морфологічних змін ембріонів (рис. 3, А). Проте наступна інкубація ембріонів при 37°С протягом 1,5 години призводила до втрати їх адгезивних властивостей (рис. 3, В). Через 3 години інкубації ембріони ставали декомпактизованими і виглядали як агрегати клітин, а бластомери набували округлої форми та набухали (рис. 3, С).

Відсутність адгезії між ембріонами безпосередньо після кріоконсервування можна пояснити пошкодженням поверхневих мембранних білків адгезії, які беруть участь у взаємодії мембран бластомерів, і для відновлення яких необхідно деякий час за умов оборотного характеру цих пошкоджень. Такий феномен був описаний S. Kito та співавт. [13]. Також відомо, що адгезивні властивості 8-клітинного ембріона більш виражені у його внутрішній зоні завдяки формуванню філопоїдів, збагачених молекулами Е-кадгерину, який забезпечує тісну взаємодію бластомерів та сприяє компактизації ембріона. M.D. White та співавт. [24] показали, що експериментальне видалення Е-кадгерину призводить до порушення компактизації ембріона та його перетворення у агрегати клітин округлої форми.

У той самий час пошкодження плазматичних мембран може мати більш складний характер і зачіпати ліпідний бішар. Для оцінки його стану було застосовано метод ІК, заснований на явищі електричного пробою мембрани живої клітини.

Феномен електропорації проявляється у порушенні напівпроникних властивостей мембран клітин під дією зовнішнього електричного поля. Згідно з сучасними уявленнями саме ліпідний бішар є основною мішенню дії електричного імпульсу [8, 22]. Дві властивості бішару визначають чутливість мембрани до дії електричного поля: заряди або діелектричні диполі ліпідних молекул і мала проникність для іонів [23]. Дія електричного поля призводить до різкого збільшення мембранного потенціалу, що викликає локальні перебудови у ліпідному бішарі та формування наскрізних пор. Це явище має назву електричний пробій, який може бути як оборотним так і необоротним [22]. Електричною характеристикою цього процесу є електропровідність клітини, яка істотно змінюється зі зростанням напруженості поля [19, 20]. Також

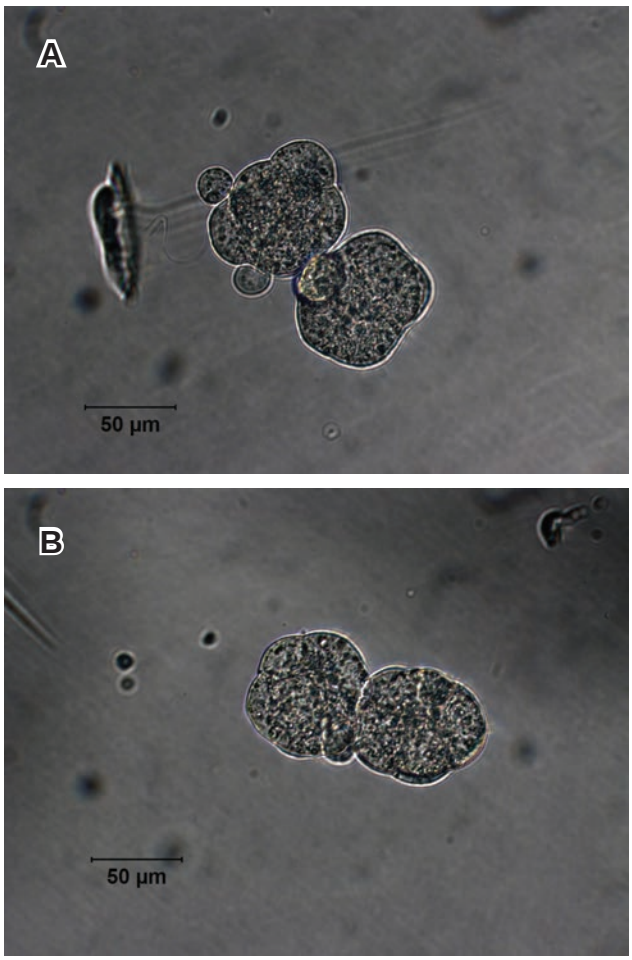
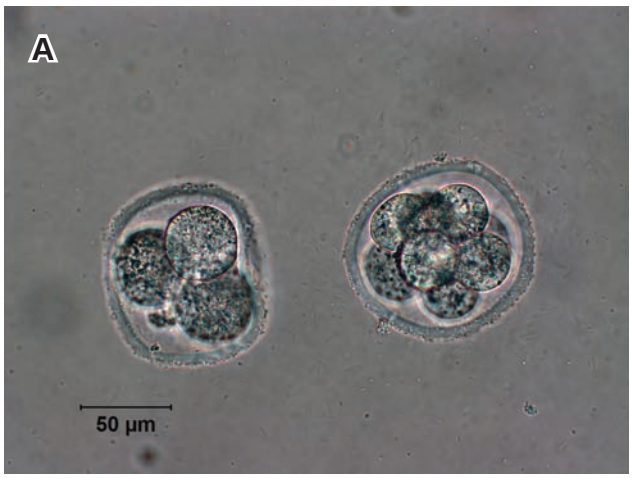


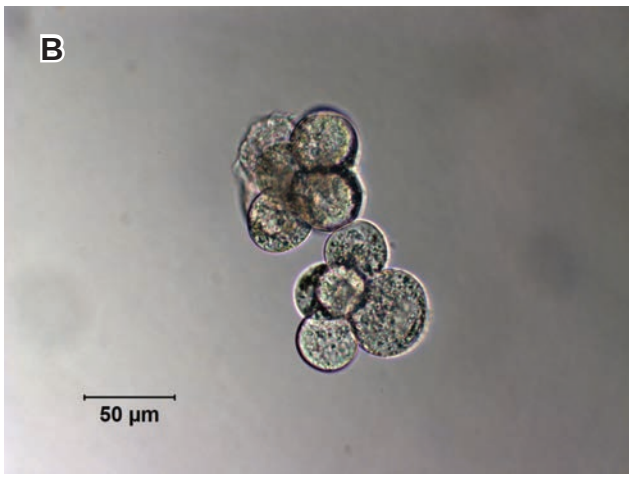
Рис. 2. 8-клітинні ембріони миші експериментальної групи 1 через 1,5 (**А**) і 3 години (**В**) інкубації в середовищі Дюльбеко при 37°С.

Fig. 2. The 8-cell murine embryos of experimental group 1 in 1.5 (**A**) and 3 hrs (**B**) after incubation in Dulbecco's medium at 37°C.

resulted in loss of their adhesive properties (Fig. 3B). After a 3-hour incubation, the embryos became decompacted and seemed like cell aggregates, while the blastomeres were rounded in shape and swollen (Fig. 3C).

No adhesion between embryos immediately after cryopreservation may be explained by a damage to surface membrane adhesion proteins, involving in blastomere membranes interaction, and requiring some time to recover if these damages are reversible. This phenomenon was described by S. Kito *et al.* [7]. The adhesive properties of 8-cell embryo are also known to be more pronounced in its inner zone due to filopoid formation, enriched with E-cadherin molecules, ensuring tight interaction between blastomeres and promoting embryo compaction. M.D. White *et al*. [24] showed that an experimental removal of E-cadherin resulted in disruption of embryo compaction and its transformation into rounded cell aggregates.





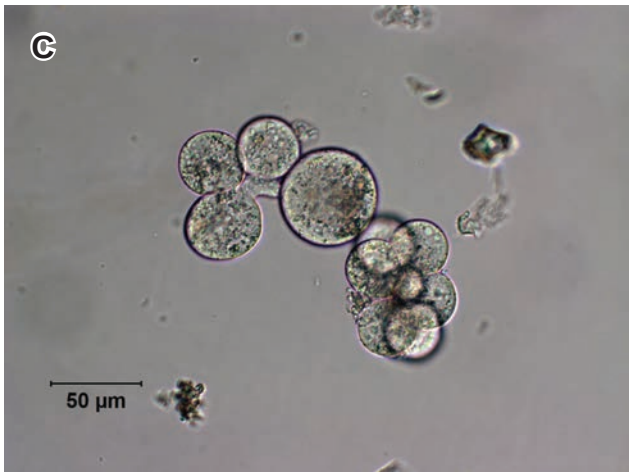


Рис. 3. 8-клітинні ембріони миші експериментальної групи 2 після повного циклу кріоконсервування методом вітрифікації (**A**); через 1,5 (**B**) і 3 години (**C**) інкубації в середовищі Дюльбеко при 37°С.

Fig. 3. The 8-cell murine embryos of experimental group 2 after complete cycle of cryopreservation by vitrification (**A**); in 1.5 (**B**) and 3 hrs (**C**) after incubation in Dulbecco's medium at 37°C.

відомо, що вплив зовнішніх фізико-хімічних чинників на структуру мембрани відбивається на значенні критичної напруженості електричного поля, яке викликає електричний пробій [19].

Залежність електропровідності ембріонів контрольної групи від збільшення напруженості ІЕП мала монотонно зростаючий характер (рис. 4), що свідчить про поступову електропорацію мембран бластомерів.

Середні значення електропровідності ембріонів за збільшення напруженості ІЕП змінюються в діапазоні ((12,1 ± 1,5)…(55,5 ± 2,6)) мкСм/см. При цьому в дослідженому діапазоні напруженості поля необоротний електричний пробій мембран був відсутній.

Графікі залежності електричної провідності 8-клітинних ембріонів від напруженості ІЕП миші для ембріонів експериментальних груп 1 та 2 представлені на рис. 5.

Після досягнення напруженості ІЕП значення 3,25 кВ/см в обох групах спостерігався різкий зріст електричної провідності, що свідчило про необоротний електричний пробій плазматичних мембран ембріонів.

At the same time, the damage to plasma membranes can be more complex and affect the lipid bilayer. To evaluate its state, we used the PC method, based on the phenomenon of electrical breakdown of living cell membrane.

The electroporation phenomenon is manifested in distubance of semipermeable properties of cell membranes under exposure to external electric field. According to the current concepts, it is the lipid bilayer that is the main target of electric pulse action [1, 22]. There are two bilayer properties that determine membrane sensitivity to electric field effect, *i. e*. the charges or dielectric dipoles of lipid molecules and low permeability for ions [23]. The effect of electric field leads to a sharp increase in membrane potential, causing local rearrangements in lipid bilayer and the through pore formation. This phenomenon is called electrical breakdown, which can be either reversible or irreversible [22]. Electrical parameter of this process is electrical conductivity of cell, which changes significantly with increasing field intensity [14, 15]. It is also known that the influence of external physical and chemical factors on membrane structure is reflected in the value of critical electric field intensity, which causes an electrical breakdown [14].

Dependence of electrical conductivity of the control group embryos on PEF intensity rise had a monotonically increasing character (Fig. 4), that indicated the gradual electroporation of blastomere membranes.

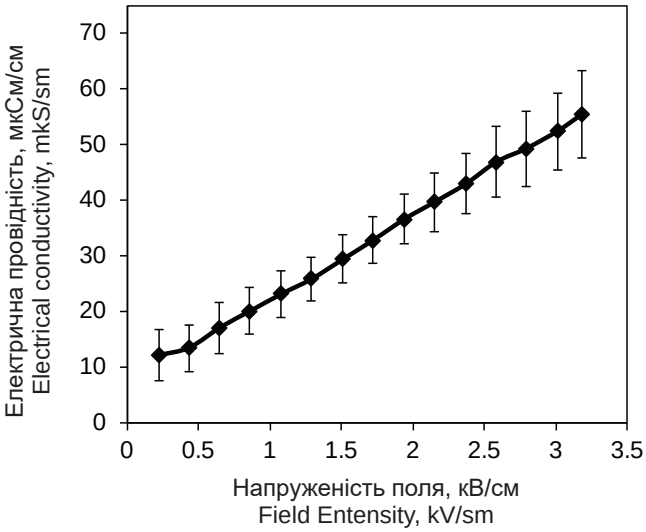


Рис. 4. Залежність питомої електричної провідності 8-клітинних ембріонів миші контрольної групи від напруженості електричного поля.

Fig. 4. Dependence of specific electrical conductivity of 8-cell murine embryos of the control group on electric field intensity.

Середні значення електричної провідності ембріонів експериментальних груп змінювалися у діапазонах: ((28,7 ± 5,7)...(44,9 ± 8,9)) мкСм/см (група 1) та ((31,0 ± 9,3)...(87,9 ± 26,1)) мкСм/см (група 2). Звертає на себе увагу той факт, що початкові значення електропровідності ембріонів експериментальних груп значно перевищують такі контрольної групи ($p < 0,05$). Відомо, що початкові значення електричної провідності від-

Average values of electrical conductivity for embryos under the IEP intensity increase changed within the range ((12.1 ± 1.5)...(55.5 ± 2.6)) μS/cm. Herewith, no irreversible electrical breakdown of membranes within the studied field intensity range was observed.

The Fig. 5 presents the dependency graphs of murine 8-cell embryo electrical conductivity on PEF intensity for embryos from experimental groups 1 and 2.

When the PEF intensity reached the value of 3.25 kV/cm, a sharp increase in electrical conductivity was observed in both groups, testifying to an irreversible electrical breakdown of embryo plasma membranes.

Average values of electrical conductivity of embryos of the experimental groups varied within the ranges: ((28.7 ± 5.7)...(44.9 ± 8.9)) μS/cm (group 1) and ((31.0 ± 9.3)...(87.9 ± 26.1)) μS/cm (group 2). Notably, that the initial values of electrical conductivity of embryos from experimental groups significantly exceeded those of the control group ($p < 0.05$). It is known that the initial values of electrical conductivity reflect the own conductivity of plasma membrane (when the PEF effect is still insignificant) [14]. This difference between embryos of the control and experimental groups may be explained by appearance of structural disorders in blastomere membranes and, especially, in lipid bilayer even during their incubation in vitrification medium. These structural disorders reduce the embryo resistance to electric

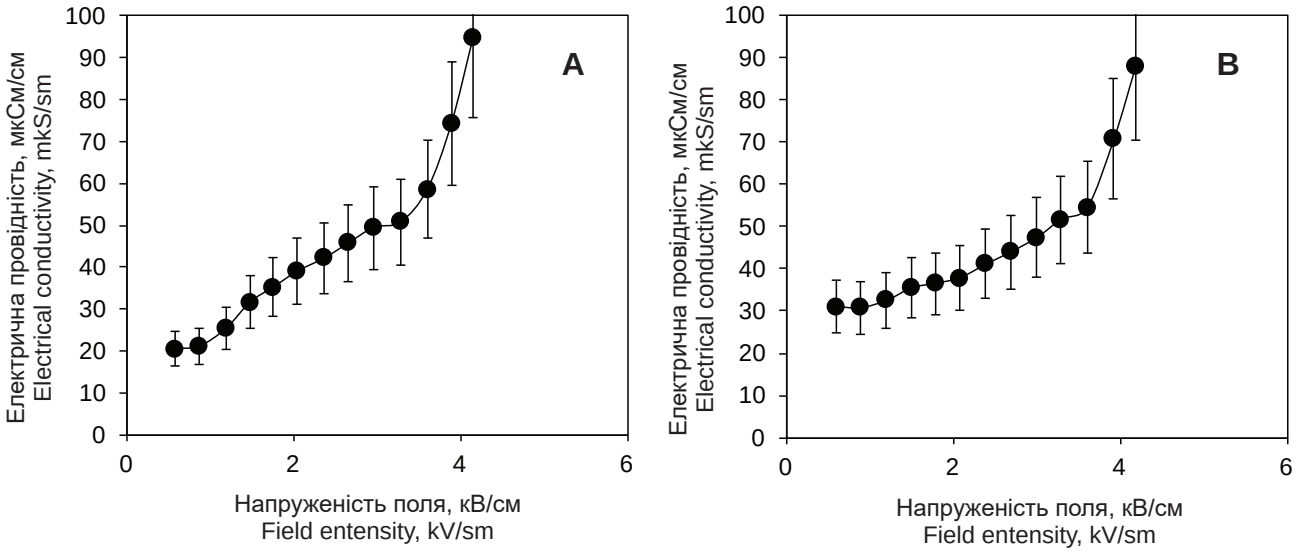


Рис. 5. Залежності провідності 8-клітинних ембріонів від напруженості електричного поля після 3-хвилинної експозиції в середовищі вітрифікації (**A**) та повного циклу кріоконсервування (**B**).

Fig. 5. Dependences of electrical conductivity of 8-cell murine embryos on electric field intensity after 3-min exposure in vitrification medium (**A**) and complete cycle of cryopreservation (**B**).

дзеркалюють власну провідність плазматичної мембрани (коли дія ІЕП ще є несуттєвою) [19]. Цю різницю між ембріонами контрольної та експериментальних груп можна пояснити тим, що вже на етапі їхньої інкубації у середовищі вітрифікації з'являються структурні порушення мембран бластомерів і, перш за все, у ліпідному бішарі. Ці структурні порушення знижують стійкість зародків до дії електричного імпульсу, що проявляється у феномені необоротного електричного пробою та руйнуванні плазматичних мембран. Раніше нами було отримано аналогічні результати щодо впливу різних етапів кріоконсервування у етиленгліколь-сахарозному середовищі методом вітрифікації на електричну провідність 2-клітинних ембріонів миші [5]. При цьому саме час інкубації ембріонів у середовищі вітрифікації мав вирішальне значення. Збільшення часу інкубації 2-клітинних ембріонів миші у середовищі вітрифікації від 1,5 до 3 хв призводило як до зниження стійкості мембран бластомерів ембріонів до дії електричного імпульсу, так і до зниження життєздатності ембріонів. У цьому дослідженні ми експонували 8-клітинні ембріони миші у середовищі вітрифікації протягом 3 хв з метою моделювання пошкодження мембрани під впливом кріозахисного розчину. Згідно з отриманими результатами можна припустити, що перші структурні порушення мембран бластомерів під дією фізико-хімічних чинників кріоконсервування виникають саме у ліпідному бішарі.

Таким чином, адгезивні властивості та електричні характеристики ембріонів мишей можуть служити параметрами оцінки цілісності їхніх плазматичних мембран упродовж кріоконсервування. Подальші дослідження у цьому напрямку передбачають оцінку адгезивних властивостей ембріонів у порівнянні з їхньою морфологічною збереженістю та функціональною життєздатністю.

Висновки

1. Інкубація у етиленгліколь-сахарозному середовищі вітрифікації протягом 3 хв не порушує адгезивні властивості 8-клітинних ембріонів миші, що може свідчити про збереженість мембранних білків адгезії. Однак після вітрифікації-відігріву зародки втрачають здатність до міжклітинної адгезії.

2. Зниження стійкості ембріонів мишей до дії електричного імпульсу відбувається вже після їхньої інкубації у середовищі вітрифікації, що свідчить про структурні порушення ліпідного бішару мембран бластомерів.

pulse action, manifested in irreversible electrical breakdown phenomenon and plasma membrane disrupture. Previously, we obtained similar results as for the effect of individual stages of cryopreservation in ethylene glycol-sucrose medium by vitrification on electrical conductivity of 2-cell murine embryos [18]. In this case, the very time of embryo incubation in vitrification medium was crucial. Increasing the incubation time of 2-cell murine embryos in vitrification medium from 1.5 to 3 min led to a decrease in resistance of embryo blastomere membranes to electric pulse action, and reduction of embryo viability as well. In this study, the 8-cell murine embryos underwent a 3-min exposure to vitrification medium to simulate the membrane damage when affected by cryoprotective solution. Proceeding from these findings, we may assume that the first structural disruptures in blastomere membranes occur under the effect of physical and chemical factors of cryopreservation precisely in the lipid bilayer.

Thus, the adhesive properties and electrical characteristics of murine embryos may serve as the parameters to evaluate their plasma membrane integrity during cryopreservation. Further research in this direction will foresee the assessment of embryo adhesive properties compared to their morphological integrity and functional viability.

Conclusions

1. A 3-min incubation in ethylene glycol-sucrose vitrification medium did not affect the adhesive properties of 8-cell murine embryos, likely testifying to the survival of membrane adhesion proteins. However, after vitrification-warming, the embryos lost their ability for cell-to-cell adhesion.

2. A decreased resistance of murine embryos when exposed to electric pulse occurred already after their incubation in vitrification medium, thus testified to structural disorders in lipid bilayer of blastomere membranes.

References

1. Chehl J. Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research. Acta Physiol Scand. 2003; 177(4): 437–47.
2. Cui XS, Li XY, Shen XH, et al. Transcription profile in mouse four-cell, morula, and blastocyst: Genes implicated in compaction and blastocoel formation. Mol Reprod Dev. 2007; 74(2): 1334–3.

Література

1. Исаченко ВВ, Грищенко ВИ, Осташко ФВ, и др. Сверхбыстрое замораживание эмбрионов крыс и коров без классической эквилибрации. Проблемы криобиологии. 1994; (3): 3–6.
2. Манк М. редактор. Биология развития млекопитающих. Москва: Мир, 1990. 406 с.
3. Смольянінова 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.
4. Смольянінова ЄІ, Шигимага ВО, Колеснікова АО. Вплив гормональної стимуляції на морфологічні та електричні параметри ооцитів миші. Біологія тварин. 2009; 11(1–2): 329–38.
5. 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 криобилогии и криомедицины. 2013; 23(3): 228–39.
6. Смольянінова 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 ВО, Колесникова АО, и др. Электрическая проводимость и устойчивость мембран ооцитов мыши к действию импульсного электрического поля в растворах криопротекторов. Проблемы криобиологии и криомедицины. 2018; 28 (4): 311–1.
8. Chehl J. Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research. Acta Physiol Scand. 2003; 177(4): 437–47.
9 Cui XS, Li XY, Shen XH, et al. Transcription profile in mouse four-cell, morula, and blastocyst: Genes implicated in compaction and blastocoel formation. Mol Reprod Dev. 2007; 74(2): 133–43.
10. De Vries WN, Evsikov AV, Haac BE, et al. Maternal beta-catenin and E-cadherin in mouse development. Development. 2004; 131(18): 4435–45.
11. Emery BR, Miller RL, Carrell DT. Hamster oocyte membrane potential and ion permeability vary with preantral cumulus cell attachment and developmental stage. BMC Dev Biol [Internet]. 2001 10 Oct [Cited 01.11.2021]; 1: 14.Available from: http://www.biomedcentral.com/1471-213X/1/14.
12. Fleming TP, Sheth B, Fesenko I. Cell adhesion in the preimplantation mammalian embryo and its role in trophectoderm differentiation and blastocyst morphogenesis. Front Biosci. 2001;6(1): D1000-7.
13. Kito S, Noguchi Y, Ohta Y, et al. Evalution of developmental competence of vitrified warmed early cleavage stage embryos and their application for chimeric mouse production Exp Anim. 2003; 52(2): 179–83.
14. Landel CP. Cryopreservation of mouse gametes and embryos. Guide to Techniques in Mouse Development, Part A: Mice, Embryos, and Cells, 2nd Edition. 2010. 85–105.
15. Mattioli M, Barboni B, Bacci M. Maturation of pig oocytes: observation on membrane potential. Biol Rreprod. 1990; 43(2): 318–22.
16. Nagy A, Nagy K, Gertsenstein M. Production of mouse chimeras by aggregating pluripotent stem cells with embryos. Guide to Techniques in Mouse Development, Part A: Mice, Embryos, and Cells, 2nd Edition. 2010. 123–149.
17. Nakao K, Nakagata N, Katsuki M. Production of chimeric mice from cryopreserved blastocysts Exp Anim. 1998; 47(3): 167–71.
18. Shigimaga VA. Pulsed conductometry in a variable electric field: outlook for the development of measurements. Measurement Techniques. 2015; 57(10): 1213–8.
19. Shigimaga VA. Measurements of the capacitance of a biological cell by a pulse method. Measurement Techniques. 2014; 57(2): 213–7.
3. De Vries WN, Evsikov AV, Haac BE, et al. Maternal beta- catenin and E-cadherin in mouse development. Development. 2004; 131(18): 4435 45.
4. Emery BR, Miller RL, Carrell DT. Hamster oocyte membrane potential and ion permeability vary with preantral cumulus cell attachment and developmental stage. BMC Dev Biol [Internet]. 2001 10 Oct [Cited 01.11.2021]; 1: 14. Available from: http://www.biomedcentral.com/1471-213X/1/14.
5. Fleming TP, Sheth B, Fesenko I. Cell adhesion in the preimplantation mammalian embryo and its role in trophectoderm differentiation and blastocyst morphogenesis. Front Biosci. 2001; 6(1): D1000 7.
6. Isachenko VV, Grishchenko VI, Ostashko FI, et al. Ultrarapid freezing of embryos of rats and cows without 'classic equilibration'. Problems of Cryobiology. 1994; (3): 3–6.
7. Kito S, Noguchi Y, Ohta Y, et al. Evaluation of developmental competence of vitrified warmed early cleavage stage embryos and their application for chimeric mouse production. Exp Anim. 2003; 52(2): 179–83.
8. Landel CP. Cryopreservation of mouse gametes and embryos. Guide to Techniques in Mouse Development, Part A: Mice, Embryos, and Cells, 2nd Edition. 2010. 85–105.
9. Mank M. editor. [Developmental biology of mammals. Methods]. Moscow. Mir; 1990. 406 p. Russian.
10. Mattioli M, Barboni B, Bacci M. Maturation of pig oocytes: Observation on membrane potential. Biol Rreprod. 1990; 43(2): 318–22.
11. Nagy A, Nagy K, Gertsenstein M. Production of mouse chimeras by aggregating pluripotent stem cells with embryos. Guide to Techniques in Mouse Development, Part A: Mice, Embryos, and Cells, 2nd Edition. 2010. 123–49.
12. Nakao K, Nakagata N, Katsuki M. Production of chimeric mice from cryopreserved blastocysts. Exp Anim. 1998; 47(3): 167–71.
13. Shigimaga VA. Pulsed conductometry in a variable electric field: outlook for the development of measurements. Measurement Techniques. 2015; 57(10): 1213–8.
14. Shigimaga VA. Measurements of the capacitance of a biological cell by a pulse method. Measurement Techniques. 2014; 57(2): 213–7.
15. Shigimaga VA. Impulse conductometer for biological cells and liquid media. Measurement Techniques. 2013; 55(11): 1294–300.
16. Smolyaninova YI, Shigimaga VO, Kolesnikova AO, et al. [Determination of electrical conductivity of embryos of mice in preimplantation stages of development after hormonal stimulation of animal ovaries]. Biotechnologia Acta. 2013; 6(1): 105–12. Ukrainian.
17. Smolyaninova YI, Shigimaga VO, Kolesnikova AO. [Influence of hormonal stimulation on morphological and electrical parameters of mouse oocytes]. Animal Biology. 2009; 11(1–2): 329–38. Ukrainian.
18. Smolyaninova YI, Shigimaga VO, Strikha OA, et al. Effect of cryopreservation stages by vitrification in ethylene glycol and sucrose medium on 2-cell murine embryos electric conductivity. Probl Cryobiol Cryomed. 2013; 23(3): 228–39.
19. Smolyaninova YI, Shigimaga VO, Kolesnikova AO, et al. [Influence of the degree of maturity on the electrical conductivity of mouse oocytes]. Animal Biology. 2015; 17(1): 118–25. Ukrainian.
20. Smolyaninova YI, Shigimaga VO, Kolesnikova AO, et al. Electric conductivity and resistance of mouse oocyte membranes to effect of pulsed electric field in cryoprotectant solutions. Probl Cryobiol Cryomed. 2018; 28 (4): 311–21.
21. Tam PP, Rossant J. Mouse embryonic chimeras: tools for studying mammalian development. Development. 2003; 130(25): 6155–63.
22. Tsong TY. Electroporation of cell membrane. Biophys J. 1991; 60(2): 297–306.

20.Shigimaga VA. Pulsed conductometer for biological cells and liquid media. Measurement Techniques. 2013; 55(11): 1294–300.
21.Tam PP, Rossant J. Mouse embryonic chimeras: tools for studying mammalian development. Development. 2003; 130(25): 6155–63.
22.Tsong TY. Electroporation of cell membrane. Biophys J. 1991; 60(2): 297–306.
23.Weaver JC. Theory of electroporation: a review. Bioelectrocem Bioenerg. 1996; 41(2): 135–60.
24.White MD, Plachta N. Chapter one – how aghesion forms the early mammalian embryo. Curr Top Dev Biol. 2015; 112: 1–17.

23.Weaver JC. Theory of electroporation: a review. Bioelectrocem Bioenerg. 1996; 41(2): 135–60.
24.White MD, Plachta N. Chapter one – how adhesion forms the early mammalian embryo. Curr Top Dev Biol. 2015; 112: 1–17.