

Определение удельной электрической проводимости ооцитов мыши в растворах сахарозы и проникающих криопротекторов методом импульсной кондуктометрии

О.А. СТРИХА, Е.И. СМОЛЬЯНИНОВА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Determination of Mouse Oocyte Specific Electric Conductivity in Solutions of Sucrose and Permeative Cryoprotectants Using Electroporation Method

O.A. STRIKHA, E.I. SMOLYANINOVA

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

Оптимизация программ криоконсервирования ооцитов млекопитающих тесно связана с поиском эффективных криопротекторов и уменьшения их токсичного влияния на клетки. Эффективность криопротекторов, как правило, определяется после цикла низкотемпературного криоконсервирования по оценке сохранности морфологии гамет и их способности к дальнейшему развитию. Широкое применение в криобиологической практике получили исследование осмотического поведения клеток и определение биофизических параметров их плазматических мембран в условиях, моделирующих различные криобиологические ситуации. Однако такие исследования не отвечают на вопрос: почему вещества, обладающие сходной проникающей способностью, оказывают различное по эффективности криозащитное действие? Наряду с осмотическим фактором свой вклад в токсичность вносит непосредственное химическое воздействие криопротектора на клеточные и, прежде всего, мембранные структуры. Попытка разделить эти два фактора требует использования дополнительных методических подходов и расширения спектра изучаемых клеточных параметров.

Цель работы – изучение влияния криопротекторов, принадлежащих к различным классам химических веществ, на электрическую проводимость ооцитов мыши.

Ооциты мыши на стадии МII мейоза получали стандартным методом. Методом импульсной кондуктометрии (электропорации) определяли зависимость электрической проводимости отдельных ооцитов в процессе их экспозиции в изотоническом растворе сахарозы (0,3 М) и 1,0 М растворах этиленгликоля (ЭГ), ацетамида (АЦ), 1,2-пропандиола (1,2-ПД), диметилсульфоксида (ДМСО) от напряженности приложенного электрического поля. Растворы криопротекторов готовили на растворе сахарозы с конечной концентрацией 0,3 М.

Показано, что исследуемые растворы криопротекторов оказывают различное влияние на устойчивость ооцитов мыши к действию электрического импульса. В растворах АЦ и сахарозы электрическая проводимость ооцитов мыши характеризуется относительно небольшими значениями и незначительной скоростью роста ее зависимости от напряженности поля вплоть до необратимого электрического пробоя, который наблюдали при напряженности поля около 3 кВ/см. В растворах ЭГ, ДМСО и 1,2-ПД необратимого электрического пробоя ооцитов не наблюдали, что свидетельствует о стабилизирующем действии этих криопротекторов на плазматические мембраны ооцитов. Таким образом, импульсная кондуктометрия является перспективным экспериментальным методом изучения влияния физико-химических факторов криоповреждения на сохранность клеток.

Optimization of mammalian oocyte cryopreservation protocols is tightly connected with searching of effective cryoprotectants and decreasing their toxic influence on cells. As a rule, the cryoprotectant efficiency is assessed after the low-temperature preservation cycle by estimation of gametes' morphology and their ability to further development. The investigations of cell osmotic behavior and the determination of their plasma membrane biophysical parameters under the conditions that simulate several cryobiological situations are widely used in cryobiological practice. However, such investigations do not answer the question: why substances of similar permeability possess different efficiency of cryoprotective action? The direct chemical influence on cell membranes and cytoplasmic structures as well as osmotic factor contributes to cryoprotectant toxicity. The attempt of separating these two factors demands additional methodical approaches and widening the spectrum of the studied cell parameters.

The aim of this investigation was to study the effect of permeative cryoprotectants which belong to different classes of chemical substances on specific electric conductivity of mouse oocytes.

Mouse MII oocytes were derived by a standard method. Using the techniques of electroporation the dependences of specific electric conductivities of mouse oocytes during their exposure in isotonic sucrose solution (0.3 M) and 1.0 M ethylene glycol (EG), acetamide (AA), 1,2-propanediol (1,2-PD), dimethyl sulfoxide (DMSO) solutions vs. the applied electric field intensity have been studied. The cryoprotectant solutions were prepared on the base of sucrose solution with final concentration of 0.3 M.

It was shown that the investigated cryoprotectant solutions differently affected mouse oocytes stability to the action of electric impulse. In AA and sucrose solutions the specific electric conductivity of mouse oocytes was characterized by relatively small values and insignificant growth rate of its dependence on the external electric field intensity until irreversible electric breakdown occurrence, which was observed at 3 kV/cm intensity. The irreversible electric breakdown of mouse oocytes in EG, DMSO and 1,2-PD solutions was not observed, that testified to stabilizing effect of these cryoprotectants on oocyte plasma membranes. Thus, the method of impulse conductometry is a perspective experimental approach to study the influence of physical-chemical factors of cryoinjury on the cell survival.