

DOI: 10.26693/jmbs03.03.230

УДК 611.651.018.085:57.086.13:547.569.2

*Трутаева И. А., Кирошка В. В., Гурина Т. М.,
Бондаренко Т. П., Филиппов А. А.*

СОХРАННОСТЬ ОВАРИАЛЬНОЙ ТКАНИ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ РЕЖИМАХ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ ПОД ЗАЩИТОЙ ДМСО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков, Украина

irinatoleubekova@gmail.com

В данной работе был проведен сравнительный морфологический и биохимический анализ сохранности овариальной ткани при криоконсервировании под защитой ДМСО в зависимости от концентрации криопротектора и режима охлаждения.

Установлено снижение количества нормальных фолликулов на 20-30% на этапе инкубации после замораживания под защитой 3,0 М ДМСО (режим замораживания без инициации кристаллообразования), что обусловлено наличием латентных повреждений в структуре овариальной ткани в виду токсического действия данного криопротектора. При использовании 1,5 М ДМСО независимо от режима замораживания (с и без инициации кристаллообразования) таковые повреждения отсутствовали, как после удаления криопротектора, так и последующей инкубации ткани. Это связано с равномерным проникновением ДМСО при 22°C по всему объему ткани, которое уменьшало действие механического фактора в процессе кристаллизации. Полученные результаты свидетельствуют о том, что конечная концентрация ДМСО определяет степень повреждения структуры овариальной ткани в зависимости от режима замораживания-оттаивания. Следовательно, при криоконсервировании овариальной ткани необходимо осуществлять подбор режима охлаждения в зависимости от типа и конечной концентрации криопротектора.

Ключевые слова: криоконсервирование, овариальная ткань, ДМСО, нормальные фолликулы, ТБК- активные продукты.

Связь работы с научными программами, планами, темами. Данная работа выполнялась в рамках государственных бюджетных тем ИПКиК НАН Украины «Свойства криоконсервированных первичных культур клеток эндокринных желез неонатальных животных *in vitro* и *in vivo* при трансплантации», шифр 2.2.6.104, № гос. регистрации 0116U003494.

Введение. Криоконсервирование биологических объектов представляет собой многоэтапный процесс, который включает первоначальную экс-

позицию клеток и тканей в растворах, содержащих криопротектор (КП), охлаждение до отрицательных температур, хранение, отогрев, и, наконец, удаление криопротектора. Сложность криоконсервирования овариальной ткани связана с наличием плотных межклеточных контактов в структуре ткани, что приводит к неравномерной динамике проникновения КП, аккумуляции жидкости в межклеточном пространстве, объемным изменениям соматических клеток и ооцита [15]. Для фрагментов овариальной ткани подбор композиционного состава среды инкубации, типа и конечной концентрации КП осуществляется эмпирически на основании экспериментальных данных, полученных для ооцитов и эмбрионов [8].

В работах [3, 14] показано, что при использовании существующих протоколов криоконсервирования сохраняется целостность примордиальных фолликулов, тогда как строма овариальной ткани значительно повреждается кристаллами льда [1]. Предполагается, что уменьшение повреждающего действия механического фактора может быть достигнуто за счет комплексного подхода: оптимизации концентрации и типа криопротектора [3, 14] в сочетании с эффективным режимом замораживания.

Цель работы. Исследовать сохранность фолликулов и динамику накопления ТБК-активных продуктов во фрагментах овариальной ткани после криоконсервирования в зависимости от конечной концентрации ДМСО а также используемого режима замораживания.

Материалы и методы исследования. Эксперименты проводили в соответствии с Законом Украины «О защите животных от жестокого обращения» (№3447-IV от 21.02.2006 г.) и согласованными с положениями «европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986). Объектом исследования служили фрагменты (0,5-1мм³) овариальной ткани крыс линии Вистар, которые содержались в стандартных условиях вивария ИПКиК НАН Украины.

Насыщение фрагментов овариальной ткани проводили в среде ДМЕМ («Sigma», США), содержащей 200мМ сахарозы (534мОсмоль/л), pH = 7,4.

В качестве криопротектора использовали ДМСО. Добавление криопротектора осуществляли поэтапно при 1,5 М (0 М → 1,5 М); при 3,0 М – в два этапа (0 М → 1,5 М → 3,0 М КП), T=22°C. Время экспозиции образца в растворе криопротектора на каждом этапе насыщения составляло 30мин.

В качестве контейнеров для замораживания использовали криоаппулы объемом 2мл («Nunc», США). Общий объем замораживаемого образца составлял 1,5 мл. Замораживание образцов овариальной ткани осуществляли в программном замораживателе («Cryoson», Германия). Режимы охлаждения задавали по температуре охлаждающего потока в камере программного замораживателя.

Замораживание образцов овариальной ткани проводили по двум режимам, отличающихся наличием или отсутствием процедуры температурной инициации кристаллообразования [5].

Режим 1: охлаждение с постоянной скоростью 1 град/мин до температуры начала процедуры инициации кристаллообразования (ИК), температурная ИК, и охлаждение с постоянной скоростью 1 град/мин до -40 °C и последующее погружение в жидкий азот.

Режим 2: охлаждение с постоянной скоростью 1 град/мин до -40 °C и последующее погружение в жидкий азот.

Образцы, отогревали на открытом воздухе, и далее на водяной бане при 37 °C до появления жидкой фазы (1,5мин).

Удаление КП осуществлялось при помощи отмывочного раствора на основе маннитола [7].

Для морфологических исследований готовили полутонкие срезы по стандартной методике [12]. Количество нормальных и дегенеративных фолликулов (дегенеративный тип 1 (ДТ 1) – обратимые

изменения и дегенеративный тип 2 (ДТ 2) – необратимые изменения) выражали в процентах по отношению к общему числу фолликулов в образце. Деструктивные изменения фолликулов были оценены согласно классификации [10]. Гистологические исследования осуществляли с помощью микроскопа со встроенной камерой «AxioObserver Z1» («Carl Zeiss», Германия) с объективом «Plan-Fluor» x20 и x40.

Интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) в гомогенате криоконсервированной ткани измеряли сразу после отмывания и через 3 и 24 часа инкубации в среде ДМЕМ («Sigma») в CO₂ инкубаторе при 37°C. Результаты выражали в виде мкмоль на грамм ткани [6, 13].

Результаты исследования и их обсуждение.

Анализ уровня повреждения фолликулов после удаления криопротектора и последующей инкубации представлен в **рис. 1**. Видно, что во всех экспериментальных точках при удалении криопротектора количество дегенеративных фолликулов типа 2 составляло 15-20%.

Последующая инкубация при 37°C позволила выявить наличие латентных повреждений и проанализировать динамику изменения соотношения нормальных и дегенеративных фолликулов. Как видно из данных (**рис. 1**) на этом этапе, количество нормальных фолликулов уменьшалось на 20-30% при использовании 3,0 М ДМСО и режима 2. При этом возрастал процент дегенеративных фолликулов типа 1, тогда как процент дегенеративных фолликулов типа 2 оставался неизменным.

Другим ключевым биохимическим показателем, характеризующим уровень повреждения фрагментов криоконсервированной овариальной ткани, является интенсивность процессов ПОЛ. Анализ накопления ТБК-активных продуктов после удаления криопротектора и инкубации (**рис. 2**), показал отсутствие достоверного повышения их

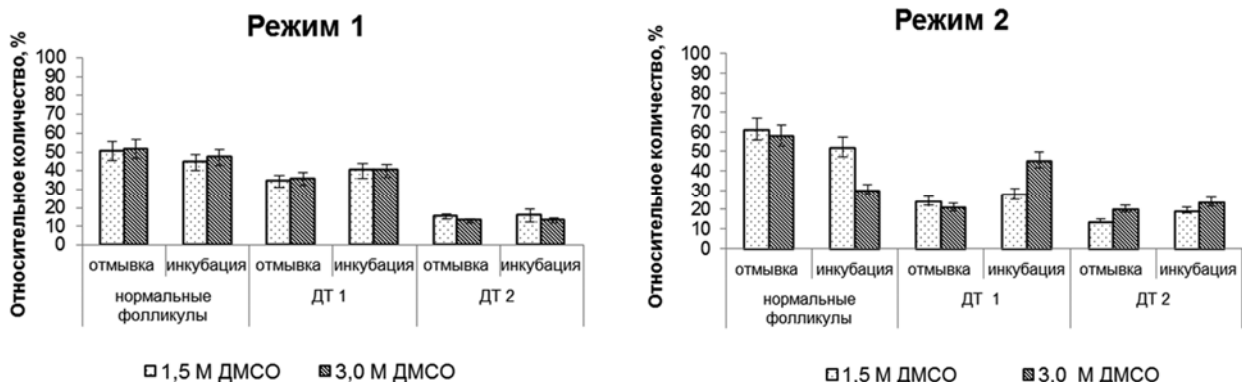


Рис. 1. Относительное количество фолликулов (%) во фрагментах криоконсервированной овариальной ткани после отмывания КП и инкубации (режим1–с ИК, режим 2 – безИК)

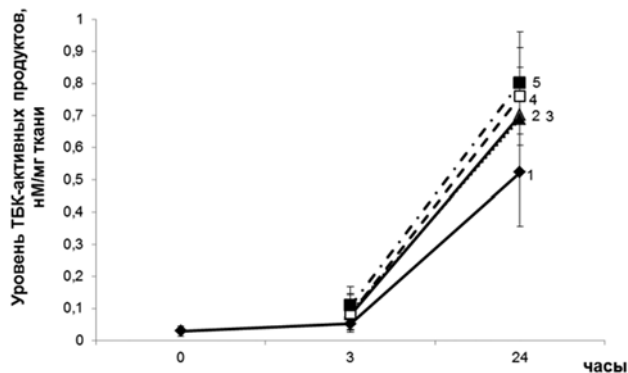


Рис. 2. Уровень ТБК-активных продуктов после удаления ДМСО и инкубации, где контроль (1); 1,5М ДМСО режим 1 (2), режим 2 (3); 3,0 М ДМСО режим 1 (4), режим 2 (5)

концентрации относительно контрольных значений. Концентрация ТБК-активных продуктов возрастала относительно времени инкубации, как в свежeweыделенных фрагментах ткани, так и после криоконсервирования. Следовательно, описанные выше количественные показатели образования дегенеративных фолликулов после удаления криопротектора и при последующей инкубации не являлись критичными для работы про- и антиоксидантных систем клеток в исследуемых фрагментах ткани.

Анализируя, представленные выше экспериментальные данные следует указать на то, что сохранность структуры овариальной ткани является отражением процесса криоповреждения клеток при замораживании-отогреве в зависимости от типа, конечной концентрации ДМСО и режима замораживания.

Так, необходимо обратить внимание на то, что достоверное снижение количества нормальных фолликулов (**рис. 1**) на этапе инкубации свидетельствовало о наличии латентных повреждений в структуре овариальной ткани при замораживании под защитой 3,0 М ДМСО (режим 2). При использовании 1,5М ДМСО независимо от режима замораживания таковые повреждения отсутствовали. В этих случаях был отмечен высокий уровень сохранности фолликулов (**рис. 1**) после удаления криопротектора и последующей инкубации ткани. Эти результаты свидетельствуют о том, что конечная концентрация ДМСО определяет степень повреждения структуры овариальной ткани в зависимости от режима замораживания-оттаивания. В работе [9] показано, что при криоконсервировании

овариальной ткани под защитой 1,5М растворов таких проникающих криопротектора, как ЭГ, ДМСО, 1,2-ПД, глицерин, сохранность фолликулов составляла 84%, 74%, 44% и 10%, соответственно. Авторы работы установили, что степень повреждения фрагмента ткани связана со скоростью проникновения криопротектора с величиной конечной концентрации в глубине образца. Так, было показано методом H^1 -ЯМР спектроскопии, что при +37° С в течение 30 минут распределение 1,5М раствора криопротектора в исследуемом объеме составляет 81% и 99,97% для ДМСО и 1,2-ПД, соответственно. Снижение температуры инкубации до 4°С приводило к достоверной разнице проникновения этих криопротекторов в глубину фрагмента. Насыщение ткани 1,5М концентрациями ДМСО и 1,2-ПД составляло 79и 74%, соответственно.

Следовательно, можно предположить, что в наших экспериментах высокая сохранность фолликулов при криоконсервировании в присутствии 1,5 М концентрации ДМСО независимо от используемого режима замораживания обусловлена равномерным его проникновением по всему объему ткани, что позволило значительно снизить действие механического фактора в процессе кристаллизации.

Известно [4, 11], что проникающие криопротекторы в высоких концентрациях (более 2,0 М) в условиях кристаллизации жидкой фазы ограничивают концентрирование внеклеточных солей, и, следовательно, снижают их осмотическое действие, что способствует сохранению барьерных функций мембран. При этом собственная молярная концентрация криопротектора к моменту его стеклования может достигать 7,5М. Следовательно, можно предположить, что при 3,0 М концентрации ДМСО и замораживании ткани согласно режиму 2 повреждение значительной части клеток (**рис. 1**) было вызвано токсическим действием данного криопротектора.

Выводы. Для повышения эффективности криоконсервирования овариальной ткани необходимо осуществлять подбор режима охлаждения в зависимости от типа и конечной концентрации КП.

Перспективы дальнейших исследований. В следующей серии экспериментов предполагается изучить гормональную функцию криоконсервированных фрагментов овариальной ткани после трансплантации овариоэктомированным животным-реципиентам.

References

1. Amorim CA, Dolmans MM, David A, Jaeger J, Vanacker J, Camboni A, Donnez J, Van Langendonck A. Vitrification and xenografting of human ovarian tissue. *Fertil Steril.* 2012; 98: 1291–8. PMID: 22883570. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2012.07.1109

2. Demirci B, Lornage J, Salle B, Franck M, Frappart L, Guerin F. Follicular viability and morphology of sheep ovaries after exposure to cryoprotectant and cryopreservation with different freezing protocols. *Fertil Steril.* 2001; 75: 754–62. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(00\)01787-8](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(00)01787-8)
3. Fabbri R, Pasquinelli G, Keane D, Magnani V, Paradisi R, Venturoli S. Optimization of protocols for human ovarian tissue cryopreservation with sucrose, 1,2-propanediol and human serum. *Reproductive BioMedicine Online.* 2010; 21: 819–28. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2010.07.008>
4. Gosden RG, Yin H, Bodine RJ, Morris GJ. Character, distribution and biological implications of ice crystallization in cryopreserved rabbit ovarian tissue revealed by cryo-scanning electron microscopy. *Human Reproduction.* 2010; 25 (2): 470–8. PMID: 19933523. DOI: 10.1093/humrep/dep395
5. Gurina TM, Vysekantsev IP, Babinets OM. Standartisation of cryopreservation process of SACCHAROMYCES BOULARDII yeasts for usage in collection and banks of industrial microorganism strains. *Microbiologichny zhurnal.* 2013; 75: 33–9. [Ukrainian]
6. Kiroshka VV, Bozhkova YuO, Trutaieva IA, Gawas AA. Endokrynnna funktsiia transplantativ ovarialnoi tkanyny v zalezhnosti vid intensyvnosti protsesiv perekysnoho okyslennia lipidiv pry ishemii. *Fiziologichnyj Zhurnal.* 2017; 63 (2): 46–55. [Ukrainian] <https://doi.org/10.15407/fz63.02.046>
7. Kiroshka V, Trutaieva I, Bondarenko T. Efficiency of mannitol-supplemented medium during adding / removing ovarian tissue with penetrating cryoprotective agents. *Cell & Tissue Banking.* 2018 Mar;19 (1):123-32. PMID: 28365880. DOI: 10.1007/s10561-017-9623-8
8. Leibo SP. Cryopreservation of oocytes and embryos: optimization by theoretical versus empirical analysis. *Theriogenology.* 2008; 69: 37–47. PMID: 18023472. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2007.10.006
9. Newton H, Fisher J, Arnold JRP, Pegg DEP, Faddy MJ, Gosden RG. Permeation of human ovarian tissue with cryoprotective agents in preparation for cryopreservation. *Hum Reprod.* 1998; 13: 376–80. PMID: 9557842. <https://doi.org/10.1093/humrep/13.2.376>
10. Rodrigues AP, Amorim CA, Costa SH, Matos MH, Santos RR, Lucci CM, Bão SN, Ohashi OM, Figueiredo JR. Cryopreservation of caprine ovarian tissue using dimethylsulphoxide and propanediol. *Animal Reproduction Science.* 2004; 84: 211–27. PMID: 15302399. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2003.12.003>
11. Shaw JM, Oranratnachai A, Trounson AO. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology.* 2000; 53 (1): 59–72. PMID: 10735062. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00240-X](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00240-X)
12. Uikli B. *Jelektronnaja mikroskopija dlja nachinajushhih.* M: Mir; 1975. 324 s. [Russian]
13. Vladimirov YA, Archakov AI. *Lipid peroxidation in biological membranes.* Moscow: Nauka, 1972. 252 p. [Russian]
14. Wang LH, Mullen SF, Li Y, Zhong JQ, Crister JK, Chen ZJ. Morphological and apoptotic comparison of primordial and primary follicles in cryopreserved human ovarian tissue. *Reproduction in Domestic Animals.* 2009; 44: 879–83. PMID: 18992105. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01104.x>
15. Woods EJ, Benson JD, Agca Y, Critser JK. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. *Cryobiology.* 2004; 48: 146–56. PMID: 15094091. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2004.03.002

УДК 611.651.018.085:57.086.13:547.569.2

ЗБЕРЕЖЕНІСТЬ ОВАРІАЛЬНОЇ ТКАНИНИ ПІСЛЯ РІЗНИХ РЕЖИМІВ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ ПІД ЗАХИСТОМ ДМСО

**Трутаєва І. А., Кірошка В. В., Гуріна Т. М.,
Бондаренко Т. П., Філіппов А. А.**

Резюме. У даній роботі було проведено порівняльний морфологічний і біохімічний аналіз збереження оваріальної тканини після кріоконсервування під захистом ДМСО залежно від концентрації кріопротектора і режиму заморожування.

Встановлено зниження кількості нормальних фолікулів на 20-30% на етапі інкубації після заморожування під захистом 3,0 М ДМСО (режим заморожування без ініціації кристалоутворення), що обумовлено наявністю латентних пошкоджень в структурі оваріальної тканини за рахунок токсичної дії даного кріопротектора. При використанні 1,5 М ДМСО незалежно від режиму заморожування (з і без ініціації кристаллоутворення) такі пошкодження були відсутні, як після видалення кріопротектора, так і подальшої інкубації тканини. Це пов'язано з рівномірним проникненням ДМСО при 22 °С по всьому об'єму тканини, яке зменшувало дію механічного фактору ушкодження клітин в процесі кристалізації. Отримані результати свідчать про те, що кінцева концентрація ДМСО визначає ступінь пошкодження структури оваріальної тканини залежно від режиму заморожування-відігріву. Отже, при кріоконсервуванні оваріальної тканини необхідно здійснювати підбір режиму заморожування залежно від типу і кінцевої концентрації кріопротектора.

Ключові слова: кріоконсервування, оваріальна тканина, ДМСО, нормальні фолікули, ТБК-активні продукти.

UDC 611.651.018.085:57.086.13:547.569.2

Ovarian Tissue Preservation after Various Cryopreservation Modes with the Help of DMSO

Trutaieva I. A., Kiroshka V. V., Gurina T. M., Bondarenko T. P., Filippov A. A.

Abstract. *The purpose of the study was to investigate the follicular integrity and dynamics of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) accumulation in ovarian tissue fragments after cryopreservation depending on the final concentration of DMSO as well as the freezing mode.*

Material and methods. The research objects were the fragments of ovarian tissue. As cryoprotective agent (CPA) there was used dimethylsulfoxide (DMSO) in the concentrations of 1.5 M and 3,0 M in DMEM supplemented with 200 mM sucrose. The saturation was carried out step by step: 1.5 M (0 M → 1.5 M); 3.0 M in two stages (0 M → 1.5 M → 3.0 M). The tissue was incubated in CPA solution at 22°C for 30 min in each stage.

Freezing was carried out in two modes. Mode 1: cooling at a rate of 1 deg / min to the start temperature of the initiation of crystal formation (IC), IC, further cooling at a rate of 1 deg / min to -40 °C and immersion into liquid nitrogen. Mode 2: cooling at a rate of 1 deg / min to -40 °C and subsequent immersion into liquid nitrogen. Samples were thawed in a water bath at 37 °C until the liquid phase appeared. The CPA was removed stepwise replacing the cryopreservation medium to DMEM solution containing mannitol.

The number of normal and degenerative follicles was expressed as a percentage of the total number of follicles in the sample.

The intensity of lipid peroxidation in the homogenate of cryopreserved tissue was assessed immediately after washing and after 3 and 24 hours of incubation in a DMEM medium in a CO₂ incubator at 37 °C.

Results and discussion. We noticed a decrease in the number of normal follicles by 20-30% at the stage of incubation after freezing under protection of 3.0 M DMSO (mode 2). This happened due to the presence of latent damage in the structure of ovarian tissue because of the toxic effect of this CPA. When 1.5 M DMSO was used, regardless of the freezing mode, such damage was absent, both after removal of the CPA and subsequent incubation of the tissue. It can be explained by uniform penetration of DMSO at 22°C throughout the tissue volume, which significantly reduces the effect of the mechanical factor of cell damage during crystallization.

Conclusions. The obtained results indicate that the final concentration of DMSO determines the degree of damage to the ovarian tissue structure, depending on the freezing mode. It is necessary to select the cooling mode depending on the type and the final concentration of CPA while conducting cryopreservation of ovarian tissue.

Key words: cryopreservation, ovarian tissue, DMSO, normal follicles, TBARS.

Стаття надійшла 28.02.2018 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування