

УДК 576.535:57.043

М.П. Петрушко*, В.І. Піняєв, О.Б. Ревенко, Н.О. Волкова, Н.Н. Чуб

Морфофункціональні характеристики свіжовиділених і кріоконсервованих клітин гранульози та кумулюса яєчників людини

UDC 576.535:57.043

M.P. Petrushko*, V.I. Pinyayev, O.B. Revenko, N.O. Volkova, N.N. Chub

Morphofunctional Characteristics of Freshly Isolated and Cryopreserved Human Ovarian Granulosa and Cumulus Cells

Реферат: Використання комплексу клітин гранульози та кумулюса (КГК) може бути перспективним при співкультивуванні гамет та ембріонів у програмах допоміжних репродуктивних технологій (ДРТ), що робить нагальним їх кріоконсервування. В роботі вивчали КГК жінок віком 25–39 років, які проходили курс лікування безпліддя методом IVF. Для кріоконсервування суспензії КГК використовували 1,5 М розчин 1,2-ПД. Зразки охолоджували зі швидкістю 0,3 град/хв від 25 до –6°C, далі здійснювали ініціацію кристалоутворення, від –6 до –35°C швидкість охолодження складала 1 град/хв; після цього зразки занурювали в рідкий азот і зберігали при –196°C. Після відігрівання КГК зберігали свої основні властивості: здатність до адгезії та проліферації, а також гормонопродукуючу функцію. При культивуванні виявлено затримку розвитку культури КГК на 1–2 доби в порівнянні зі свіжовиділеними клітинами. Через 7 діб після експлантації культури деконсервованих КГК практично не відрізнялись від первинних культур КГК відповідного терміну розвитку *in vitro*. Змінився рівень гормонопродукції КГК після кріоконсервування: естрадіолу – знизився на 89,9%, а прогестерону – підвищився на 81,4% відносно показників свіжовиділених суспензій. Отримані результати свідчать про те, що КГК можна отримувати і зберігати в умовах низькотемпературних банків з метою подальшого використання у ДРТ.

Ключові слова: гранульоза, кумулюс, культивування, кріоконсервування.

Реферат: Использование комплекса клеток гранулезы и кумулюса (КГК) может быть перспективным при сокультивировании гамет и эмбрионов в программах вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), что делает актуальным их кріоконсервирование. В работе изучали КГК женщин возрастом 25–39 лет, проходивших курс лечения бесплодия методом IVF. Для кріоконсервирования суспензии КГК использовали раствор 1,5 М 1,2-пропандиола. Образцы охлаждали со скоростью 0,3 град/мин от 25 до –6°C, далее осуществляли инициацию кристаллообразования, от –6 до –35°C скорость охлаждения составляла 1 град/мин, после этого образцы погружали в жидкий азот и хранили при –196°C. После отогрева КГК сохраняли свои основные свойства: способность к адгезии и пролиферации, а также гормонопродуцирующую функцию. При культивировании выявлена задержка развития культуры КГК на 1–2 суток по сравнению со свежeweыделенными клетками. Через 7 суток после эксплантации культуры деконсервированных КГК практически не отличались от первичных культур соответствующего срока развития *in vitro*. Изменился уровень гормонопродукции КГК после кріоконсервирования: эстрадиола – снизился на 89,9%, а прогестерона – повысился на 81,4% относительно показателей свежeweыделенных суспензий. Полученные результаты свидетельствуют о том, что КГК можно получать и хранить в условиях низкотемпературных банков с целью дальнейшего использования в ВРТ.

Ключевые слова: гранулеза, кумулюс, культивирование, кріоконсервирование.

Abstract: Utilization of granulosa and cumulus cell (GCC) complex could be prospective for co-culture of gametes and embryos as a part of assisted reproductive technologies (ART), that makes important their cryopreservation. The study was performed in GCCs of women aged 25–39, who underwent the treatment of infertility by IVF. Cryopreservation of GCC suspension was carried out using 1.5 M 1,2-propane diol solution. The samples were cooled with rate of 0.3 deg/min from 25 down to –6°C, thereafter the ice crystal initiation was done, from –6 down to –35°C the cooling rate was 1 deg/min, after that the samples were plunged into liquid nitrogen and stored then at –196°C. Following thawing the GCCs retained their main features: ability for adhesion and proliferation, and hormone production. During culture of GCCs its development was delayed for 1–2 days if compared with freshly isolated cells. In 7 days after explanting the cultures of frozen-thawed GCCs appeared nearly the same as primary cultures of corresponding terms of *in vitro* culture. The post thaw level of hormone production by GCCs was changed: decreased by 89.9% in case of estradiol, and increased by 81.4% for progesterone if compared with the indices of freshly isolated suspensions. The obtained results testify to a possibility to isolate the GCCs and then to store in low-temperature banks for prospective use in ART.

Key words: granulosa, cumulus, culture, cryopreservation.

Відділ кріобіології системи репродукції, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

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

*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61015;
тел.: (+38 057) 373-31-19, факс: (+38 057) 373-30-84,
електронна пошта: cryo@online.kharkov.ua

*To whom correspondence should be addressed:

23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015;
tel.: +380 57 373 3119, fax: +380 57 373 3084,
e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Надійшла 09.09.2013

Прийнята до друку 05.02.2014

Received September 9, 2013

Accepted February 5, 2014

Культивування ооцитів та ембріонів *in vitro* – суттєва складова технології IVF у лікуванні безпліддя. Практичним досвідом доведено високу ефективність використання клітин гранульози та кумулюса (КГК) у якості систем співкультивування для дозрівання ооцитів та досягнення ембріонами стадії експандованої бластоцисти [9, 16, 21, 23].

Відомо, що клітини гранульози та кумулюса є медіаторами впливу гормонів на мейотичні перетворення хромосом в ооцитах. Так, раніше було визначено, що клітини гранульози беруть участь у проведенні регуляторних сигналів пролактину та соматотропінів у клітини кумулюса, які по-різному відповідають на сигнали цих гормонів [2, 15].

Останнім часом у комплексі лікування безпліддя із застосуванням IVF технологій все частіше використовують кріоконсервовані репродуктивні клітини, що вимагає їх адекватного культивування після розморожування [1, 4, 5]. Було б доцільним збереження КГК для подальшого їх використання при культивуванні деконсервованих ембріонів. Однак, існує лише незначна кількість опублікованих робіт щодо кріоконсервування комплексу КГК [10, 22].

Вище зазначене свідчить про те, що використання комплексу КГК після заморожування може бути перспективним при співкультивуванні гамет та ембріонів у програмах допоміжних репродуктивних технологій.

Ізольовані КГК з преовуляторних фолікулів яєчника людини – відносно новий об'єкт для кріобіологічних досліджень. Раніше вивчали комплекси з клітин стромы яєчників, гранульози і теки, які отримували з фолікулів різної стадії розвитку [17, 19]. Наразі завдяки прогресу в допоміжних репродуктивних технологіях, зокрема IVF, з'явилася можливість отримання окремих КГК у достатньому обсязі для дослідження, кріоконсервування та застосування у програмах штучного запліднення. Однак актуальними залишаються питання щодо збереження морфологічної цілісності цих клітин, можливості їхнього відновлення після заморожування-відігріву, синтезу та секреції статевих гормонів.

Клітини кумулюса є особливою субпопуляцією клітин гранульози, диференціювання якої спрямовується і підтримується ооцитом [2, 20]. У роботі Y. Liu [18] зазначано, що кумулюс, отриманий з ооцитів на стадії гермінативного везикула та метафази I, відрізняється за своїми морфологічними характеристиками від кумулюса зрілих ооцитів та демонструє високий рівень апоптозу. Було показано, що морфологічний стан КГК може корелювати з якістю ооциту та його здат-

Culturing of oocytes and embryos *in vitro* is essential component of IVF technique when treating infertility. High efficiency of using the granulosa and cumulus cells (GCCs) as the system of co-culture to provide maturation of oocytes and development of embryos to expanded blastocyst has been proved practically [5, 14, 20, 23].

It is known that granulosa and cumulus cells are the mediators of hormone effect on meiotic transformations of chromosomes inside oocytes. For instance, it found previously that granulosa cells participated in conducting regulatory signals of prolactin and somatotropins to the cells of cumulus, having the mixed reception of the signals from these hormones [13, 17].

Recently, the complex of infertility treatment in the frames of IVF actively involves the cryopreserved reproductive cells, and therefore an adequate culturing after thawing is necessary [3, 6, 7]. There would be expedient to preserve GCCs for their further application during culturing of frozen-thawed embryos. However, there are only a few published reports concerning cryopreservation of GCCs complex [8, 22].

Above mentioned testifies to the fact that use of complex of GCCs after freezing can be prospective during co-culturing of gametes and embryos in assisted reproductive technologies.

The GCCs isolated from human ovary preovulatory follicles are quite new objects for cryobiological studies. Previous investigations were conducted in cellular complexes of ovarian stroma, granulosa and thecas, which were procured from the follicles of various development stages [15, 18]. Nowadays, due to the progress in assisted reproductive technologies, IVF in particular, the possibility arised to obtain some GCCs in the volume sufficient for experimental studies, cryopreservation and application in the programs of artificial fertilization. However, the tasks of preserving morphological integrity of these cells, their possible restoration after freeze-thawing, synthesis and secretion of sexual hormones have remained actual.

Cumulus cells are a special subpopulation of granulosa cells, differentiation of which is directed and supported by oocyte [17, 19]. Liu [16] demonstrated that cumulus, derived from oocytes at the germinal vesicle stage and metaphase I, differed by its morphofunctional characteristics from the one of mature oocytes, and showed a high level of apoptosis. It has been shown that morphofunctional state of GCCs could correlate with the quality of oocyte and its ability to fertilization, and early apoptosis of GCCs might accompany low quality of embryos *in vitro* [13].

Owing to the complicated obtaining, uniqueness and deficit of ovarian tissue, in particular GCCs, which are derived from a body during laparotomy, laparoscopy,



ністю до запліднення, а ранній апоптоз КГК – з низькою якістю ембріонів *in vitro* [15].

У зв'язку зі складністю отримання, унікальністю і дефіцитністю тканини яєчника, зокрема КГК, які вилучають з організму при лапаротомії, лапароскопії, а також проведенні IVF, консервування цих клітин з метою подальшого їх застосування є важливим завданням кріобіології.

Наразі для кріоконсервування оваріальної тканини використовують переважно два кріопротектори – диметилсульфоксид і 1,2-пропандіол (1,2-ПД). Численні експериментальні дані, отримані D.A. Gook зі співавторами [11–14], показали успішне кріоконсервування фрагментів оваріальної тканини під захистом 1,2-ПД. Але не зрозуміло, чи буде успішним застосування цього протоколу для суспензії ізольованих КГК.

Виходячи з цього, метою роботи була оцінка морфофункціональних властивостей клітин гранульози та кумулюса яєчника людини до та після кріоконсервування під захистом 1,2-ПД.

Матеріали та методи

У роботі ми використовували лише кумулюс, який отримували після денудації ооцитів, що перебували на стадії метафази II мейозу.

Клітини гранульози та кумулюса отримували з яєчників жінок віком 25–39 років, які проходили курс лікування безпліддя методом IVF з їх інформованої письмової згоди. Індукцію суперовуляції проводили за класичним довгим середньолютеїновим протоколом, з використанням агоністів гонадотропін-релізінг гормону «Декапептил» («Ferring», Німеччина) у дозі 3,75 мг та рекомбінантного фолікулостимулюючого гормону «Гонал F» («Serono», Італія). У якості триггеру остаточного дозрівання фолікулів використовували «Овітрел» («Serono») у дозі 250 мкг. Трансвагінальну пункцію фолікулів виконували під контролем ультразвукової скануючої системи «Phillips HD-11» (Німеччина).

Після виділення ооцитів фолікулярну рідину з рештою клітин переносили в конічні пластикові пробірки та залишали за кімнатної температури на годину. Після осадження клітин супернатант видаляли та проводили трикратне відмивання КГК від еритроцитів та інших клітин дебрису шляхом ресуспендування осаду в 1 мл культурального середовища («Fertilization medium «COOK», Австралія). Розміри фрагментів тканини КГК складали (3,2 ± 0,6) мм².

Первинну суспензію КГК отримували шляхом дезагрегації фрагментів тканини КГК у розчині гіалуронідази («Toskani», Іспанія). Суспензія була розподілена на дві групи. Першу групу (контроль

as well as during IVF, the preservation of these cells with the aim of further their use is an important task of cryobiology.

Nowadays, two cryoprotectants are widely used to cryopreserve ovarian tissue: dimethylsulfoxide and 1,2-propane diol (1,2-PD). Numerous experimental data obtained by Gook *et al.* [9–12] have shown a successful cryopreservations of ovarian tissue fragments under protection of 1,2-PD. However, it is unclear if these protocol could be successfully applied to cryopreserve suspension of isolated GCCs.

On that basis, the research aim was to estimate morphofunctional properties of human granulosa cells and ovarian cumulus prior to and after cryopreservation under protection of 1,2-PD.

Materials and methods

The experiments were performed only in the cumulus obtained after denudation of oocytes being at the meiosis metaphase II.

The cells of granulosa and cumulus were obtained from the ovaries of women aged 25–39, treated for infertility by IVF with their informed written consent. Superovulation was induced by means of traditional long-term mean lutein protocol using agonists gonadotropin-releasing hormone Decapeptyl (Ferring, Germany) in a dose of 3.75 mg and recombinant follicle-stimulating hormone Gonal-F (Serono, Italy). As the trigger for complete maturation of follicles we used Ovitrelle (Serono) in a dose of 250 mg. Transvaginal puncture of follicles was performed under the control of ultrasound scanning system Phillips HD-11 (Germany).

After isolation of oocytes the follicular fluid with the rest of cells was transferred to cone-like plastic tubes and was kept at room temperature for one hour. After sedimentation of cells the supernatant was removed and three-fold washing of GCCs to remove erythrocytes and other debris cells was carried-out by re-suspending the sediment in 1 ml culturing medium (Fertilization medium, COOK, Australia). The sizes of GCCs tissue fragments were (3.2 ± 0.6) mm².

Primary suspension of GCCs was obtained by means of disaggregation of GCCs tissue fragments in hyaluronidase solution (Toscani, Spain).

Suspension was divided into two groups. The first group (control) comprised freshly isolated GCCs, the second one were the GCCs cryopreserved under the protection of 1,2-PD. The solution of 1.5 M 1,2-PD was added to GCC suspension slowly during 5 min up to 1:1 ratio, then incubated at 20°C during 20 min. The suspension was thereafter transferred to 5 mm polyethylene straws and frozen with the device Cryo Logic CK 8800i (Australia) using the following protocol: cooling rate of 0.3 deg/min from 25 down to –6°C,



складали свіжовиділені КГК, другу – КГК, які кріоконсервували в розчині 1,2-ПД. Розчин 1,5 М 1,2-ПД додавали до суспензії КГК повільно впродовж 5 хв у співвідношенні 1:1, інкубували за температури 20°C впродовж 20 хв. Далі суспензію переносили в поліетиленові соломини діаметром 5 мм та заморожували в пристрої «Cryo Logic CL 8800i» (Австралія), використовуючи наступну програму: швидкість охолодження 0,3 град/хв від 25 до –6°C, ініціація кристалоутворення впродовж 5 с, від –6 до –35°C охолодження зі швидкістю 1 град/хв; далі зразки занурювали в рідкий азот і зберігали за –196°C. Соломинки відігрівали на водяній бані за 37°C.

Для оцінки морфофункціонального стану свіжовиділеної і кріоконсервованої суспензії КГК її переносили в 0,8 мл культурального середовища і культивували під мінеральним маслом у 4-луночному планшеті («Nunc», Німеччина), не змінюючи середовище протягом 14 діб у CO₂-інкубаторі («Sanyo», Японія) при 6% CO₂, 37°C та вологості 95%. Кожен 24 години оцінювали морфологічний стан КГК, використовуючи мікроскоп «Olympus IX-71» (Японія).

Функціональні показники клітин, а саме рівень секреції естрадіолу та прогестерону до середовища культивування, оцінювали за допомогою імуноферментного аналізу, застосовуючи набори «Estradiol Elisa kit» і «Progesterone Elisa kit» («DRG», США).

Для встановлення наявності ліпідних крапель, що можуть бути опосередкованим показником можливості стероїдогенезу, використовували флуоресцентний барвник нільський червоний (НЧ). Флуоресценцію клітин реєстрували на 7-у добу культивування КГК за допомогою конфокального лазерного скануючого мікроскопа «LSM 510 META» («Carl Zeiss», Німеччина). Флуоресценцію збуджували гелій-неоновим лазером із довжиною хвилі 543 нм, емісію реєстрували в червоному діапазоні з максимумом 631 нм.

Отримані числові результати обробляли статистично за допомогою комп'ютерних програм «Microsoft Excel» та «Origin 6.1». Дані представлені в вигляді середнє ± помилка середнього. Вірогідність розбіжностей оцінювали з використанням критерія Стьюдента-Фішера.

Результати та обговорення

Після виділення та ферментативної дезагрегації фрагментів КГК первинна суспензія отриманих клітин являла собою суміш ізольованих клітин неоднакової величини з переважно округлою формою та клітинних агрегатів, які мали різний розмір. У складі такої гетерогенної суспензії спостерігались поодинокі еритроцити (рис. 1, А). Слід

induced ice crystal initiation for 5 seconds, from –6 down to –35°C cooling with the rate of 1 deg/min, then the samples were plunged into liquid nitrogen and stored at –196°C. The straws were warmed in water bath at 37°C.

To assess morphofunctional state of freshly isolated and cryopreserved suspension the GCCs were transferred into 0.8 ml of culturing medium and cultured under mineral oil in 4-well plate (Nunc, Germany) without changing the medium during 14 days in CO₂ incubator (Sanyo, Japan) at 6% CO₂, 37°C and 95% humidity. Each 24 hrs the morphological state of GCCs was estimated using microscope Olympus IX-71 (Japan).

Functional parameters of cells, *viz.* the estradiol and progesterone secretion to culture medium, were assessed with immune enzyme analysis using Estradiol Elisa Kit and Progesterone Elisa Kit (DRG, USA).

To determine the presence of lipid drops, which could be an indirect index of possible steroidogenesis, the GCCs were stained with Nile red (NR). Fluorescence of the cells was performed to the 7th culturing day by means of confocal laser scanning microscope LSM 510 META (Carl Zeiss, Germany). The fluorescence was excited by He-Ne laser with 543 nm wavelength, emission was recorded in red band with maximum at 631 nm.

The numerical data were processed using the computer software Microsoft Excel and Origin 6.1. The data are presented as mean ± error of the mean. Significance of the differences was estimated using Student-Fisher criterion.

Results and discussion

After isolation and enzymatic disaggregation of GCCs fragments the primary suspension of the obtained cells represented the mixture of isolated cells of various size with predominantly round shape and cell aggregates with various dimensions. Only single erythrocytes were found in this heterogeneous suspension (Fig. 1A). It should be noted that together with the cells with distinctly contoured membrane, nucleus and light, somewhere granular cytoplasm the aggregates comprised dark coloured dead cells with impaired membrane and cell detritus.

Explantation of such primary suspension of GCCs in described conditions resulted in sedimentation of cell elements and aggregates to the bottom of cultural plate and adherence to it. During first day of culturing the majority of elements of primary suspension adhered to the bottom of cultural plate (82.0 ± 0.7%). Herewith cell aggregates looked like round formations consisted of dark granulated cells. The part of cells preserved a rounded shape the rest demonstrated initial signs of flattening on a substrate (Fig. 1B).



зауважити, що до складу агрегатів, крім клітин з чітко контурованою мембраною, ядром та світлою, подекуди зернистою цитоплазмою, входили загиблі клітини темного кольору з порушеною мембраною та клітинний детрит.

Експлантація такої первинної суспензії КГК за умов культивування приводила до осідання клітинних елементів та агрегатів на дно культурального плейту і прикріплення до нього. Протягом першої доби культивування більшість елементів первинної суспензії адгезували до дна культуральної чашки ($(82,0 \pm 0,7)\%$). Клітинні агрегати при цьому мали вигляд округлих утворень, які склалися з темних гранульованих клітин. Частина клітин зберігали округлу форму, решта демонстрували початкові ознаки розпластування на субстраті (рис. 1, В).

При подальшому культивуванні первинної культури КГК відбувалися розпластування поодиноких клітин, які були прикріплені до субстрату, а також міграція клітин із агрегатів та їх розпластування навколо агрегату (рис. 1, С).

Подальше культивування призвело до розвитку культури КГК. На 7-му добу культивування відбувалося збільшення грануляції клітин, які складали агрегати. Центр агрегату у більшості випадків був багат шаровий і утворений з клітинних елементів з мембраною, яка не мала чіткого контура. На периферії агрегатів розташовувалися розпластані переважно епітеліоподібні клітини, які мігрували по поверхні субстрату і формували зону росту (рис. 1, D).

У деяких випадках, особливо коли агрегат складався з невеликої кількості клітин, відбувалось практично повне його розпластування на поверхні дна культурального плейту з формуванням моношарового осередка гранульованих клітин.

Після 7-ї доби культивування КГК у культурі спостерігалось поступове її старіння, ознаками якого були компактизація клітинного матеріалу з утворенням цитосфер та їх відкріплення від дна культурального плейту.

Життєздатність деконсервованих КГК, яку оцінювали шляхом забарвлення клітин трипановим синім одразу після відігрівання, складала ($72 \pm 4,5\%$).

Після розморожування суспензії КГК її вигляд та склад відрізнялися від первинної суспензії,

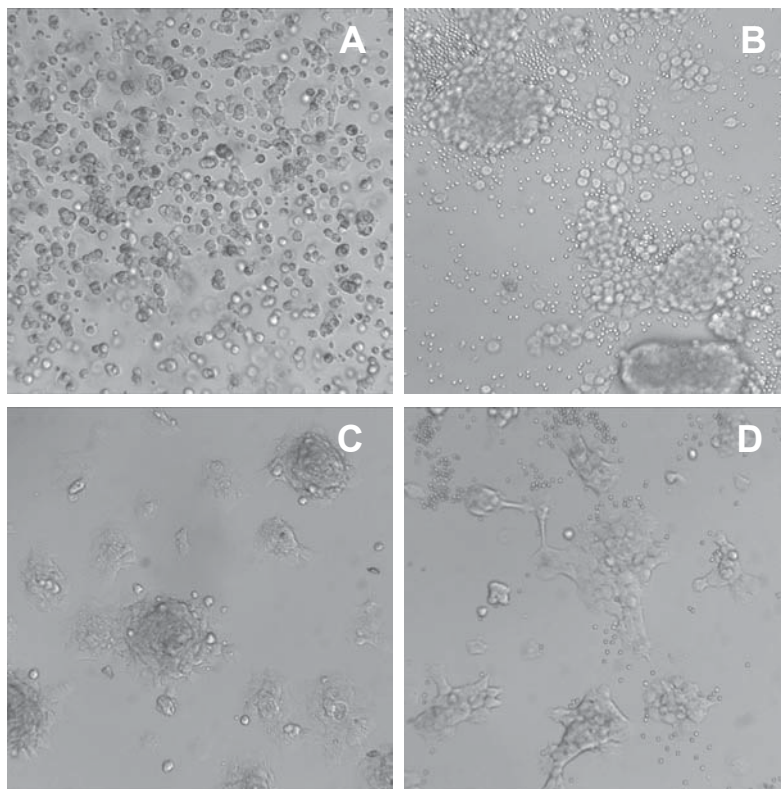


Рис. 1. Свіжовиділена первинна суспензія КГК (А). Первинна культура КГК через 1 (В), 3 (С) та 7 (D) діб. Прижиттєве спостереження; А – $\times 200$; В, С, D – $\times 400$.

Fig. 1. Primary suspension of GCCs (A). Primary culture of GCCs following 1st (B), 3rd (C) and 7th (D) day. Supravital observation; A – $\times 200$; B, C, D – $\times 400$.

Further culturing of primary culture of GCCs was accompanied with the flattening of several cells, adhered to substrate as well as migration of cells from aggregates and their flattening around an aggregate (Fig. 1C).

Following culturing resulted in the development of GCCs culture. To the 7th culturing day the granulation of cells inside the aggregates enhanced. Centre of aggregates was as a rule multilayered and formed of cells with non-distinct contoured membrane. Periphery of aggregates was occupied mainly by flattened epithelioid cells, which migrated on a surface of substrate and formed a growth zone (Fig. 1D).

In some cases, especially when an aggregate comprised a small number of cells, these flattened nearly completely on a bottom surface of cultural plate, forming the monolayer areas of granulated cells.

After the 7th day of GCCs culturing, their culture demonstrated gradual ageing, which signs were compactization of cells in terms of cytospheres formation and their detachment from the bottom of cultural plate.

Viability of GCCs estimated immediately post thaw by staining of the cells with trypan blue made ($72 \pm 4.5\%$).

збільшувалася кількість зруйнованих клітин і спостерігався клітинний детрит (рис. 2, А).

Перебування клітин в умовах культивування призводило до седиментації та прикріплення клітинних елементів КГК до субстрату (рис. 2, В).

Протягом 2–3 діб культивування після експлантації суспензії більшість клітин та агрегатів адгезувала до субстрату, і на периферії агрегатів з'являлися поодинокі клітини, які виселились і розпласталися на поверхні культурального пластику (рис. 2, С). Ці процеси протікали повільніше, ніж у первинних культурах КГК, що дає підстави для припущень щодо наявності фази затримання розвитку кріоконсервованих КГК *in vitro*, під час якої у клітинах можливо відбувається репарація нелетальних ушкоджень.

З часом процеси міграції та розпластування кріоконсервованих КГК підсилювались, і через 7 діб після експлантації культури деконсервованих КГК практично не відрізнялись від первинних культур КГК відповідного терміну перебування *in vitro*. При культивуванні протягом наступних 7 діб спостерігалось поступове старіння деконсервованих КГК, подібне до відповідних змін у первинній культурі у той же термін, яке виражалося переважно у відкріпленні клітинних елементів.

Таким чином, протягом перших 7 діб культивування свіжовиділені та кріоконсервовані КГК демонстрували здатність до адгезії, розпластування і міграції з виявленням певного цитотипу (клітини округлої форми з великим ядром та зернистою цитоплазмою). Затримка у розвитку культури деконсервованих клітин на 1–4-у добу експерименту може свідчити про виникнення нелетальних ушкоджень у клітинах в процесі кріоконсервування, зокрема в їх мембранах: зміни фазового стану ліпідів клітинних мембран, порушення активності мембранозв'язаних ферментів тощо. При подальшому перебуванні клітин у культурі ці порушення зникають, про що свідчать спостереження за культурою КГК на 7-у добу культивування.

У повній мірі функціональний стан, специфічний для КГК, може бути оцінений лише за здатністю до гормоногенезу. Аналіз гормонопродукуючої функції свіжовиділених та кріоконсервованих клітин КГК на 1-у, 3-ю, 7-у доби культивування показав,

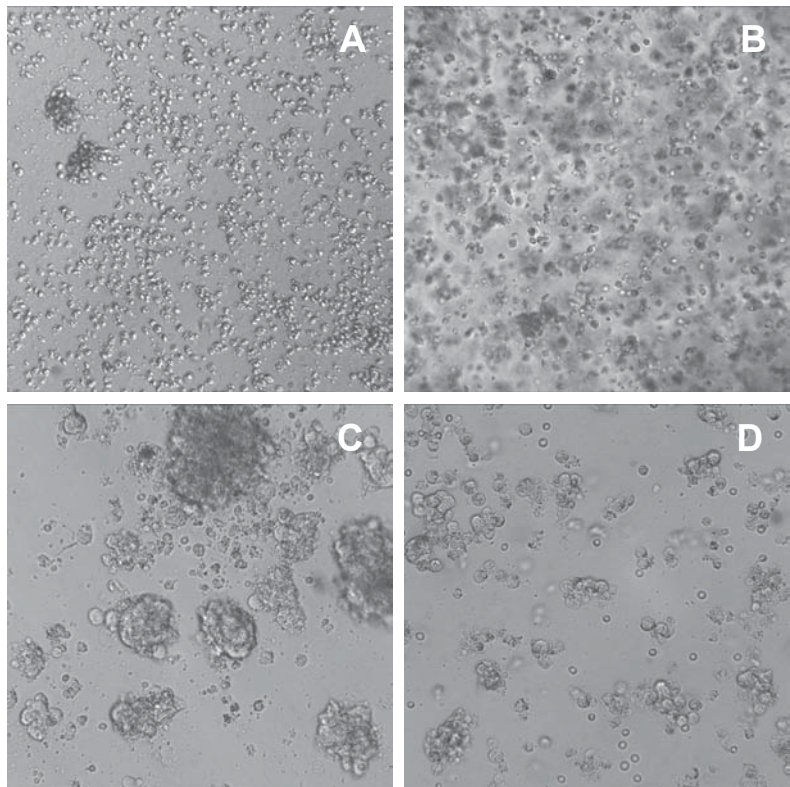


Рис. 2. Деконсервована суспензія КГК (А); $\times 200$. Культура деконсервованих КГК через 1 (В), 3 (С) та 7 (D) діб; $\times 400$. Прижиттєве спостереження; А, В – $\times 200$; С, D – $\times 400$.

Fig. 2. Frozen-thawed GCCs one hour post thaw (A). Culture of frozen-thawed GCCs following 1st (B), 3rd (C) and 7th (D) day. Supravital observation; A, B – $\times 200$; C, D – $\times 400$.

Appearance and composition of thawed GCC suspension changed as compared to primary suspension, the number of destroyed cells increased and cell detritus was found (Fig. 2A).

Staying of the cells under culture conditions led to sedimentation and adherence of cell elements of GCCs to a substrate (Fig. 2B).

During 2–3 days after start of explantation the majority of cells and aggregates of the suspension adhered to the substrate and single cells appeared in the periphery of aggregates which migrated and flattened thereafter on a cultural plastics surface (Fig. 2C). These processes proceeded more slowly than those in primary cultures of GCCs, this enabled to suppose the presence of delayed *in vitro* development phase in cryopreserved GCCs, which was necessary for reparation of non-lethal impairments.

Over time the migration and flattening of cryopreserved GCCs strengthened and 7 days later the initiated explantation the frozen-thawed GCCs culture had almost no differences from primary cultures of GCCs of the same *in vitro* culture terms. Following 7 days of culture were accompanied with gradual ageing of frozen-thawed GCCs, similar to corresponding



Вміст гормонів у середовищі культивування свіжовиділених та кріоконсервованих КГК
Content of hormones in culturing medium of freshly isolated and cryopreserved GCCs

Термін культивування, доба Cuture term, days	Естрадіол, пг/мл Estradiol, pg/ml		Прогестерон, нмоль/л Progesterone, nmol/l	
	Первинна культура Primary culture	Культура деконсервованих КГК Culture of frozen-thawed GCCs	Первинна культура Primary culture	Культура деконсервованих КГК Culture of frozen-thawed GCCs
1	22730 ± 58,1	377 ± 22,3*	8,0 ± 2,8	55,2 ± 2,4*
3	50390 ± 165,9	7140 ± 71,9*	70,1 ± 5,6	100,0 ± 8,1*
7	22280 ± 706,5	3190 ± 161,3*	10,2 ± 0,09	90,1 ± 7,8*

Примітка: * – значущі відмінності в порівнянні з первинною культурою на відповідних строках культивування, $p \leq 0,05$.

Note: * – the differences are statistically significant if compared with primary culture of corresponding culture terms, $p \leq 0,05$.

що рівень секреції прогестерону деконсервованими КГК був статистично значуще вищим, ніж у свіжовиділених клітин, а естрадіолу – статистично знижувався (таблиця). Як видно, співвідношення продукції естрадіолу і прогестерону КГК зберігається, але змінюються показники кількості продукції цих гормонів клітинами. Так, рівень секреції естрадіолу після кріоконсервування знизився на 89,9% відносно цих показників до кріоконсервування. У той самий час рівень секреції прогестерону деконсервованими КГК підвищився на 81,4% відносно показників первинної культури.

Можна припустити, що нелетальні ушкодження плазматичної мембрани КГК, які виникають під час кріоконсервування, можуть змінювати проникність мембран до гормонів та в цілому впливати на стероїдогенез, але механізм цього явища потребує окремих досліджень і подальшого з'ясування.

Відомо, що цитоплазма КГК у нормі містить значну кількість ліпідних гранул, які депонують холестерин, що є субстратом для синтезу стероїдних гормонів. Їх наявність в КГК можливо встановити за допомогою флуоресцентного барвника НЧ.

Як видно, на 7-у добу культивування інтенсивність світіння в окремих клітинах первинної культури може бути різною, що, ймовірно, залежить від кількості та розташування ліпідних крапель (рис. 3, А).

Після кріоконсервування близько ($70,0 \pm 7,1$)% КГК мали яскраву флуоресценцію (рис. 3, В). Інтенсивність світіння кріоконсервованих КГК була на рівні свіжовиділених зразків. Наявність ліпідних включень у КГК після кріоконсервування може опосередковано свідчити про наявність депо холестеролу, який є необхідною складовою продукції стероїдних гормонів.

Відомо, що навіть за оптимальних умов кріоконсервування в збережених клітинах виявляються

changes in primary culture at the same term, and which was mainly manifested in detachment of cell elements.

Thus, during first 7 days of culture the freshly isolated and cryopreserved GCCs demonstrated the ability to adhere, flatten and migrate with the appearance of certain phenotype (cells of roundish shape with large nucleus and granular cytoplasm). Delay in culture development of the frozen-thawed cells from 1st through 4th experimental days could testify to the appearance of non-lethal impairments of cells resulted from the cryopreservation, in particular of their membranes, *e. g.* to the change in phase state of cell membrane lipids, disordered activity of membrane-bound enzymes *etc.* During further staying of cells in the culture conditions these impairments disappeared, which was confirmed with observation of the GCCs culture to the 7th culture day.

The functional state specific for GCCs could be properly estimated only considering hormonopoiesis. Analysis of hormone producing function of freshly isolated and cryopreserved GCCs to the 1st, 3rd, 7th culture days has shown that the secretion level of progesterone by frozen-thawed GCCs was significantly higher than in freshly isolated cells and estradiol one was significantly reduced (Table). It could be seen, that ratio between the values of estradiol and progesterone production by GCCs was kept, but the absolute indices of hormone production by the cells altered. For instance, the secretion rate of estradiol following cryopreservation reduced by 89.9% in respect of these indices prior to cryopreservation. At the same time, the secretion level of progesterone in thawed GCCs increased by 81.4% *vs.* indices observed in the primary culture.

It could be assumed that non-lethal impairments of GCCs plasma membrane appearing during cryopreservation could change the permeability to hormones and generally affect steroidogenesis but the mecha-

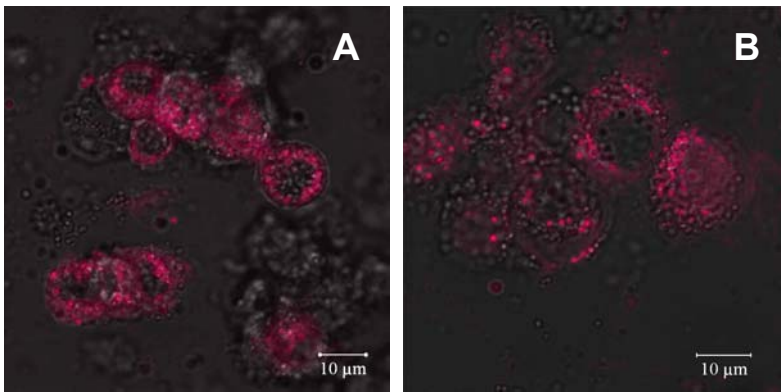


Рис.3. Флуоресценція в КГК на 7-у добу культивування: **A** – у первинній культурі; **B** – у культурі деконсервованих КГК. Конфокальна мікроскопія; забарвлення НЧ; суміщення зображень флуоресценції та в прохідному світлі.

Fig. 3. GCCs fluorescence to the 7th culturing day: **A** – prior to cryopreservation, **B** – after cryopreservation. Confocal microscopy; staining with Nile red; merged images of fluorescence and transmitted light.

нелетальні ушкодження, які істотно знижують біологічні властивості клітинних культур [3]. Але ці пошкодження можуть бути усунені за певних умов культивування, тобто коли клітини здатні відновити свої морфофункціональні властивості.

Дотепер у сучасній літературі замало даних щодо впливу факторів кріоконсервування на морфофункціональні характеристики окремих КГК і вони мають розрізнений характер, але існує чимало повідомлень стосовно кріоконсервування фрагментів тканини яєчників.

Так, було встановлено факт збільшення проліферативних властивостей та життєздатності фрагментів тканини яєчників людини після кріоконсервування [8]. В іншому дослідженні піддавали повільному заморожуванню фрагменти яєчників кози в розчинах, які містять різні внутрішньоклітинні кріопротектори, а саме етиленгліколь, пропандіол або диметилсульфоксид [23]. Ультраструктурний аналіз виявив морфологічно нормальні преантральні фолікули в контролі та культивованих фрагментах до і після кріоконсервування та короткострокового культивування [7].

Раніше було продемонстровано зменшення щільності міжклітинних контактів після кріоконсервування ізольованих КГК [6]. У той самий час існують дані щодо впливу розчинів кріопротекторів на ушкодження ДНК [17]. Цікаво, що після еквілібрації КГК із розчинами етиленгліколю (40%) та гліцеролу (28%) кількість ушкоджень ДНК була нижчою, ніж у свіжовиділених клітинах. Тобто після еквілібрації з кріопротекторами та після подальшого кріоконсервування авторами було відмічено високу життєздатність клітин.

У даній роботі ми вивчали морфофункціональні властивості КГК не у складі фрагментів яєчника,

mechanisms of such phenomena require separate studies and further elucidation.

It is known that cytoplasm of GCCs normally contains a significant amount of lipid granules which depot cholesterol, which is a substrate to synthesize steroid hormones. Their presence could be visualised using fluorescent dye Nile red.

It is seen, that to the 7th culture day the fluorescence intensity in individual cells could be different, depending likely on number and location of lipid drops.

After cryopreservation about (70 ± 7.1)% GCCs had bright fluorescence (Fig. 3B). The fluorescence intensity of cryopreserved GCCs was at the level of freshly isolated samples. The cells were of round shape with mani-

festated granular cytoplasm. The presence of lipid inclusions in GCCs after cryopreservation could indirectly testify to a possible presence of cholesterol depot being an essential component to produce steroid hormones.

It is known that even optimal cryopreservation conditions could lead to appearance of non-lethal injuries in the survived cells, which considerably reduce the biological properties of cell cultures [21]. However, these damages could be eliminated under certain culture conditions, allowing the cells to recover their morpho-functional features.

To date there are not enough reported data about the effect of cryopreservation factors on morpho-functional characteristics of isolated GCCs and these are of odd character, however, the cryopreservation of ovarian tissue fragments is described widely.

For instance, the fact of increasing proliferative properties and viability of fragments of human ovarian tissue fragments after cryopreservation has been found [4]. In other study, goat ovarian fragments were slowly frozen in the solutions containing different intracellular cryoprotectants, namely ethylene glycol, propane diol and dimethyl sulfoxide [23]. Ultrastructural analysis revealed morphologically normal preantral follicles in the control and cultured fragments prior to and after cryopreservation and short-term culturing [2].

Reduced tightness of intercellular contacts in GCCs was demonstrated after cryopreservation of some GCCs there [1]. At the same time there are data as for the effect of cryoprotective solutions on DNA damage [15]. Of interest is the fact that after equilibration of GCCs with the solutions of ethylene glycol (40%) and glycerol (28%) the number of DNA damages was lower than in freshly isolated cells. Moreover, after equilibration with cryoprotectants and



а власне у суспензії цих клітин. Було встановлено, що при культивуванні свіжовиділених клітин адгезію і міграцію відмічали на 2-у добу. В той самий час після кріоконсервування під захистом 1,2-ПД морфофункціональну активність клітин спостерігали протягом 3- та 4-ї доби. На 7-у добу культивування КГК після кріоконсервування відзначали множинну міграцію клітинних елементів у моношарі. При подальшому культивуванні кріоконсервованих КГК до 14-ї доби більшість клітин і агрегатів відкріплювалася від дна чашки, що було ознакою старіння культури.

Одержані результати свідчать про те, що КГК можна отримувати і зберігати в умовах низькотемпературних банків з метою подальшого використання для співкультивування гамет та ембріонів *in vitro* у допоміжних репродуктивних технологіях.

Висновки

Низькотемпературне консервування КГК під захистом розчину 1,5 М 1,2-ПД з використанням повільного заморожування дозволяє зберегти морфологічну цілісність та функціональну активність клітин, ознакою чого є здатність їх до адгезії, розпластування, міграції та проліферації в умовах культивування, а також продукції стероїдних гормонів.

Література

1. Грищенко В.И., Парашук Ю.С., Дахно Ф.В., Юрченко Г.Г. Кробиология и проблемы бесплодия. – К.: Наук. думка, 1990. – 135 с.
2. Лебедева И.Ю., Кибардина Т.В., Кузьмина Т.И. Участие клеток гранулезы в опосредовании действия пролактина и соматотропина на ооцит-кумуляные комплексы коров *in vitro* // Цитология. – 2005. – Т. 47, №10 – С. 882–888.
3. Петренко А.Ю. Изучение репарации мембран митохондрий после замораживания-отогрева // Кробиология. – 1987. – №2. – С. 24–29.
4. Фуллер Б., Грин К., Грищенко В.И. Кробиоконсервирование для создания банка клеток: современные концепции на рубеже XXI столетия // Проблемы кробиологии. – 2003. – №2. – С. 62–83.
5. Чуб Н.Н., Лобынцева Г.С., Демина Л.Г. Влияние криопротекторов на морфологическую целостность и функциональную полноценность овариальной ткани человека // Кробиоконсервирование клеток и тканей: Сб. науч. тр. – Харьков, 1989. – С. 118.
6. Alisch A., Ruping K., Koster F. et al. Cumulus cell apoptosis as a predictor for oocyte quality in artificial reproduction technique // Zentralbl. Gynakol. – 2003. – Vol. 125, №11. – P. 452–457.
7. Castro S.V., de Carvalho A.A., da Silva C.M. et al. Freezing solution containing dimethylsulfoxide and fetal calf serum maintains survival and ultrastructure of goat preantral follicles after cryopreservation and *in vitro* culture of ovarian tissue // Cell Tissue Res. – 2011. – Vol. 346, №2. – P. 283–292.
8. Isachenko V., Isachenko E., Mallmann P., Rahimi G. Increasing follicular and stromal cell proliferation in cryopreserved human ovarian tissue after long-term precooling prior to freezing: in

after further cryopreservation the authors have noted a high cell viability.

In the present study we assessed morphofunctional properties of GCCs, which were not the part of ovarian fragments, but represented the suspension of isolated cells. It has been established that during culture of freshly isolated cells their adhesion and migration were found to the 2nd day. At the same time after cryopreservation under 1,2-PD protection the morphofunctional activity of cells was observed during the 3rd and 4th days. To the 7th day of GCCs culture post thaw, numerous cells migrated to monolayer. Following culturing of cryopreserved GCCs till the 14th day was accompanied by detachment of most cells and aggregates from the plate bottom which was the sign of culture ageing.

The findings testify to the fact that GCCs could be obtained and preserved under low temperature bank conditions with the aim of their further application for *in vitro* co-culture of gametes and embryos as a part of assisted reproductive technologies.

Conclusions

Low temperature preservation of GCCs under protection of 1.5 M 1,2-PD solution using slow freezing enabled the preservation of morphological integrity and functional activity of cells, the features of that were the ability of their adhesion, flattening, migration and proliferation under culturing conditions, as well as producing of steroid hormones.

References

1. Alisch A., Ruping K., Koster F. et al. Cumulus cell apoptosis as a predictor for oocyte quality in artificial reproduction technique. Zentralbl Gynakol 2003; 125(11): 452–457.
2. Castro S.V., de Carvalho A.A., da Silva C.M., et al. Freezing solution containing dimethylsulfoxide and fetal calf serum maintains survival and ultrastructure of goat preantral follicles after cryopreservation and *in vitro* culture of ovarian tissue. Cell Tissue Res 2011; 346(2): 283–292.
3. Chub N.N., Lobyntseva G.S., Demina L.G. Effect of cryoprotectants on morphological and functional integrity of human ovarian tissue. In: Cryopreservation of cells and tissues. Kharkov, 1989: p. 118.
4. Isachenko V., Isachenko E., Mallmann P., Rahimi G. Increasing follicular and stromal cell proliferation in cryopreserved human ovarian tissue after long-term precooling prior to freezing: *in vitro* versus chorioallantoic membrane (CAM) xenotransplantation. Cell Transplant 2013; 22(11): 2053–2061.
5. Freeman M., Whitworth C., Hill G. Granulosa cell co-culture enhances human embryo development and pregnancy rate following *in vitro* fertilization. Hum Reprod 1995; 10(2): 408–414.
6. Fuller B., Green C., Grisichenko V.I. Cryopreservation for cell banking: current concepts at the turn of 21st century. Problems of Cryobiology 2003; (2): 62–83.
7. Grisichenko V.I., Paraschuk Yu.S., Dakhno F.V., Yurchenko G.G. Cryobiology and infertility problems. Kiev: Naukova Dumka; 1990.



- vitro versus chorioallantoic membrane (CAM) xenotransplantation // *Cell Transplant.* – 2013. – Vol. 22, №11. – P. 2053–2061.
9. Freeman M., Whitworth C., Hill G. Granulosa cell co-culture enhances human embryo development and pregnancy rate following in vitro fertilization // *Hum. Reprod.* – 1995. – Vol. 10, №2. – P. 408–414.
 10. Gunasena K., Villines P., Critser J. Live births after autologous transplantation of cryopreserved mouse ovaries // *Hum. Reprod.* – 1997. – Vol. 12, №1. – P. 101–106.
 11. Gook D.A., Osborn S.M., Bourne H., Johnston W.I. Fertilization of human oocytes following cryopreservation; normal karyotypes and absence of stray chromosomes // *Hum. Reprod.* – 1994. – Vol. 9, №4. – P. 684–691.
 12. Gook D.A., Osborn S.M., Johnston W.I. Cryopreservation of mouse and human oocytes using 1,2-propanediol and the configuration of the meiotic spindle // *Hum. Reprod.* – 1993. – Vol. 8, №7 – P. 1101–1109.
 13. Gook D.A., Osborn S.M., Johnston W.I. Parthenogenetic activation of human oocytes following cryopreservation using 1,2-propanediol // *Hum. Reprod.* – 1995. – Vol. 10, №3. – P. 654–658.
 14. Gook D.A., Schiewe M.C., Osborn S.M. et al. Intracytoplasmic sperm injection and embryo development of human oocytes cryopreserved using 1,2-propanediol // *Hum. Reprod.* – 1995. – Vol. 10, №10. – P. 2637–2641.
 15. Host E., Mikkelsen A.L., Lindenberg S., Smidt-Jensen S. Apoptosis in human cumulus cells in relation to maturation stage and cleavage of the corresponding oocyte // *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* – 2000. – Vol. 79, №11. – P. 936–940.
 16. Johnson J., Higdon H., Boone W. Effect of human granulosa cell co-culture using standard culture media on the maturation and fertilization potential of immature human oocytes // *Fertil. Steril.* – 2008. – Vol. 90, №5. – P. 1674–1679.
 17. Lindley E., Jacobson J., Corselli J. Cryopreservation of human cumulus cells for co-cultures and assessment of DNA damage after thawing using the comet assay II // *J. Assist. Reprod. Genet.* – 2001. – Vol. 18, №10. – P. 534–538.
 18. Liu Y., Holyoak G., Wang S., Bunch T. The importance of cumulus cells on the in vitro production of bovine oocytes // *Theriogenology.* – 1995. – Vol. 43, №1. – P. 267.
 19. McNatty K.P., Baird D.T., Bolton A. et al. Concentration of estrogens and androgens in human ovarian venous plasma and follicular fluid throughout the menstrual cycle // *J. Endocrinol.* – 1976. – Vol. 71(2). – P. 77–85.
 20. Muiheron G., Bossert N., Lapp J. et al. Human granulosa-luteal and cumulus cells express transforming growth factors-beta type 1 and type 2 mRNA // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 1992. – Vol. 74, №2. – P. 32–40.
 21. Parikh F., Nadkarni S., Naik N. et al. Cumulus coculture and cumulus-aided embryo transfer increases pregnancy rates in patients undergoing in vitro fertilization // *Fertil. Steril.* – 2006. – Vol. 86, №4. – P. 839–847.
 22. Ruppert-Lingham C.J., Paynter S.J., Godfrey J. et al. Developmental potential of murine germinal vesicle stage cumulus-oocyte complexes following exposure to dimethylsulphoxide or cryo-preservation: loss of membrane integrity of cumulus cells after thawing // *Hum. Reprod.* – 2003. – Vol. 18, №2. – P. 392–398.
 23. Zhang A., Xu B., Sun Y. et al. The effect of human cumulus cells on the maturation and developmental potential of immature oocytes in ICSI cycles // *J. Assist. Reprod. Genet.* – 2012. – Vol. 29, №4. – P. 313–319.
 8. Gunasena K., Villines P., Critser J. Live births after autologous transplantation of cryopreserved mouse ovaries. *Hum Reprod* 1997; 12(1): 101–106.
 9. Gook D.A., Osborn S.M., Bourne H., Johnston W.I. Fertilization of human oocytes following cryopreservation; normal karyotypes and absence of stray chromosomes. *Hum Reprod* 1994; 9(4): 684–691.
 10. Gook D.A., Osborn S.M., Johnston W.I. Cryopreservation of mouse and human oocytes using 1,2-propanediol and the configuration of the meiotic spindle. *Hum Reprod* 1993; 8(7): 1101–1109.
 11. Gook D.A., Osborn S.M., Johnston W.I. Parthenogenetic activation of human oocytes following cryopreservation using 1,2-propanediol. *Hum Reprod* 1995; 10(3): 654–658.
 12. Gook D.A., Schiewe M.C., Osborn S.M. et al. Intracytoplasmic sperm injection and embryo development of human oocytes cryopreserved using 1,2-propanediol. *Hum Reprod* 1995; 10(10): 2637–2641.
 13. Host E., Mikkelsen A.L., Lindenberg S., Smidt-Jensen S. Apoptosis in human cumulus cells in relation to maturation stage and cleavage of the corresponding oocyte. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2000; 79(11): 936–940.
 14. Johnson J., Higdon H., Boone W. Effect of human granulosa cell co-culture using standard culture media on the maturation and fertilization potential of immature human oocytes. *Fertil Steril* 2008; 90(5): 1674–1679.
 15. Lindley E., Jacobson J., Corselli J. Cryopreservation of human cumulus cells for co-cultures and assessment of DNA damage after thawing using the comet assay II. *J Assist Reprod Genet* 2001; 18(10): 534–538.
 16. Liu Y., Holyoak G., Wang S., Bunch T. The importance of cumulus cells on the in vitro production of bovine oocytes. *Theriogenology* 1995; 43(1): 267.
 17. Lebedeva I. Yu., Kibardina T.V., Kuzmina T.I. Participation of granulosa cells in mediating effect of prolactin and somatotropin on bovine oocyte-cumulus complexes in vitro. *Tsytologiya* 2005; 47(10): 882–888.
 18. McNatty K.P., Baird D.T., Bolton A. et al. Concentration of estrogens and androgens in human ovarian venous plasma and follicular fluid throughout the menstrual cycle. *J Endocrinol* 1976; 71(2): 77–85.
 19. Muiheron G., Bossert N., Lapp J. et al. Human granulosa-luteal and cumulus cells express transforming growth factors-beta type 1 and type 2 mRNA. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 74(2): 32–40.
 20. Parikh F., Nadkarni S., Naik N. et al. Cumulus coculture and cumulus-aided embryo transfer increases pregnancy rates in patients undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2006; 86(4): 839–847.
 21. Petrenko A.Y. Study of mitochondria membrane repair after freeze-thawing. *Kriobiologiya* 1987; (2): 24–29.
 22. Ruppert-Lingham C.J., Paynter S.J., Godfrey J. et al. Developmental potential of murine germinal vesicle stage cumulus-oocyte complexes following exposure to dimethylsulphoxide or cryo-preservation: loss of membrane integrity of cumulus cells after thawing. *Hum Reprod* 2003; 18(2): 392–398.
 23. Zhang A., Xu B., Sun Y. et al. The effect of human cumulus cells on the maturation and developmental potential of immature oocytes in ICSI cycles. *J Assist Reprod Genet* 2012; 29(4): 313–319.

