

Морфологические и биохимические характеристики овариальной ткани при разных режимах криоконсервирования

И.А. Трутаева, В.В. Киروشка, Т.М. Гурина, Т.П. Бондаренко

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Morphological and Biochemical Features of Ovarian Tissue at Various Cryopreservation Modes

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

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

В настоящее время трансплантация криоконсервированной овариальной ткани является одной из наиболее перспективных технологий восстановления репродуктивной и эндокринной функции у женщин при патологиях яичников различного генеза. Эффективность данной технологии остается низкой, что связано с повреждением структуры ткани в процессе замораживания-оттаивания, поэтому оптимизация протоколов криоконсервирования является актуальной задачей.

Цель работы – исследование морфологической структуры овариальной ткани и интенсивности перекисного окисления липидов (ПОЛ) при разных режимах криоконсервирования.

Объектом исследования служили фрагменты овариальной ткани крыс. В качестве криопротектора (КП) использовали 1,2-пропандиол (1,2-ПД) и диметилсульфоксид (ДМСО) в концентрациях 1,5 и 3 М в среде DMEM, дополненной 200 мМ сахарозы. Инкубацию ткани в растворе КП проводили при 22°C в течение 30 мин. Замораживание ткани яичника осуществлялось следующим образом: режим 1 – от 22 до –40°C со скоростью 1 град/мин с последующим погружением в жидкий азот, без использования процесса инициации кристаллообразования (ИК); режим 2 – от 22°C до температуры ИК со скоростью 2 град/мин, затем проводили ИК с последующим охлаждением образцов до –40°C со скоростью 2 град/мин и погружением в жидкий азот. Температура начала ИК зависит от вида КП и его концентрации. Оттаивание осуществляли на водяной бане при 37°C. Удаление КП проводили поэтапно с заменой среды криоконсервирования на среду DMEM + маннит. Морфологические исследования проводили на срезах ткани толщиной 0,5–1 мкм, окрашенных толуидиновым синим. Интенсивность ПОЛ оценивали по концентрации продуктов реакции с тиобарбитуровой кислотой.

Показано, что морфологическая структура овариальной ткани и интенсивность процессов ПОЛ определялись концентрацией и типом используемого КП. Так, при криоконсервировании в 1,5 М растворах КП были отмечены различия сохранности структуры ткани в зависимости от типа КП. Использование 1,2-ПД приводило к дефрагментации ядра, повреждениям ядерной мембраны, выходу белков в перивителлиновое пространство, а применение 1,5 М ДМСО – к сохранности структуры ядра ооцита, целостности *zona pellucida* и контактов между клетками гранулезы и ооцита. Концентрация продуктов ПОЛ при использовании 1,2-ПД была значимо выше, чем после применения ДМСО. Увеличение концентрации КП до 3 М повышало уровень сохранности фолликулов до 80–90%. При этом концентрация продуктов ПОЛ оставалась в пределах нормы. Следует отметить, что уровень морфологической целостности ткани не зависел от программы замораживания для всех КП.

Now the transplantation of cryopreserved ovarian tissue is one of the most promising technologies to recover the reproductive and endocrine functions in women with ovarian pathologies of various origins. The efficiency of this technology has remained low, which is associated with damages of tissue structure occurring during freeze-thawing, so the optimizing the cryopreservation protocols is an urgent task. The research objective was to study the morphological structure of ovarian tissue and intensity of lipid peroxidation (LPO) following cryopreservation according various regimens.

The research objects were the fragments of ovarian tissue. Cryoprotective agents (CPA) were 1,2-propanediol (PROH) and dimethyl sulfoxide (DMSO) in the concentrations of 1.5 and 3 M in DMEM supplemented with 200 mM sucrose. The tissue was incubated in CPA solution at 22°C for 30 min. Ovarian tissue was frozen according the following programs: regimen 1 – from 22 down to –40°C with the rate of 1 deg/min with following plunging into liquid nitrogen without using the process of crystal formation initiation (CFI); regimen 2 – from 22°C down to the temperature of CFI with the rate of 2 deg/min and following plunging into liquid nitrogen. The temperature of CFI depended on CPA type and its concentration. Thawing was performed in a water bath at 37°C. The CPA was removed stepwise replacing the cryopreservation medium to DMEM + mannitol. Morphological studies were performed in tissue sections of 0.5–1 mm thickness, stained with toluidine blue. The intensity of lipid peroxidation was assessed by the concentration of the reaction products with thiobarbituric acid.

It has been shown that the morphological structure of ovarian tissue and intensity of lipid peroxidation processes depended on the concentration and type of the used CPA. Cryopreservation in 1.5 M CPA solutions resulted in different preservation of tissue structure depending on the CPA type. The use of PROH led to the nucleus defragmentation, damage of nuclear membrane, release of proteins into the perivitelline space; the use of 1.5 M DMSO resulted in preservation of the oocyte nucleus structure, integrity of *zona pellucida* and contacts between the oocyte and granulosa cells. The concentration of LPO products after using PROH was significantly higher than in case of DMSO. Higher CPA concentration (3 M) increased the preservation rate of the follicles up to 80–90%. The concentration of LPO products remained within the normal range. It should be noted that the level of morphological tissue integrity is not dependent on the freezing program for all the CPAs.

Thus, the maximum preservation of tissues under the studied conditions was achieved by increasing the concentration of CPA (DMSO or PROH) from 1.5 to 3M.