

УДК 616.651.1.018:547.422

И.А. Трутаева\*, В.В. Киروشка, Ю.О. Божкова, Т.П. Бондаренко

## Изменения в структуре овариальной ткани при ее насыщении 1,2-пропандиолом в средах различного состава

UDC 616.651.1.018:547.422

I.A. Trutayeva\*, V.V. Kiroshka, Yu.O. Bozhkova, T.P. Bondarenko

## Changes in Ovarian Tissue Structure Following Saturation with 1,2-Propanediol in Media of Various Compositions

**Реферат:** Одной из наиболее перспективных технологий сохранения фертильности у женщин при патологиях яичников различного генеза является трансплантация криоконсервированной овариальной ткани. Для широкого внедрения данной технологии в клиническую практику необходимо оптимизировать протоколы замораживания-оттаивания. Одним из этапов совершенствования процесса криоконсервирования является повышение осмотической толерантности клеток в структуре ткани при добавлении растворов криопротекторов. В данной работе был проведен сравнительный анализ динамики объемной и морфологической трансформации овариальной ткани при поэтапном насыщении 1,2-ПД (1,5–3 М) в средах различного состава. Установлено, что сохранение целостности структуры фолликулов в конечной концентрации 1,2-ПД (3 М) зависело от количественных соотношений электролитных и неэлектролитных компонентов исходной среды. Экспериментально доказано, что повышение осмолярности исходной среды за счет введения неэлектролитного компонента (сахарозы) приводило к уменьшению объема ооцитов и сохранению межклеточных контактов структурных компонентов фолликула.

**Ключевые слова:** овариальная ткань, 1,2-пропандиол, ооцит, дегенеративный фолликул.

**Реферат:** Однією з найбільш перспективних технологій збереження фертильності у жінок із патологіями яєчників різного генезу є трансплантація криоконсервованої овариальної тканини. Для широкого впровадження даної технології в клінічну практику необхідно оптимізувати протоколи заморожування-відтавання. Одним із етапів удосконалення процесу криоконсервування є підвищення осмотичної толерантності клітин у структурі тканини під час додавання розчинів криопротекторів. У даній роботі було проведено порівняльний аналіз динаміки об'ємної та морфологічної трансформації овариальної тканини під час поетапного насичення 1,2-ПД (1,5–3 М) у середовищах різного складу. Встановлено, що збереження цілісності структури фолікулів у кінцевій концентрації 1,2-ПД (3 М) залежало від кількісних співвідношень електролітних і неелектролітних компонентів початкового середовища. Експериментально доведено, що підвищення осмолярності вихідного середовища за рахунок введення неелектролітного компонента (сахарози) призводило до зменшення об'єму ооцитів і збереження міжклітинних контактів структурних компонентів фолікула.

**Ключові слова:** овариальна тканина, 1,2-пропандіол, ооцит, дегенеративний фолікул.

**Abstract:** One of the most promising technologies of preserving fertility in women with ovarian pathologies of various origins is the transplantation of cryopreserved ovarian tissue. Wide introduction of this technology into a clinical practice requires the optimizing of freeze-thawing protocols. One of the stages of improving the cryopreservation process is the enhancing of osmotic tolerance of cells in the tissue when adding the cryoprotective solutions. In this research there was comparatively analyzed the dynamics of volumetric and morphological transformation of ovarian tissue at its gradual saturation with the 1,2-PD (1.5–3 M) in the media of different composition. The preservation of follicle structure integrity in the final concentration of 1,2-PD (3 M) was found to be dependent on quantitative ratios of electrolyte and non-electrolyte components of the initial medium. An increase in the initial medium osmolarity by introducing a non-electrolyte component (sucrose) resulted in a decrease in the volume of oocytes and maintaining of cell-to-cell contacts of the follicle structural components.

**Key words:** ovarian tissue, 1,2-propane diol, oocyte, degenerative follicle.

В современной репродуктивной медицине криоконсервирование и трансплантация овариальной ткани является наиболее перспективным подходом для сохранения репродуктивного потенциала у женщин как после курсов химио- и радиотерапии, так и при патологиях яичников различного генеза [7]. Преимуществами данного подхода является отсутствие процедуры предва-

Current reproductive medicine utilizes the cryopreservation and transplantation of ovarian tissue as the most promising approach to preserve a reproductive potential of women after chemo- and radiotherapies, as well as in ovarian pathologies of various origins [7]. The advantages of this approach are the absence of preliminary hormonal stimulation, the possibility of sampling the tissue various layers at any convenient

Отдел биохимии и фармакологии нейрогуморальных систем, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

\*Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61016; тел.: (+38 057) 373-30-07, факс: (+38 057) 373-30-84, электронная почта: irinatolubekova@gmail.com

Поступила 09.11.2015

Принята в печать 14.01.2016

Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2016. – Т. 26, №1. – С. 53–62. © 2016 Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

Department of Biochemistry and Pharmacology of Neurohumoral Systems, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

\*To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61016; tel.: +380 57 373 3007, fax: +380 57 373 3084, e-mail: irinatolubekova@gmail.com

Received November, 09, 2015

Accepted January, 14, 2016

Probl Cryobiol Cryomed 2016; 26(1): 53–62.

© 2016 Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

нительной гормональной стимуляции, возможность забора различных слоев ткани в любое удобное для врача и пациента время, достаточный фолликулярный запас (от 15 до 100 примордиальных фолликулов на 1 мм<sup>3</sup>), который необходим для криоконсервирования [6, 8]. Однако количество рождения здоровых детей после трансплантации криоконсервированной овариальной ткани остается крайне низким [2, 6]. Это связано со сложностью данного подхода, поскольку требуется сохранить структурную целостность фолликула, состоящего из нескольких типов соматических клеток (гранулы, кумулюса, теки) и половой клетки (ооцита), которые отличаются между собой размером, объемом и проницаемостью мембраны для воды и криопротектора (КП). Одним из способов повышения эффективности протоколов криоконсервирования овариальной ткани является снижение уровня осмотического повреждения различных типов клеток в структуре ткани при добавлении гиперосмолярных растворов проникающих КП. Известно, что осмотическое повреждение ооцитов при насыщении растворами проникающих КП связано с динамикой объемных изменений клеток, которые зависят от температуры, времени, состава среды экспозиции, а также проницаемости мембраны для используемого КП [13, 18]. В современной литературе описаны эмпирические подходы добавления КП (глицерин, этиленгликоль, 1,2-пропанediол (1,2-ПД), диметилсульфоксид (ДМСО)) к фрагментам овариальной ткани, основанные на исследованиях осмотических реакций ооцитов и эмбрионов в гипертонических растворах КП [1, 19]. Экспериментально определены и теоретически рассчитаны коэффициенты проницаемости мембраны для молекул воды и криопротекторов для эмбрионов и ооцитов [1, 19]. Это позволяет оптимизировать время и температуру экспозиции зрелых ооцитов и эмбрионов в растворах КП при одно- и многоэтапном их добавлении. Наличие плотных межклеточных контактов в структуре овариальной ткани дает основание предполагать, что осмотические реакции ооцитов в составе ткани будут носить совершенно другой характер. Это обусловлено неравномерным проникновением КП в объем фрагмента ткани [2]. Следовательно, протоколы насыщения растворами проникающих КП должны быть специально оптимизированы для овариальной ткани. Одним из этапов повышения их эффективности является подход, основанный на использовании многокомпонентных инкубационных сред.

Цель работы – исследование сохранности структуры овариальной ткани и характера объемных изменений ооцитов при двухэтапном добав-

for the physician and patient time, a sufficient follicular reserve (from 15 to 100 primordial follicles per 1 mm<sup>3</sup>), essential for cryopreservation [6, 8]. However, the birth rate of healthy babies after transplantation of cryopreserved ovarian tissue has remained very low [2, 6]. This is due to the complexity of this approach, as there is a need in maintaining a structural integrity of the follicle, consisting of several types of somatic cells (granulosa, cumulus, theca) and germ cell (oocyte), which differ in dimensions, volume and permeability of membranes for water and cryoprotective agent (CPA). One of the ways to improve the efficiency of the cryopreservation protocols for the ovarian tissue is a reduction of osmotic damage of different cell types in the tissue when adding the hyperosmolar solutions of penetrating CPA. It is known that osmotic damage of oocytes when saturating with the solutions of penetrating CPA is associated with the dynamics of volumetric changes in cells, depending on temperature, time and the exposure medium composition, as well as the membrane permeability coefficient for the used CPA [13, 18]. Current publications describe empirical approaches for adding the CPA (glycerol, ethylene glycol, 1,2-propanediol (1,2-PD), dimethyl sulfoxide (DMSO)) to ovarian tissue fragments based on the studies of osmotic reactions of oocytes and embryos in hypertonic solutions of CPAs [1, 19]. Permeability coefficients of membrane for water molecules and CPAs for embryos and oocytes were experimentally determined and theoretically calculated [1, 19]. This allowed to optimize the time and temperature of exposure for mature oocytes and embryos in the CPAs solutions during single and multi-stage adding. The presence of dense cell-to-cell contacts in the structure of ovarian tissue allows to assume that an osmotic response of oocytes being inside the tissue will be of a completely different character. This is stipulated by an uneven penetration of CPA into a tissue fragment [2]. Therefore, the protocols of saturating with the penetrating CPA solutions should be specifically improved for ovarian tissue. One of the stages to enhance their efficiency is the approach with using the multi-component incubation media.

The research aim was to assess the preservation of ovarian tissue structure and the nature of volumetric changes of oocytes during a two-stage addition of 1,2-PD hyperosmolar solution depending on the exposure medium composition.

### Materials and methods

The experiments were carried out in accordance with the General Principles of Experiments in Animals, approved by the 5<sup>th</sup> National Congress in Bioethics (Kiev, 2013) and consistent with the statements of the European Convention for the Protection of Vertebrate



лении гиперосмолярного раствора 1,2-ПД в зависимости от композиционного состава среды экспозиции.

### Материалы и методы

Эксперименты проведены в соответствии с «Общими принципами экспериментов на животных», одобренными V Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2013) и согласованными с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986).

Объектом исследования служили фрагменты (0,5–1 мм<sup>3</sup>) овариальной ткани крыс линии Вистар, которые содержались в стандартных условиях вивария ИПКиК НАН Украины.

Насыщение фрагментов овариальной ткани проводили в средах различного состава: среда 1 – DMEM (300 мОсмоль/л), pH 7,4; среда 2 – DMEM, содержащая дополнительно 100 мМ NaCl (496 мОсмоль/л), pH 7,4; среда 3 – DMEM, содержащая дополнительно 200 мМ сахарозы (534 мОсмоль/л), pH 7,4. Осмотическое давление исходных растворов определяли с помощью осмометра.

В качестве КП использовали 1,2-ПД. Фрагменты овариальной ткани помещали в 1 мл раствора. Добавление КП осуществляли в два этапа (0 М → 1,5 М → 3 М КП) при 22°C. Время экспозиции на каждом этапе насыщения составляло 30 мин. Для морфологических и объемных исследований проводили фиксацию фрагментов овариальной ткани на каждом этапе насыщения во всех исследуемых средах.

Для морфологических исследований ткань фиксировали 2%-м раствором глутарового альдегида на 150 мМ фосфатном буфере. После чего готовили полутонкие срезы по стандартной методике [9]. С каждого образца делали серийные срезы толщиной 5 мкм. Каждый третий срез окрашивали толуидиновым синим. Анализировали только фолликулы с видимым ядром для исключения повторного счета одного и того же фолликула в срезе. Количество нормальных и дегенеративных фолликулов выражали в процентах по отношению к их общему числу в образце. Деструктивные изменения фолликулов (рис. 1) были оценены по следующей классификации [10, 17]: нормальные – ооцит целостный с круглым ядром и ядрышком, окруженный хорошо организованными клетками гранулезы и целостной базальной мембраной (рис. 1, А); дегенеративный тип 1 – уменьшенный в объеме ооцит, содержащий пикнотическое ядро и хорошо организованные клетки гранулезы (рис. 1, В) и дегенера-

Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasburg, 1986).

The research object were the ovarian tissue fragments (0.5–1 mm<sup>3</sup>) derived from Wistar rats kept under standard animal house conditions at the IPC&C of the NAS of Ukraine.

Ovarian tissue fragments were incubated in various media: medium 1 was DMEM (300 mOsm/l), pH 7.4; medium 2 comprised DMEM additionally supplemented with 100 mM NaCl (496 mOsm/l), pH 7.4; medium 3 was DMEM additionally supplemented with 200 mM sucrose (534 mOsm/l), pH 7.4. The osmotic pressure of the stock solutions was determined using an osmometer.

As the CPA we used 1,2-PD. Ovarian tissue fragments were placed into 1 ml of solution. The CPA was added in two stages (0 M → 1.5 M → 3 M CPA) at 22°C. Exposure time at each stage of saturation was 30 min. For morphological and volumetric studies the ovarian tissue fragments were fixed at each stage of saturation in all the investigated media.

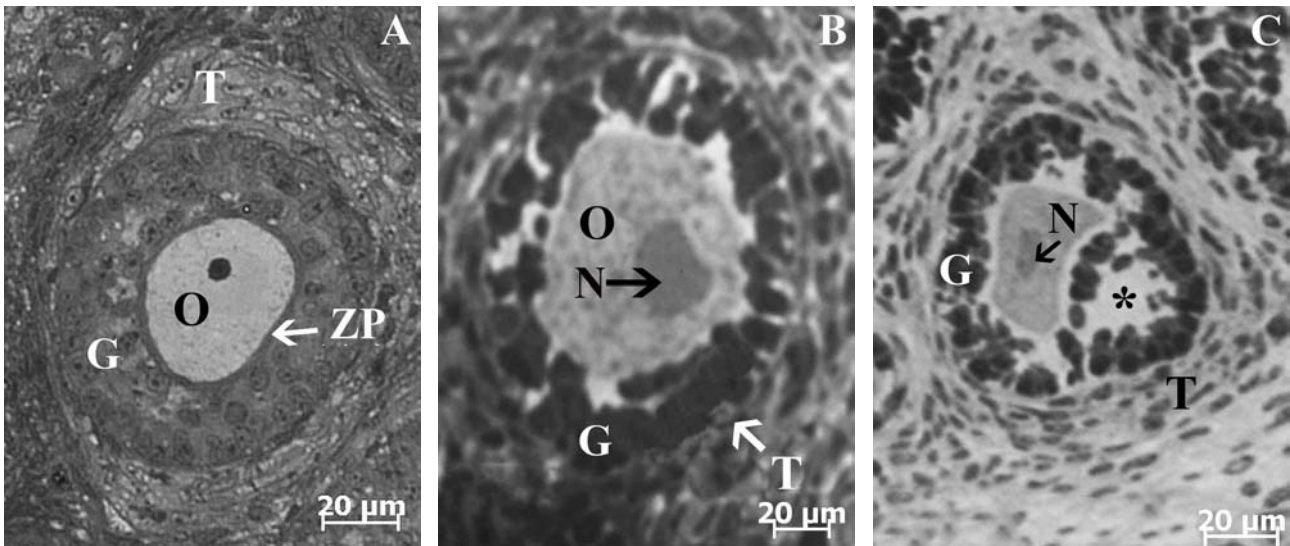
For morphological studies the tissue was fixed by 2% solution of glutaraldehyde in 150 mM phosphate buffer. Afterwards the semi-thin sections were prepared in a standard way [9]. Each sample was cut for 5 μm serial slices. Every third section was stained with Toluidine blue. Analysis was performed only in the follicles with a visible nucleus to avoid double counting of the same follicle in the section. The numbers of normal and degenerative follicles were expressed as a percentage vs. the total number of follicles in the sample. Destructive changes of the follicles (Fig. 1) were estimated as follows [10, 17]: as normal were defined the integral oocytes with a round nucleus and nucleolus, surrounded by a well-organized granulosa cells and a valid basal membrane (Fig. 1A); degenerative type 1 cells were the oocytes with reduced volume containing pyknotic nucleus and well-organized granulosa cells (Fig. 1B) and degenerative type 2 comprised shrunk oocytes surrounded by disorganized and swollen granulosa cells (Fig 1C). Intact tissues served as the control.

Histological preparations were examined using Axio Observer Z1 microscope equipped with camera (Carl Zeiss, Germany), Plan Fluor ×20 and ×40 lens.

Dimensions of oocytes were analysed using Axio Vision 4.7 (Carl Zeiss) software, the cell volume was calculated according to the following formula [20]:  $V = 0,75225(A)^{1,5}$ , where A is oocyte cross-section area. Oocyte volume changes in the solutions containing 1,2-PD were defined as  $V_{exp}/V_{control}$ , where  $V_{exp}$  is oocyte volume in experimental group,  $V_{control}$  – volume of intact oocyte.

Statistical processing of the results involved a multi-factor analysis of variance and Student's t-test using





**Рис. 1.** Гистопрепарат неонатальной овариальной ткани после окрашивания толуидиновым синим: **A** – нормальный фолликул; **B** – дегенеративный тип 1; **C** – дегенеративный тип 2; O – ооцит, G – клетки гранулезы, N – ядро, ZP – зона пеллюцида, T – клетки теки, \* – аккумуляция жидкости.

**Fig. 1.** Histopreparation of neonatal ovarian tissue after staining with toluidine blue: **A** – normal follicle; **B** – degenerative type 1; **C** – degenerative type 2; O – oocyte, G – granulosa cells, N – nucleus, ZP – zona pellucida, T – theca cells, \* – fluid accumulation.

тивный тип 2 – ооцит сжат, клетки гранулезы дезорганизованы и набухшие (рис. 1, C). Интактные ткани служили контролем.

Исследования гистологических препаратов осуществляли с помощью микроскопа со встроенной камерой «Axio Observer Z1» («Carl Zeiss», Германия) с объективами «Plan Fluor»  $\times 20$  и  $\times 40$ .

Размер ооцитов анализировали с использованием компьютерной программы «Axio Vision 4.7» («Carl Zeiss»), объем клеток рассчитывали согласно формуле [20]:  $V = 0,75225(A)^{1,5}$ , где A – площадь поперечного сечения ооцита. Изменения объема ооцита в растворах, содержащих 1,2-ПД, определяли как  $V_{\text{опыт}}/V_{\text{контроль}}$ , где  $V_{\text{опыт}}$  – объем ооцита в опытной группе,  $V_{\text{контроль}}$  – объем интактного ооцита.

При статистической обработке результатов использовали многофакторный дисперсионный анализ и *t*-критерий Стьюдента с помощью программы «Excel» («Microsoft», США). Данные представлены в виде  $M \pm m$ . Различия между группами считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

На рис. 2 представлена динамика структуры овариальной ткани при насыщении возрастающими концентрациями 1,2-ПД в зависимости от состава среды.

Показано, что в норме фолликулы содержат сферический ооцит с крупным эксцентричным ядром, окруженным умеренно гранулярной цитоплазмой (рис. 2). Снаружи ооцит окружен равно-

Excel software (Microsoft, USA). The data were presented as  $M \pm m$ . The differences between the groups were considered as statistically significant at  $p < 0,05$ .

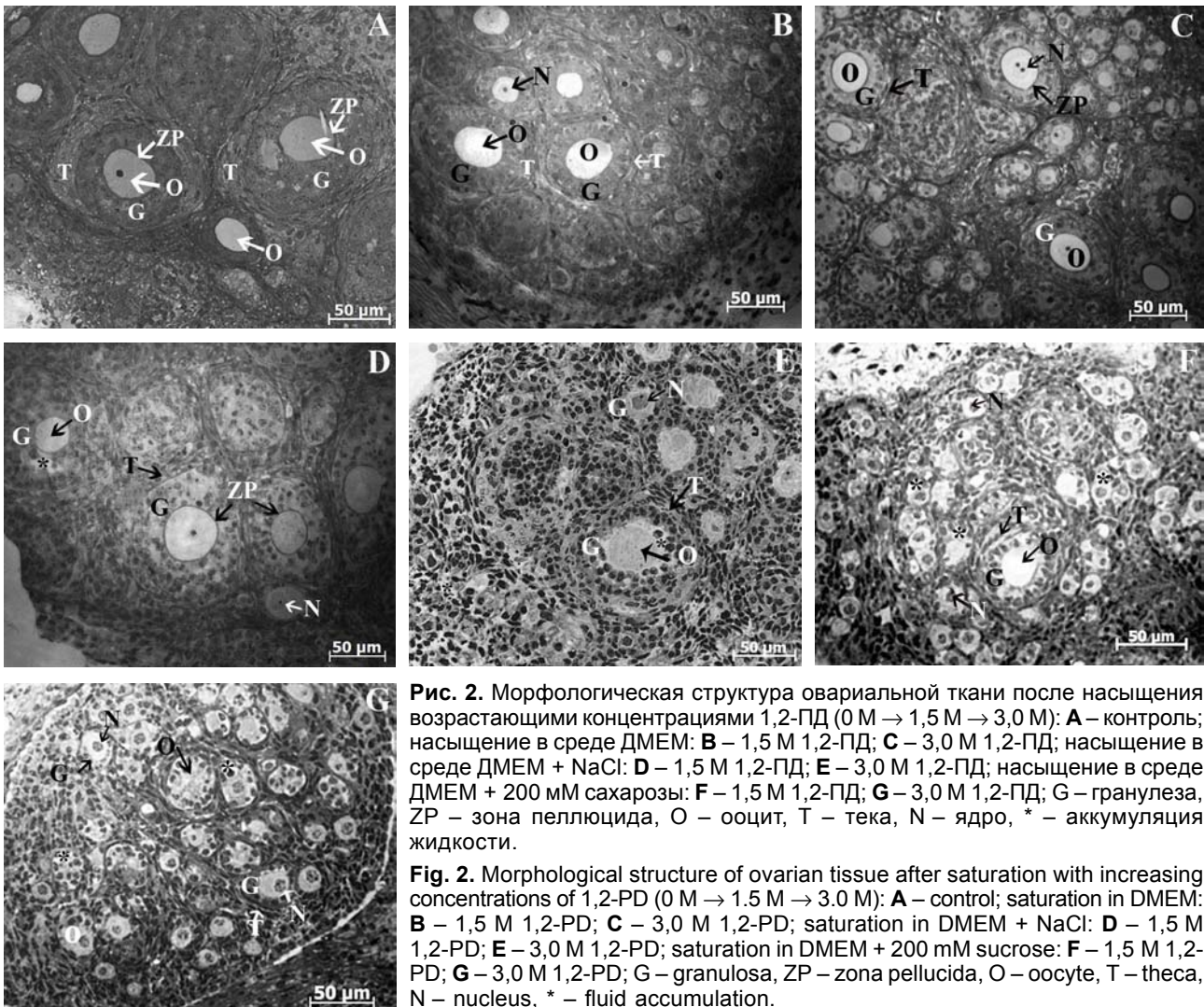
### Results and discussion

Fig. 2 presents the changes in ovarian tissue structure during incubation with increasing concentrations of 1,2-PD depending on the medium composition.

It is seen that normal follicles contain a spherical oocyte with large eccentric nucleus surrounded with moderately granular cytoplasm (Fig. 2). Outside the oocyte is surrounded with uniform glycoprotein shell (*zona pellucida*) tightly adjacent with granulosa cell layers, contacting with each other as well as with the inner side of basal membrane. Theca cells are outside the basal membrane (Fig. 2A).

During stepwise addition of 1,2-PD solution (0 M  $\rightarrow$  1.5 M  $\rightarrow$  3.0 M) the nature of morphological transformations of ovarian tissue was determined by a saturation medium composition. Thus, use of DMEM (medium 1) as a saturation solution resulted in minor changes of follicle structure: a coarse-grained granularity of oocyte cytoplasm appeared following addition of increasing concentrations of 1,2-PD (Figure 2B, C). At the same time there was still a contact between the granulosa cells and oocyte, which remained spherical, *zona pellucida* was clearly defined and uniform. No change in structure of the theca and interstitial cells was found. Theca cells were in contact with each other and basal membrane.





**Рис. 2.** Морфологическая структура овариальной ткани после насыщения возрастающими концентрациями 1,2-ПД (0 М → 1,5 М → 3,0 М): **А** – контроль; насыщение в среде ДМЕМ: **В** – 1,5 М 1,2-ПД; **С** – 3,0 М 1,2-ПД; насыщение в среде ДМЕМ + NaCl: **Д** – 1,5 М 1,2-ПД; **Е** – 3,0 М 1,2-ПД; насыщение в среде ДМЕМ + 200 мМ сахарозы: **Ф** – 1,5 М 1,2-ПД; **Г** – 3,0 М 1,2-ПД; G – гранулеза, ZP – зона пеллюцида, O – ооцит, T – тека, N – ядро, \* – аккумуляция жидкости.

**Fig. 2.** Morphological structure of ovarian tissue after saturation with increasing concentrations of 1,2-PD (0 M → 1.5 M → 3.0 M): **A** – control; saturation in DMEM: **B** – 1.5 M 1,2-PD; **C** – 3.0 M 1,2-PD; saturation in DMEM + NaCl: **D** – 1.5 M 1,2-PD; **E** – 3.0 M 1,2-PD; saturation in DMEM + 200 mM sucrose: **F** – 1.5 M 1,2-PD; **G** – 3.0 M 1,2-PD; G – granulosa, ZP – zona pellucida, O – oocyte, T – theca, N – nucleus, \* – fluid accumulation.

мерной гликопротеиновой оболочкой (*zona pellucida*), к которой плотно прилегают слои клетки гранулезы, контактирующие между собой и с внутренней стороны базальной мембраны. С внешней стороны базальной мембраны находятся клетки теки (рис. 2, А).

При поэтапном добавлении раствора 1,2-ПД (0 М → 1,5 М → 3,0 М) характер морфологических трансформаций овариальной ткани определялся композиционным составом среды насыщения. Так, использование ДМЕМ (среда 1) в качестве раствора насыщения приводило к незначительным изменениям структуры фолликула: наблюдалось грубозернистая гранулярность цитоплазмы ооцита при добавлении возрастающих концентраций 1,2-ПД (рис. 2, В, С). При этом сохранялся контакт между клетками гранулезы и ооцитом, который оставался сферическим, зона пеллюцида была четко выраженной и равномерной. Изменение структуры клеток теки и интерстициальных клеток

Rise in osmolarity of initial saturation medium by supplementing with electrolyte component, 230 mM NaCl (medium 2), or non-electrolyte, 200 mM sucrose (medium 3), caused a change in the ovarian tissue structure when incubated with increasing concentrations of 1,2-PD. Fig. 2D shows, that following the first stage of incubation (1.5 M in 1,2-PD) in the medium 2 no significant morphological changes were observed. Herewith *zona pellucida*, cell-cell contacts between oocyte and granulosa, as well as granulosa and theca were preserved (Fig. 2D). Increasing the CPA concentration up to 3 M resulted in accumulation of fluid between structural components of the tissue, cell shrinking and loss of cell-cell contacts in the follicle inner layer. Outer follicular layer preserved the contact of granulosa cells with the basal membrane and theca cells (Fig. 2E).

Supplementing of saturation medium with sucrose (medium 3) caused an accumulation of fluid in the ovarian tissue stroma even at the first stage of

не отмечалось. Клетки теки контактировали между собой и базальной мембраной.

Повышение осмолярности исходной среды насыщения введением электролитного компонента – 230 мМ NaCl (среда 2) и неэлектролитного – 200 мМ сахарозы (среда 3) вызывало изменение структуры овариальной ткани при инкубации с возрастающими концентрациями 1,2-ПД. На рис. 2, D показано, что на первом этапе инкубации (в 1,5 М 1,2-ПД) в случае применения среды 2 значительных морфологических изменений не наблюдалось. При этом сохранялась зона пеллюцида, межклеточные контакты между ооцитом и гранулезой, а также гранулезой и текой (рис. 2, D). Увеличение концентрации КП до 3 М приводило к аккумуляции жидкости между структурными компонентами ткани, сжатию клеток и потере межклеточных контактов во внутреннем слое фолликула. Во внешнем слое фолликула сохранялся контакт клеток гранулезы с базальной мембраной и клетками теки (рис. 2, E).

Добавление в среду насыщения сахарозы (среда 3) вызывало аккумуляцию жидкости в строме овариальной ткани уже на первом этапе инкубации с 1,2-ПД (рис. 2, F). В этом случае не наблюдалось нарушений плотных контактов в структуре фолликулов (рис. 2, F). Структура ооцита соответствовала физиологической норме. Увеличение концентрации 1,2-ПД до 3 М приводило к образованию свободного пространства между клетками гранулезы и стромальными элементами овариальной ткани (рис. 2, G). При этом плотный межклеточный контакт между структурными элементами фолликула (ооцитом, клетками гранулезы, теки и базальной мембраны) сохранялся (рис. 2, G).

В нашей работе был проведен анализ объемных изменений ооцитов в структуре ткани при ее инкубации. Как следует из рис. 3, изменение объема ооцитов определялось как осмолярностью, так и композиционным составом среды насыщения.

Видно, что насыщение ткани в средах, содержащих 1,5 М 1,2-ПД, приводило к значимому уменьшению объема ооцитов в среде 3, наряду с этим, в средах 1 и 2 данный показатель находился в пределах физиологической нормы. При увеличении концентрации 1,2-ПД до 3 М отмечалось сжатие ооцитов в средах 2 и 3 на 30–36%, а в среде 1 на 15%. Необходимо отметить, что амплитуда изменения объема при пошаговом насыщении ткани КП (0 М → 1,5 М → 3,0 М) в средах 1 и 3 была незначительна (5–7%), в то время как в среде 2 наблюдалось уменьшение объема ооцитов до 28%.

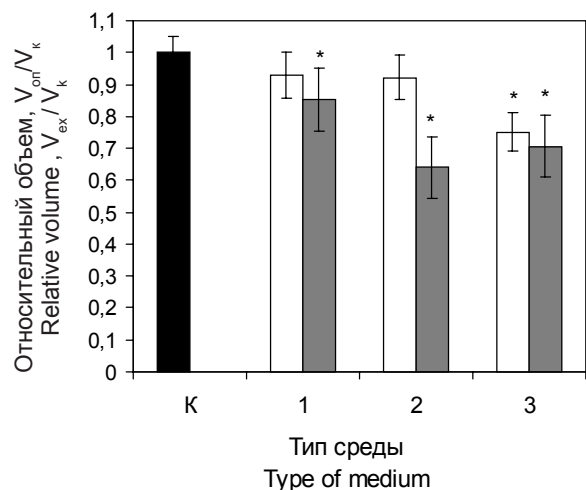
Анализ уровня сохранности фолликулов после насыщения КП показал (рис. 4, A), что максимальная

incubation with 1,2-PD (Fig. 2F). In this case, there was no disorders of tight contacts in the structure of follicles (Fig. 2, F). The oocyte structure corresponded to the physiological norm. Increasing the concentration of 1,2-PD up to 3 M resulted in the formation of free space between the granulosa cells and stromal elements of ovarian tissue (Fig. 2G). Herewith a tight cell-cell contact between structural elements of the follicle (oocyte, granulosa cells, theca and basal membrane) was kept (Fig. 2, G).

Our research included the analysis of oocyte volumetric changes in the tissue structure during its incubation. As follows from Fig. 3, the change in volume of oocytes depended both on osmolarity and composition of saturation medium.

It is seen that incubation of the tissue in the media containing 1.5 M 1,2-PD resulted in a significant decrease in the volume of oocytes in the medium 3, in the media 1 and 2 this index was within the physiological limits. Increasing of 1,2-PD concentration up to 3M led to shrinking of oocytes in the media 2 and 3 by 30–36% and by 15% in the medium 1. It should be noted that the amplitude of the volume change during stepwise saturation of tissue with CPA (0 M → 1.5 M → 3.0M) in the media 1 and 3 was insignificant (5–7%), while in the medium 2 there was observed a decrease of oocytes volume by 28%.

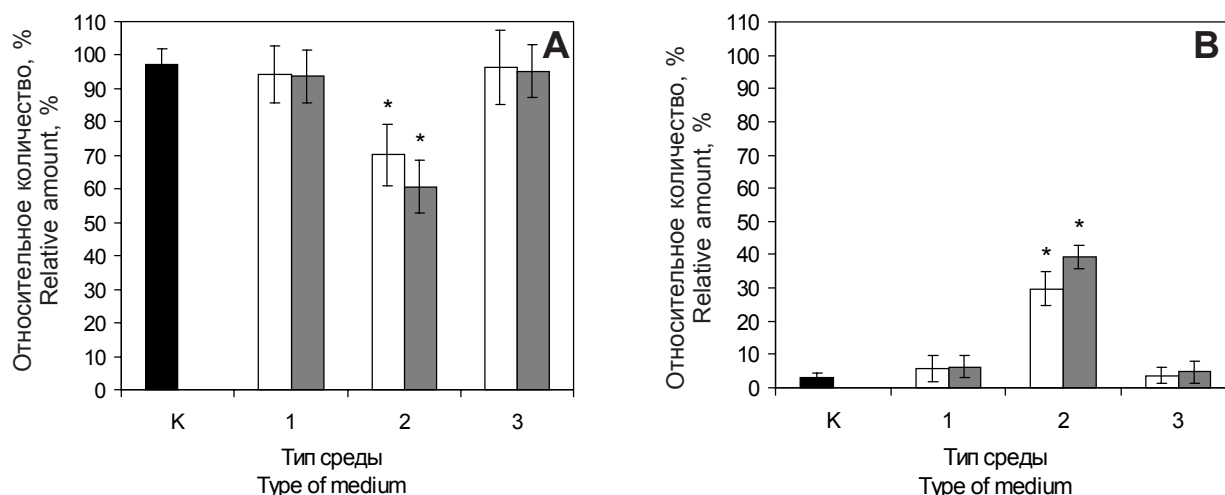
Analysis of the integrity of follicles after saturation with CPA showed (Fig. 4A) that the maximum



**Рис. 3.** Относительный объем ооцитов при инкубации в различных средах при насыщении 1,2-ПД (□ – 1,5 М; ■ – 3 М) в зависимости от типа исходной среды: К – контроль; 1 – DMEM, 2 – DMEM + 100 мМ NaCl, 3 – DMEM + 200 мМ сахарозы; \* – различия статистически значимы по сравнению с контролем,  $p < 0,05$ .

**Fig. 3.** Relative volume of oocytes following incubation in various media with 1,2-PD (□ – 1.5 M, ■ – 3 M) depending on basic medium type: K – control; 1 – DMEM, 2 – DMEM + 100 mM NaCl, 3 – DMEM + 200 mM sucrose; \* – statistically significant difference compared to the control,  $p < 0,05$ .





**Рис. 4.** Анализ уровня сохранности фолликулов при насыщении 1,2-ПД (□ – 1,5 М; ■ – 3 М) в различных средах: К – контроль, 1 – ДМЕМ, 2 – ДМЕМ + 100 мМ NaCl, 3 – ДМЕМ + 200 мМ сахарозы; **А** – нормальные фолликулы и дегенеративные фолликулы типа 1; **В** – фолликулы дегенеративного типа 2, \* – различия статистически значимы по сравнению с контролем,  $p < 0,05$ .

**Fig. 4.** Analysis of preservation rate of follicles at saturation with 1,2-PD (□ – 1.5 M, ■ – 3 M) in various media: K – control 1 – DMEM, 2 – DMEM + 100 mM NaCl, 3 – DMEM + 200 mM sucrose; **A** – normal follicles and degenerative type 1, **B** – degenerative type 2 follicles; \* – statistically significant difference compared to the control,  $p < 0,05$ .

сохранность фолликулов различных типов зрелости при насыщении ткани КП отмечена в средах 1 и 3. При этом уровень фолликулов с необратимыми изменениями (тип 2) был незначительным, а в случае применения среды 2 их количество составляло  $(29,72 \pm 5,2)$  и  $(39,3 \pm 6,5)\%$  в 1,5 и 3 М 1,2-ПД соответственно.

Экспериментальные данные, приведенные выше, свидетельствуют о том, что основным фактором, определяющим сохранность структуры овариальной ткани в условиях действия гиперосмолярного раствора проникающего КП, является состав среды насыщения. Повышение осмолярности исходной среды за счет введения NaCl (среда 2) и непроникающего компонента – сахарозы (среда 3) – вызывало различные морфологические и объемные изменения овариальной ткани, а при использовании исходной изотонической среды (среда 1) объем ооцитов при увеличении концентрации 1,2-ПД оставался в пределах физиологических значений. Насыщение ткани средой 3 приводило к сжатию клеток уже на первом этапе экспозиции с КП (1,5 М 1,2-ПД) и оставалось таковым при дальнейшем увеличении его концентрации до 3 М, тогда как в случае использования среды 2 объемные изменения были выявлены только в 3 М растворе 1,2-ПД. Указанные выше отличия, вероятно, связаны с различным осмотическим ответом клеток на повышение осмолярности среды при введении электролитного или неэлектролитного компонента. Было показано [11, 12, 16], что изменение осмотического давления во внеклеточ-

preservation of the follicles of different maturation types at tissue saturation with CPA was found in the media 1 and 3. In particular, the level of follicles with irreversible changes (type 2) was negligible, while when using the medium 2 their number made  $(29.72 \pm 5.2)$  and  $(39.3 \pm 6.5)\%$  in 1.5 M and 3 M 1,2-PD, respectively.

The above described experimental data demonstrate that the main factor determining the preservation of ovarian tissue structures under the effect of hyperosmolar solution of penetrating CPA is the saturation medium composition. Increasing the osmolarity of initial medium by supplementing with NaCl (medium 2) and non-penetrating component, *i. e.* sucrose (medium 3), caused different morphological and volumetric changes in ovarian tissue, and when using the basic isotonic medium (medium 1) the volume of oocytes remained within physiological values following 1,2-PD concentration increasing. Saturation of the tissue with the medium 3 resulted in the cell shrinkage even at the first stage of the incubation in CPA (1.5 M 1,2-PD) and remained the same during further rise in the concentration up to 3 M, whereas when using the medium 2 the volumetric changes were found only in 3 M solution of 1,2-PD. The above-mentioned differences are likely to be associated with various osmotic cell response to the increase in osmolarity of the medium when introducing either electrolyte or non-electrolyte component. The change of osmotic pressure in extracellular medium due to the introduction of organic and inorganic ions has been shown [11, 12, 16] to lead to distortion of cell ion homeostasis, resulting

ной среде за счет введения органических и неорганических ионов приводит к нарушению ионного гомеостаза клетки, в результате чего происходит включение адаптационных механизмов поддержания клеточного объема RVD (*regulatory volume decrease*) и RVI (*regulatory volume increase*). Также при введении во внеклеточную среду проникающих КП объемные изменения клеток определяются коэффициентом проницаемости мембраны для воды и криопротектора [13, 18]. В настоящее время установлено, что для ооцитов коэффициент проницаемости мембраны для молекул воды выше, чем для КП (ДМСО, 1,2-ПД) и динамика объема клеток при экспозиции в гиперосмолярных растворах КП имеет двухфазный характер [14, 21]. Показано, что в течение первых минут экспозиции ооцитов в 1,5 М КП (ДМСО, 1,2-ПД) происходит первоначальное сжатие клеток, связанное с выходом осмотически активной воды, после чего восстанавливается их объем до 90–95% за счет диффузии молекул воды и КП внутрь клетки по градиенту концентрации [20]. Установлено, что сохранение морфологической целостности структуры фолликула при использовании исходной изоосмолярной среды 1 связано с восстановлением объема клеток за счет проникновения КП (30 мин) и включения адаптационных механизмов регуляции объема. Аналогичный результат был получен при применении исходной гиперосмолярной электролитной среды 2 при насыщении 1,5 М 1,2-ПД. Однако увеличение концентрации КП в этой среде до 3 М приводило к значимому уменьшению объема ооцитов, которое сопровождалось значительным количеством поврежденных фолликулов (дегенеративный тип 2). В этих условиях восстановление объема не происходит за счет высокой концентрации NaCl во внеклеточной среде, которая нарушает ионный гомеостаз [4]. Сопоставляя данные, приведенные на рис. 2 и 4, необходимо отметить, что в случае исходной гиперосмолярной среды 3 подобное уменьшение объема ооцитов наблюдалось уже на первом этапе насыщения ткани раствором 1,2-ПД (1,5 М). Этот факт можно объяснить тем, что повышение осмолярности исходной среды путем добавления сахарозы приводит к сжатию клеток как за счет осмотического давления, создаваемого КП, так и выхода внутриклеточных анионов и катионов по градиенту концентрации в неэлектролитной среде [3, 15]. Однако в этих экспериментальных условиях (рис. 2 и 4), несмотря на аккумуляцию жидкости в строме ткани, сохраняются структура ооцита и плотные межклеточные контакты в фолликуле. R. Comizzoli и соавт. [5] получили аналогичные данные на ооцитах. Авторами показано, что ооциты в гипертонических растворах,

in triggering the adaptive mechanisms for maintenance of cell volume of RVD (*regulatory volume decrease*) and RVI (*regulatory volume increase*). In addition, when introducing penetrating CPAs into the extracellular medium the volumetric changes of cells were determined by the coefficient of permeability of membrane for water and CPA [13, 18]. In oocytes, the coefficient of membrane permeability for water molecules has been established to be higher than for CPAs (DMSO, 1,2-PD) and the dynamics of cell volume upon exposure to hyperosmolar solutions of CPA was biphasic [14, 21]. It has been demonstrated that within the first minutes of exposure of oocytes to 1.5M CPAs (DSMO, 1,2-PD) an initial shrinkage of the cells occurred, associated with the release of osmotically active water, afterwards their volume recovered up to 90–95% due to the diffusion of water and CPAs molecules into a cell by the concentration gradient [20]. The preservation of morphological integrity of the follicle structure using the basic isoosmolar medium 1 has been found to be associated to the reduction in cell volume due to the CPA penetration (30 min) and activation of adaptive mechanisms of volume regulation. Similar results were obtained when applying the basic hyperosmolar electrolyte medium 2 with 1.5 M 1,2-PD. However, a rise in CPA concentration in this medium up to 3 M resulted in a significant decrease in the volume of oocytes, accompanied by appearance of a big number of damaged follicles (degenerative type 2). Under these conditions, the volume recovery does not occur due to a high concentration of NaCl in extracellular medium, breaking the ionic homeostasis [4]. Comparing the data shown in Figs. 2 and 4 one may note that for a basic hyperosmolar medium 3 such a decrease in oocytes volume was observed already at the first stage of tissue saturation with 1,2-PD solution (1.5 M). This can be explained by the fact that the increase in osmolarity of the initial medium by adding a sucrose results in cell shrinking both due to osmotic pressure produced by the CPA, and release of intracellular anions and cations to non-electrolyte medium by concentration gradient [3, 15]. However, in these experiments (Fig. 2 and 4), despite the accumulation of fluid in the tissue stroma the oocyte structure and dense intercellular contacts in the follicle were preserved. R. Comizzoli *et al.* [5] obtained similar data in oocytes. The authors have shown that the oocytes in hypertonic solutions prepared by adding various concentrations of sucrose (0.2–1.4 M) to the isotonic solution of phosphate buffered saline (290 mOsm/l), exhibited an osmotic resistance ranging from 200 to 750 mOsmol/l. Under these conditions, there was a reduction in their volume by 40%, but the structural and functional integrity was retained as well as the blastocysts were formed *in*





приготовленных путем добавления различной концентрации сахарозы (0,2–1,4 М) к изотоническому раствору фосфатно-солевого буфера (290 мОсмоль/л), демонстрируют осмотическую устойчивость в пределах от 200 до 750 мОсмоль/л. В этих условиях происходит уменьшение их объема на 40%, однако сохраняется структурная и функциональная целостность, а также происходит формирование blastocyst в условиях *in vitro* после процедуры ЭКО. Следовательно, сжатие клеток в отсутствие дегенеративных фолликулов типа 2 при эквипирации ткани с возрастающими концентрациями 1,2-ПД (1,5–3 М) в гиперосмолярных средах, содержащих сахарозу, является обратимым процессом при возврате в физиологические условия. Таким образом, состав исходных гиперосмолярных сред при насыщении ткани КП является основным фактором, определяющим ее сохранность.

### Выводы

В условиях действия гиперосмолярных растворов КП нарушение структуры овариальной ткани и объемные изменения клеток определяются составом среды насыщения.

Максимальный уровень сохранности фолликулов отмечался при использовании как изоосмолярной электролитной среды, так и гиперосмолярной при введении неэлектролитного компонента – сахарозы. Повышение осмолярности среды за счет электролита NaCl вызывало повреждение структуры фолликулов в 3 М 1,2-ПД.

### Литература

1. Amorim C.A., Rondina D., Rodrigues A.P.R. et al. Cryopreservation of isolated ovine primordial follicles with propylene glycol and glycerol // *Fertil. Steril.* – 2004. – Vol. 81, №1 – P. 735–740.
2. Andersen C.Y., Rosendahl M., Byskov A.G. et al. Two successful pregnancies following autotransplantation of frozen/thawed ovarian tissue // *Hum. Reprod.* – 2008. – Vol. 23, №10. – P. 2266–2272.
3. Banderali U., Roy G. Activation of K<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> channels in MDCK cells during volume regulation in hypotonic media // *J. Membrane Biol.* – 1992. – Vol. 126. – P. 219–234.
4. Bortner C.D., Hughes F.M., Cidowski J.A. A primary role for K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> efflux in the activation of apoptosis // *J. Biol. Chem.* – 1997. – Vol. 272, №51. – P. 32436–32442.
5. Comizzoli P., Wildt D.E., Pukazhenthil B.S. Impact of anisotonic conditions on structural and functional integrity of cumulus-oocyte complexes at the germinal vesicle stage in the domestic cat // *Mol. Reprod. Dev.* – 2008. – Vol. 75, №2. – P. 345–354.
6. Demeestere I., Simon P., Buxant F. et al. Ovarian function and spontaneous pregnancy after combined heterotopic and orthotopic cryopreserved ovarian tissue transplantation in a patient previously treated with bone marrow transplantation: case report // *Hum. Reprod.* – 2006. – Vol. 21. – P. 2010–2014.
7. Demeestere I., Simon P., Emiliani S. et al. Options to preserve fertility before oncological treatment: cryopreservation of

*in vitro* after IVF procedure. Therefore, the cell shrinkage in case of absence of type 2 degenerative follicles following incubation of the tissue with increasing concentrations of 1,2-PD (1.5–3 М) in sucrose-containing hyperosmolar media, is reversible when returning to physiological conditions. Thus, the composition of initial hyperosmolar media when saturating the tissue with CPA is the main factor determining its safety.

### Conclusions

Under the effect of hyperosmolar solutions of the CPAs the disorder of ovarian tissue structure and volumetric changes of the cells are determined by the saturation medium composition.

The maximal preservation rate of the follicles was observed when using both iso-osmolar electrolyte medium and hyperosmolar one when introducing a non-electrolyte component, *i.e.* sucrose. Rise in the medium osmolarity due to electrolyte NaCl caused an injury of the structure of follicles in 3 М 1,2-PD.

### References

1. Amorim C.A., Rondina D., Rodrigues A.P.R. et al. Cryopreservation of isolated ovine primordial follicles with propylene glycol and glycerol. *Fertil Steril* 2004; 81(1): 735–740.
2. Andersen C.Y., Rosendahl M., Byskov A.G. et al. Two successful pregnancies following autotransplantation of frozen/thawed ovarian tissue. *Hum Reprod* 2008; 23 (10): 2266–2272.
3. Banderali U., Roy G. Activation of K<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> channels in MDCK cells during volume regulation in hypotonic media. *J Membrane Biol* 1992; 126: 219–234.
4. Bortner C.D., Hughes F.M., Cidowski J.A. A primary role for K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> efflux in the activation of apoptosis. *J Biol Chem* 1997; 272 (51): 32436–32442.
5. Comizzoli P., Wildt D.E., Pukazhenthil B.S. Impact of anisotonic conditions on structural and functional integrity of cumulus-oocyte complexes at the germinal vesicle stage in the domestic cat. *Mol Reprod Dev* 2008; 75(2): 345–354.
6. Demeestere I., Simon P., Buxant F. et al. Ovarian function and spontaneous pregnancy after combined heterotopic and orthotopic cryopreserved ovarian tissue transplantation in a patient previously treated with bone marrow transplantation: case report. *Hum Reprod* 2006; 21: 2010–2014.
7. Demeestere I., Simon P., Emiliani S. et al. Options to preserve fertility before oncological treatment: cryopreservation of ovarian tissue and its clinical application. *Acta Clin Belg* 2006; 61(5): 259–263.
8. Demeestere I., Simon P., Emiliani S. et al. Orthotopic and heterotopic ovarian tissue transplantation. *Hum Reprod Update* 2009; 15(6): 649–665.
9. Eyden B., Radford J., Shalet S.M. et al. Ultrastructural preservation of ovarian cortical tissue cryopreserved in dimethylsulfoxide for subsequent transplantation into young female cancer patients. *Ultrastruct Pathol* 2004; 28: 239–245.
10. Gougeon A. Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results. *Hum Reprod* 1986; 1(2): 81–87.
11. Haussinger D. The role of cellular hydration in the regulation of cell function. *Biochem J* 1996; 313: 697–710.

- ovarian tissue and its clinical application // *Acta. Clin. Belg.* – 2006. – Vol. 61, №5. – P. 259–263.
8. Demeestere I., Simon P., Emiliani S. et al. Orthotopic and heterotopic ovarian tissue transplantation // *Hum. Reprod. Update.* – 2009. – Vol. 15, №6. – P. 649–665.
  9. Eyden B., Radford J., Shalet S.M. et al. Ultrastructural preservation of ovarian cortical tissue cryopreserved in dimethylsulfoxide for subsequent transplantation into young female cancer patients // *Ultrastruct. Pathol.* – 2004. – Vol. 28. – P. 239–245.
  10. Gougeon A. Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results // *Hum. Reprod.* – 1986. – Vol. 1, №2. – P. 81–87.
  11. Haussinger D. The role of cellular hydration in the regulation of cell function // *Biochem. J.* – 1996. – Vol. 313. – P. 697–710.
  12. Lang F. Mechanisms and significance of cell volume regulation // *J. Am. Coll. Nutr.* – 2007. – Vol. 26, №5. – P. 613–623.
  13. Liu J., Mullen S., Meng Q. et al. Determination of oocyte membrane permeability coefficients and their application to cryopreservation in a rabbit model *Cryobiology.* – 2009. – Vol. 59, №2. – P. 127–134.
  14. Le Gal F., Gasqui P., Renard J.P. Differential osmotic behavior of mammalian oocytes before and after maturation: a quantitative analysis using goat oocytes as a model // *Cryobiology.* – 1994. – Vol. 31. – P. 154–170.
  15. Newton H., Pegg D.E., Barrass R., Gosden R.G. Osmotically inactive volume, hydraulic conductivity, and permeability to dimethyl sulphoxide of human mature oocytes // *J. Reprod. Fertil.* – 1999. – Vol. 117. – P. 27–33.
  16. Okada Y., Maeno E., Shimizu T. et al. Receptor-mediated control of regulatory volume decrease (RVD) and apoptotic volume decrease (AVD) // *J. Physiol.* – 2001. – Vol. 532, №1. – P. 3–16.
  17. Paynter S.J., Cooper A., Fuller B.J., Shaw R.W. Cryopreservation of bovine ovarian tissue: structural normality of follicles after thawing and culture in Vitro // *Cryobiology.* – 1999. – Vol. 38. – P. 301–309.
  18. Paynter S.J., Fuller B.J., Shaw R.W. Temperature dependence of Kedem-Katchalsky membrane transport coefficients for mature mouse oocytes in the presence of ethylene glycol // *Cryobiology.* – 1999. – Vol. 39. – P. 169–176.
  19. Santos R.R., Hurk R., Rodrigues A.P.R. et al. Effect of cryopreservation on viability, activation and growth of in situ and isolated ovine early-stage follicles // *Animal Reprod. Sci.* – 2007. – Vol. 99. – P. 53–64.
  20. Songsasen N., Ratterree M.S., VandeVoort C.A. et al. Permeability characteristics and osmotic sensitivity of Rhesus monkey (*Macaca mulatta*) oocytes // *Hum. Reprod.* – 2002. – Vol. 17, №7. – P. 1875–1884.
  21. Wang L., Liu J., Zhou G.-B. et al. Quantitative investigations on the effects of exposure durations to the combined cryoprotective agents on mouse oocyte vitrification procedures // *Biol. Reprod.* – 2011. – Vol. 85. – P. 884–894.
  12. Lang F. Mechanisms and significance of cell volume regulation. *J Am Coll Nutr* 2007; 26(5): 613–623.
  13. Liu J., Mullen S., Meng Q. et al. Determination of oocyte membrane permeability coefficients and their application to cryopreservation in a rabbit model. *Cryobiology* 2009; 59(2): 127–134.
  14. Le Gal F., Gasqui P., Renard J.P. Differential osmotic behavior of mammalian oocytes before and after maturation: a quantitative analysis using goat oocytes as a model. *Cryobiology* 1994; 31: 154–170.
  15. Newton H., Pegg D.E., Barrass R., Gosden R.G. Osmotically inactive volume, hydraulic conductivity, and permeability to dimethyl sulphoxide of human mature oocytes. *J Reprod Fertil* 1999; 117: 27–33.
  16. Okada Y., Maeno E., Shimizu T. et al. Receptor-mediated control of regulatory volume decrease (RVD) and apoptotic volume decrease (AVD). *J Physiol* 2001; 532(1): 3–16.
  17. Paynter S.J., Cooper A., Fuller B.J., Shaw R.W. Cryopreservation of bovine ovarian tissue: structural normality of follicles after thawing and culture in vitro. *Cryobiology* 1999; 38: 301–309.
  18. Paynter S. J., Fuller B. J. Shaw R. W. Temperature dependence of Kedem-Katchalsky membrane transport coefficients for mature mouse oocytes in the presence of ethylene glycol. *Cryobiology* 1999; 39: 169–176.
  19. Santos R.R., Hurk R., Rodrigues A.P.R. et al. Effect of cryopreservation on viability, activation and growth of in situ and isolated ovine early-stage follicles. *Animal Reprod Sci* 2007; 99: 53–64.
  20. Songsasen N., Ratterree M.S., VandeVoort C.A. et al. Permeability characteristics and osmotic sensitivity of Rhesus monkey (*Macaca mulatta*) oocytes. *Hum Reprod* 2002; 17(7): 1875–1884.
  21. Wang L., Liu J., Zhou G.-B. et al. Quantitative investigations on the effects of exposure durations to the combined cryoprotective agents on mouse oocyte vitrification procedures. *Biol Reprod* 2011; 85: 884–894.

