

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ ОВАРИАЛЬНЫХ
ФОЛЛИКУЛОВ ОВЕЦ ПОСЛЕ ВИТРИФИКАЦИИ С ДИМЕТИЛСУЛЬФОКСИДОМ И
ПРОПАНДИОЛОМ

Аннотация Криоконсервация овариальной ткани является альтернативным методом сохранения генетического материала животных. В данном исследовании мы сравнили жизнеспособность овариальных фолликулов витрифицированной ткани яичника овец с 4,5М диметилсульфоксидом (DMSO) и 5М пропандиолом (PROH). После гистологического анализа процент морфологически нормальных фолликулов криосохраненной ткани составил: с 1,5 М DMSO – примордиальных - 39,8%; первичных - 30,4 % и вторичных - 19,6 %; 1,5М PROH - 48,8%; 37,1% и 24,9%, а в контрольной группе - 95,8%; 92,9 % и 89,6%, соответственно. Таким образом, установлено, что использование 5М PROH оказывает более эффективное действие на жизнеспособность овариальных фолликулов при витрификации, чем использование 4,5М DMSO.

Ключевые слова: витрификация, диметилсульфоксид, овариальная ткань, пропандиол, фолликул.

Введение Генетические ресурсы животных представляют ценный и стратегически важный капитал любой страны, так как они связаны с решением проблемы обеспечения населения страны продовольствием, промышленности – сырьем. Для решения данной проблемы в развитых странах мира проводятся интенсивные научные исследования по сохранению и рациональному использованию как культурных, созданных на основе искусственного отбора и подбора пород домашних животных, так и аборигенных пород и популяций животных, сформировавшихся в течение многих столетий на базе естественного отбора и народной селекции.

Сохранить генетический материал и репродуктивный потенциал можно не только за счет выделения и сохранения отдельных яйцеклеток и получаемых из них эмбрионов, но и путем криоконсервации самой функциональной (кортикальной) ткани яичника, технология которой так же включает методы медленного замораживания [1,2,3] и витрификации [4,5,6,7]. Медленное замораживание остается наиболее широко используемым методом в клинике. Более низкие концентрации криопротектантов используются в составе крипротекторов для медленного замораживания, что снижает риск токсического и осмотического повреждения клеток, но следует учитывать, что это не предотвращает образование кристаллов льда, которое приводит к уменьшению выживаемости клеток во время замораживания [8]. Витрификация считается относительно новым методом замораживания, о нем были опубликованы статьи как об эффективном альтернативном методе для криосохранения тканей яичников различных видов, в том числе мыши [9,10], крысы [11], свиньи [12], козы [13], овец [14, 15], обезьяны [16] и человека [17, 18]. Данный метод сочетает в себе быструю скорость замораживания и большую концентрацию криопротектантов в составе витрификационных растворов, которые быстро обезвоживают клетки при этом, предотвращая образование кристаллов льда [8].

С точки зрения криобиологии задача ученых состоит в повышении выживаемости овариальной ткани после криоконсервации. В связи с этим, целью нашего исследования является изучение влияния различных криопротекторов: 4,5М диметилсульфоксида (ДМСО) и 5 М пропандиола (PROH) на выживаемость тканей яичников при витрификации.

Материалы и методы Реагенты. Все реагенты, использованные в данном исследовании были куплены от Sigma-Aldrich (Германия).

Коллекция кортикальной ткани 30 яичников 2,5 годовалых овец аборигенной Чуйской популяции были взяты путем забоя животных, транспортировались в лабораторию при 37°C в фосфатно-солевом буфере Дюльбекко (DPBS). Яичники освободили от связок и промыли несколько раз в PBS с антибиотиками (пенициллина, стрептомицин). После снятия макроскопических данных удаляли мозговую часть яичника, а кортикальную часть разделили на мелкие кусочки с размером 0,5x0,5x1 см.

Экспериментальный план Полученные кусочки овариальной ткани поделили на три главные экспериментальные группы: группа I, криопротектор 4,5М диметилсульфоксид (ДМСО) и группа II, криопротектор 5М пропандиол (ПРОН); группа III, контрольная, не подвергалась воздействию криопротекторов и не витрифицировалась;

Витрификация и нагревание овариальной ткани

Яичники были витрифицированы по методу Lane et al. (1999). Образцы эквilibрировали в следующих витрификационных растворах:

Группа I - 1,125 М и 2,25 М DMSO на фосфатно-солевом буфере Дюльбекко образцы эквilibрировали по 10 минут, затем в витрификационном растворе (VS) – 4,5 М DMSO на фосфатно-солевом буфере Дюльбекко в течение 5 мин;

Группа II - 1,25 М и 2,5 М ПРОН на фосфатно-солевом буфере Дюльбекко по 10 минут; затем в витрификационном растворе (VS) – 5,0 М ПРОН на фосфатно-солевом буфере Дюльбекко в течение 5 мин. После этого образцы из криозащитной среды переносили в соломинку (straws, IMV technologies емкостью 0,5 см³). Соломинки заполняли в соответствии с требованиями IETS. Свободный конец соломинки запаивали и затем погружали в жидкий азот и хранили в сосудах Дьюара в течение одной недели. Для размораживания, витрифицированные образцы в соломинках 5 сек. держали в атмосферном воздухе при комнатной температуре, затем помещали на 25°C водяную баню. Для удаления криопротекторов проводили обратную эквilibрацию в растворах с понижающейся концентрацией криопротектора с добавлением сахарозы (Sigma, USA).

Гистологическая обработка Свежие и витрифицированные образцы овариальной ткани фиксировали в 10% формалине в течение 24 часов, дегидратировали и заключали в парафиновые блоки. С каждого образца делали серийные срезы толщиной 5 мкм, окрашивали гематоксилин-эозином и по Ван Гизону по стандартной методике. Исследование полутонких и гистологических препаратов осуществляли с помощью светового микроскопа при увеличениях объектива x20 и x40. Микрофотосъемку осуществляли с помощью микроскопа Zeiss Axiostar plus, «Видеотест морфология». Осуществляли анализ гистологических срезов, изучая только фолликулы с видимым ядром для исключения повторного счета одного и того же фолликула в анализируемом срезе. Количество нормальных и дегенеративных фолликулов выражали в процентах по отношению к общему числу фолликулов в образцах.

Результаты исследований В ходе морфологического исследования изучалась морфология примордиальных, первичных и вторичных фолликулов в овариальной ткани и была проведена морфологическая оценка их качества. Микроскопический анализ окрашенных гематоксилин эозином и Ван Гизоном препаратов свежей ткани показали неповрежденную морфологию примордиальных и первичных фолликулов с плотным контактом между ооцитом и окружающими гранулезными клетками, а также между соседними гранулезными клетками (Рис. 1а и b). Большинство вторичных фолликулов свежей ткани показали ооциты с агранулярной цитоплазмой и центрально расположенным ядром окруженной несколькими слоями гранулезных клеток и хорошо организованным текальным слоем. В ооцитах фолликулов наблюдалось однородное распределение цитоплазмы (Рис. 1с).

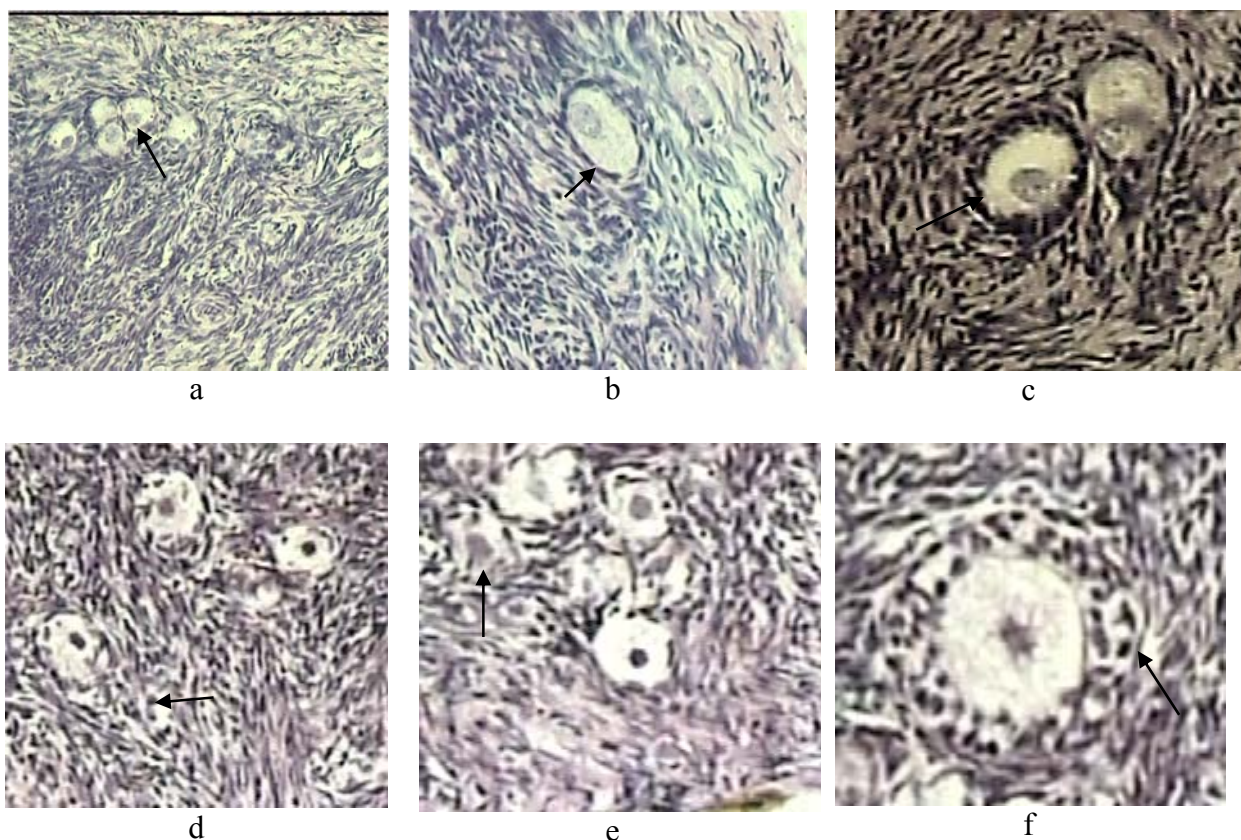


Рис 1. Представленные микрофотографии фиксированной овариальной ткани: свежие (a, b, c) и витрифицированные ткани (d, e, f). Свежая овариальная ткань показала примордиальные (a), первичные (b), вторичные (c), фолликулы со здоровым ооцитом и плотным компактным слоем гранулезных клеток. После витрификации морфология гранулезных клеток различного класса фолликулов главным образом были сохранены (d-f); однако, нечасто, повреждение включало сморщенных (d, стрелка) или вакуолизированных ооцитов (e, стрелка), а также наблюдалось неправильное пространство между фолликулами и стромой (f, стрелка). Увеличение x20, x40.

Морфологический анализ сохранности примордиальных и первичных фолликулов во фрагментах овариальной ткани витрифицированных двух групп показали некоторые повреждения. Были обнаружены сморщенные (Рис. 1. d, e, g, h) и вакуолизированные ооциты, а также неправильное пространство между фолликулами и стромой (Рис. 1f, стрелка). Во всех группах свежей и витрифицированной ткани с использованием различных криопротекторов белочная оболочка ткани была плотной и компактной стромой.

Таблица 1 - Относительное количество (%) морфологически нормальных фолликулов в овариальной ткани яичников овец после замораживания и оттаивания при использовании различных криопротекторов.

Криопротектор/ Режим замораживания	Примордиальные	Первичные	Вторичные
4,5M DMSO/ VITRIFICATION	41,3 ± 3,9 ^a	32,9 ± 2,5 ^a	20,7 ± 3,9
5M PROH / VITRIFICATION	49,4 ± 2,3 ^a	36,7 ± 3,3 ^a	25,3 ± 4,1
Контроль	98,2 ± 1,1	93,7 ± 1,7	90,3 ± 1,9
Примечание - ab $P < 0.01$			

Сопоставляя данные, представленные в таблице 1, следует отметить, что количество морфологически нормальных примордиальных фолликулов в двух группах 4,5М DMSO $41,3 \pm 3,9^a$ и 5М PRON $49,4 \pm 2,3^a$ витрифицированной овариальной ткани выше по сравнению первичными $32,9 \pm 2,5^a$, $36,7 \pm 3,3^a$ и вторичными $20,7 \pm 3,9$, $25,3 \pm 4,1$ фолликулами. Данный факт, по всей видимости, можно объяснить тем, что примордиальные фолликулы имеют небольшие размеры, клеточную стадию деления (профаза 1-го мейотического деления), низкую метоболическую активность, отсутствие zona pellucida, монослой клеток гранулезы. Это, очевидно и определяет устойчивость популяции данных клеток к действию криоповреждения.

Заключение Проведенные исследования показали, что процентное соотношение морфологически нормальных фолликулов в витрифицированной группе с использованием 5М PRON было выше, чем 4,5 DMSO. Криоконсервация овариальной ткани позволяет сохранить примордиальные и первичные фолликулы содержащимися в них незрелых ооцитов (примордиальные и первичные фолликулы). Для оплодотворения такие фолликулы должны пройти стадию созревания *in vivo* или *in vitro*. Поэтому в будущем не исключается возможность использования метода *in vitro* культивирования овариальных фолликулов из криоконсервированных фрагментов ткани яичника для всестороннего исследования размороженных образцов.

Литература

1. Hovatta O. Methods for cryopreservation of human ovarian tissue//Reproductive Biomedicine. 2005. - Online Vol.10.-P. 729–734.
2. Isachenko V, Isachenko E, Reinsberg J, Montag M, van der Ven K, Dorn C, Roesing B & van der Ven H. Cryopreservation of human ovarian tissue: comparison of rapid and conventional freezing// Cryobiology. – 2007. – Vol. 55.- P. 261–268.
3. Jin S, Lei L, Shea LD, Zelinski MB, Stouffer RL & Woodruff TK. Markers of growth and development in primate primordial follicles are preserved after slow cryopreservation // Fertility and Sterility. - 2010. – Vol. 93.- P. 2627–2632.
4. Li YB, Zhou CQ, Yang GF, Wang Q & Dong Y. Modified vitrification method for cryopreservation of human ovarian tissues//Chinese Medical Journal. –2007.- Vol.120.-P. 110–114.
5. Huang L., Mo Y., Wang W., Li Y., Zhang Q. & Yang D. Cryopreservation of human ovarian tissue by solid-surface vitrification// European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology. – 2008. – Vol.139. – P.193–198.
6. Быстрова О.В., Калугина Ф.С., Цыбатова Е.В. Способы восстановления фертильности у онкобольных // Практическая онкология. 2009. Т.10. № 4. С. 245–253.
7. Huang I., Mo Y., Wang W. et al. Criopreservation of human ovarian tissue by solid-surface vitrification //Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2008. V. 139. № 2. Pp. 193–198.
8. Vajta G. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification Reproductive Biomedicine. -2006. -Online Vol.12. –P.779–796.
9. Wang X, Catt S, Pangestu M & Temple-Smith P. Live offspring from vitrified blastocysts derived from fresh and cryopreserved ovarian tissue grafts of adult mice//Reproduction.- 2009.- Vol.138.- P.527–535.
10. Fatehi R., Ebrahimi B., Shahhosseini M., Farrokhi A., Fathi R. Effect ovarian tissue vitrification method on mice preantral follicular development and gene expression//Theriogenology 81. –2014.- P.302–308.
11. Deng X., Zheng H., Yu X., Yu H., Zhang C., Chao L., Li R. & Liu W. Cryopreserved ovarian tissues can maintain a long-term function after heterotopic autotransplantation in rat// Reproduction.- 2009.- Vol.138.- P.519–525.
12. Gandolfi F., Paffoni A., Papasso Brambilla E., Bonetti S., Brevini TAL & Ragni G. Efficiency of equilibrium cooling and vitrification procedures for the cryopreservation of ovarian

tissue: comparative analysis between human and animal models// Fertility and Sterility. – 2006. – Vol.85.- P.1150–1156.

13. Santos R.R., Tharasanit T., Van Haeften T., Figueiredo J.R., Silva J.R. & Van den Hurk R. Vitrification of goat preantral follicles enclosed in ovarian tissue by using conventional and solid-surface vitrification methods//Cell and Tissue Research. – 2007. - Vol.327. – P.167–176.

14. Al-aghbari A.M. & Menino A.R. Survival of oocytes recovered from vitrified sheep ovarian tissues//Animal Reproduction Science. – 2002. – Vol. 71.- P.101–110.

15. Courbiere B., Odagescu V., Baudot A., Massardier J., Mazoyer C., Salle B. & Lornage J. Cryopreservation of the ovary by vitrification as an alternative to slow-cooling protocols// Fertility and Sterility. – 2006. - Vol.86.- P.1243–1251.

16. Ting A.Y., Yeoman R.R., Campos J.R. & Zelinski M.B. Morphological and functional preservation of pre-antral follicles after vitrification of macaque ovarian tissue in a closed system //Hum.reprod. – 2013.- Vol.0.- P.1–13.

17. Keros V., Xella S., Hultenby K., Pettersson K., Sheikhi M., Volpe A., Hreinsson J. & Hovatta O. Vitrification versus controlled-rate freezing in cryopreservation of human ovarian tissue// Human Reproduction. – 2009.- Vol.24.- P. 1670–1683.

18. Zhou XH., Wu YJ., Shi J., Xia Y.X. & Zheng S.S. Cryopreservation of human ovarian tissue: comparison of novel direct cover vitrification and conventional vitrification//Cryobiology. – 2010. – Vol.60. – P.101–105.

Сейсенбаева А.С., Тойшибеков Е.М.

ДИМЕТИЛЬСУЛФОКСИД ПЕН ПРОПАНДИОЛ АРҚЫЛЫ ВИТРИФИКАЦИЯЛАНҒАН ҚОЙЛАРДЫҢ ОВАРИАЛЬДІ Фолликулаларының Өміршеңдігін салыстырмалы зерттеу

Овариальді ұлпаны криоконсервациялау жануарлардың генетикалық материалын сақтаудың альтернативті жолы болып табылады. Көрсетілген зерттеу жұмысында біз қойдың 4,5М диметилсульфоксид (DMSO) пен 5М пропандиолды қолдану арқылы (PROH) витрификацияланған аналық без ұлпасындағы овариальді фолликулдарың өміршеңдігін салыстырдық. Гистологиялық талдаудан кейін криосакталған ұлпадағы морфологиялық қалыпты фолликулдар өміршеңдігі келесідей болды: 1,5М DMSO - примордиальді - 39,8%; біріншілік - 30,4 % және екіншілік - 19,6 %; 1,5М PROH - 48,8%; 37,1% және 24,9%, ал бақылау тобында - 95,8%; 92,9 % және 89,6%. Алынған мәліметтерге сүйенсек витрификациялауға криопротектор ретінде 5М PROH қолдану 4,5М DMSO қарағанда овариальді фолликулдар өміршеңдігіне эффективті әсер етеді.

Кілт сөздер: витрификация, диметилсульфоксид, овариальді ұлпа, пропандиол, фолликул.

Seisenbayeva A.S., Toishibekov Y.M.

COMPARATIVE STUDYING OF VIABILITY OF SHEEP'S OVARIAN FOLLICLES AFTER VITRIFICATION WITH DIMETHYL SULFOXIDE AND PROPANEDIOL

The cryopreservation of ovarian follicles is an alternative method of animals' genetic material preservation. In the present study, we compared viability the ovarian follicles of sheep's vitrified ovarian tissue with 4,5M dimethyl sulfoxide (DMSO) and 5M propanediol (PROH). After vitrification-warming, the viability of ovarian follicles was evaluated by histological analysis. The percent of morphologically normal follicles after cryopreservation was: with 1,5M DMSO - the primordial - 39,8%; primary - 30,4% and secondary - 19,6%; with 1,5M PROH - 48,8%; 37,1% and 24,9%, in the control group - 95,8%; 92,9% and 89,6%, respectively. The obtained data testify that use 5M of a PROH as a cryoprotectant has more effective effect on viability of ovarian follicles at a vitrification, than use 4,5M DMSO.

Keywords: vitrification, dimethyl sulfoxide, ovarian tissue, propanediol.