

## Оптимизация режима насыщения-отмывания овариальной ткани растворами проникающих криопротекторов

И.А. Трутаева, В.В. Киروشка, Ю.О. Божкова, Т.П. Бондаренко  
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

## Optimization of Ovarian Tissue Saturation with and Washing of Penetrating Cryoprotectants Solutions

I.A. Trutaeva, V.V. Kiroshka, Yu.O. Bozhkova, T.P. Bondarenko  
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine  
of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

В настоящее время одной из задач для повышения эффективности протокола криоконсервирования овариальной ткани является снижение осмотического повреждения различных типов клеток в структуре ткани при насыщении-отмывании гиперосмолярными растворами проникающих криопротекторов (КП).

Цель работы – исследование сохранности морфологической структуры овариальной ткани и характера объемных изменений ооцитов при многоэтапном насыщении-отмывании растворами проникающих КП в зависимости от композиционного состава среды инкубации.

В работе были использованы фрагменты овариальной ткани. В качестве КП применяли 1,2-ПД и ДМСО. Насыщение ткани КП проводили с помощью сред: 1 – ДМЕМ; 2 – ДМЕМ, 10% ЭТС; 3 – ДМЕМ, 200 мМ сахарозы. Криопротекторы добавляли поэтапно (10% → 20%) при 22°C. Время инкубации составляло 30 мин на каждом этапе. Для удаления КП использовали два режима: 1 – ДМЕМ, 250 мМ сахарозы, 10% КП → ДМЕМ, 250 мМ сахарозы → ДМЕМ; 2 – ДМЕМ+500 мМ маннита, 10% КП → ДМЕМ + 500 мМ маннита → ДМЕМ + 250 мМ маннита. Время инкубации составляло 10 мин на каждом этапе (22°C).

Динамика морфологических трансформаций овариальной ткани и объемные изменения ооцитов определялись композиционным составом среды насыщения и типом используемого КП. Так, при насыщении ткани КП средами 2 и 3 наблюдалась аккумуляция жидкости в строме овариальной ткани, тогда как при использовании среды 1 в структуре ткани сохранялись плотные межклеточные контакты. При этом насыщение ткани 1,2-ПД приводило к значимому увеличению объема ооцитов в среде 2 относительно контроля и его уменьшению в среде 3. При использовании ДМСО объемные изменения ооцитов не имели значимых отличий в зависимости от состава среды насыщения, что обусловлено более высоким коэффициентом проницаемости этого КП. Следует отметить, что уровень сохранности фолликулов после удаления КП был сопоставим при обоих исследуемых режимах и определялся композиционным составом среды насыщения. Максимальная сохранность фолликулов после удаления КП была выявлена при использовании для насыщения среды 3. После чего была проведена инкубация ткани в физиологических условиях. При этом восстановление морфологической целостности ткани наблюдалось в случае использования режима 2 для удаления 1,2-ПД и ДМСО и режима 1 для ДМСО.

Таким образом, использование среды ДМЕМ, содержащей 200 мМ сахарозы, для насыщения овариальной ткани КП и многоступенчатого режима отмывки раствором маннитола приводит к максимальной сохранности ее морфологической структуры.

Currently, one of the tasks to improve the protocol for ovarian tissue cryopreservation is the reduction of the osmotic damage of different types of cells of the tissue when adding and removing hyperosmolar solutions of penetrating cryoprotectants (CP).

The research aim was to examine the preservation of ovarian tissue morphological structure and the character of volumetric changes of oocyte during multistage adding/removing of penetrating CP solutions depending on the composition of incubation medium.

The ovarian tissue fragments were used in the research. As the CP we used 1,2-PD and DMSO. Tissue was saturated by the following media: 1 – DMEM; 2 – DMEM, 10% FBS; 3 – DMEM, 200 mM sucrose. CPs were added step-by-step (10% → 20%) at 22°C. The incubation time was 30 minutes at each step. Two procedures of removing the CP were tested: 1) DMEM, 250 mM sucrose, 10% CP → DMEM, 250 mM sucrose → DMEM; 2) DMEM + 500 mM mannitol + 10% CP → DMEM + 500 mM mannitol → DMEM + 250 mM mannitol. The incubation time was 10 min at each stage, 22°C.

It was shown that the dynamics of morphological transformation of ovarian tissue depended on the composition of saturation medium and the type of used CP. In particular, in case of using the media 2 and 3 to saturate the tissue we observed accumulation of fluid in the ovarian tissue stroma, whereas the application of the medium 1 resulted in preservation of tight intercellular contact between stromal elements in the tissue structure. Saturation of tissue by 1,2-PD resulted in a significant increase of oocyte volume in a medium 2 comparing to the control and its reduction in the medium 3. Using DMSO did not result in significant volumetric changes in oocytes depending on the composition of the saturation medium, likely due to the higher permeability coefficient of this CP. It should be noted that the level of follicles integrity after CP removal was similar after both procedures, and was determined only by the composition of the saturation medium. Maximum follicles integrity after removing the CP was found in the case of saturation medium 3. The removal of CPs was followed by incubation of the tissue in physiological conditions. The recovery of tissue morphological structure was observed in the case of procedure 2 for 1,2-PD and DMSO removal and for DMSO in case of procedure 1.

Thus, using DMEM medium with 200 mM sucrose for the procedure of ovarian tissue saturation by CPs and multistep washing procedures using mannitol solution results in the maximum preservation of tissue morphological structure.

