

Рост и развитие трансплантатов овариальной ткани после применения различных протоколов замораживания-отогрева

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

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Growth and Development of Ovarian Tissue Grafts After Applying Various Freeze-Thawing Protocols

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

На сегодняшний день показано успешное применение криоконсервированной овариальной ткани для восстановления репродуктивной функции у женщин после курсов химио- и радиотерапии. Однако эффективность данного метода остается низкой, что связано со сложностью сохранения архитектоники ткани яичников в процессе замораживания-отогрева.

Цель работы – исследование роста и развития криоконсервированных трансплантатов овариальной ткани в зависимости от используемых режимов замораживания-отогрева.

Объектом исследования служили фрагменты овариальной ткани. В качестве криопротекторов (КП) использовали 1,2-пропандиол (1,2-ПД) и диметилсульфоксид (ДМСО) в концентрации 3 М. Ткань инкубировали при 22°C в течение 30 мин в растворе КП на основе среды ДМЕМ, дополненной 200 мМ сахарозы. Замораживание ткани яичника осуществляли по следующему режимам: 1 – от 22 до –40°C со скоростью охлаждения 1 град/мин с последующим погружением в жидкий азот; 2 – от 22°C до температуры инициации кристаллообразования (ИК) со скоростью 2 град/мин, затем проводилась ИК с последующим охлаждением до –40°C со скоростью 2 град/мин, далее погружали в жидкий азот. Замороженные образцы хранились при –196°C в течение 6–12 месяцев. Отогрев осуществляли на водяной бане при 37°C. Удаление КП проводили поэтапно с заменой среды криоконсервирования на ДМЕМ, содержащую маннит. Состояние овариальной ткани после криоконсервирования при исследуемых режимах изучали после гетеротопической трансплантации под капсулу левой почки.

На 30-е сутки наблюдения установлено, что развитие трансплантатов овариальной ткани после криоконсервирования зависело от используемого КП и режима замораживания-отогрева. Максимальное количество фолликулов разной степени зрелости и желтых тел было отмечено после использования режима 1 в случае 3 М 1,2-ПД и режима 2 при применении 3 М ДМСО. При этом фолликулярная плотность (количество фолликулов на 1 мм³) в этих группах составляла 45,75 ± 7,9 (режим 1 – 3 М 1,2-ПД) и 38,16 ± 8,6 (режим 2 – 3 М ДМСО). Следует отметить, что после криоконсервирования овариальной ткани под защитой 3 М 1,2-ПД и замораживания согласно режиму 1 значение фолликулярной плотности было сравнимо с контрольным (53,2 ± 9,3).

Таким образом, восстановление фолликулогенеза в криоконсервированных трансплантатах овариальной ткани зависит от режима замораживания и типа КП.

To date, the successful application of cryopreserved ovarian tissue has been shown to restore reproductive function in women after chemo- and radiotherapy. However, the efficiency of this method has remained low due to complexities in preserving ovarian tissue architecture during freeze-thawing.

The research aim was to investigate the growth and development of cryopreserved ovarian tissue grafts, depending on the applied freeze-thawing regimens.

The research objects were the fragments of ovarian tissue. We used 1,2-propanediol (PROH) and dimethyl sulfoxide (DMSO) at 3 M concentration as cryoprotectants (CPA). The tissue was incubated at 22°C for 30 min in the DMEM-based CPA solution supplemented with 200 mM sucrose. Ovarian tissue was frozen according to the following regimens: regimen 1 – from 22 down to –40°C with 1 deg/min rate with following immersion into liquid nitrogen; regimen 2 – from 22°C down to the temperature of initiated crystallization (IC) with 2 deg/min rate. Then the IC was carried out and the samples were cooled down to –40°C with 2 deg/min rate with subsequent immersion into liquid nitrogen. Frozen samples were stored at –196°C for 6–12 months. Thawing was performed in a water bath at 37°C. The CPA was removed stepwise by replacing the cryopreservation medium for mannitol-supplemented DMEM. The state of ovarian tissue after cryopreservation according to the studied regimens was investigated after heterotopic transplantation under the left renal capsule.

To day 30 of observation we have established that the growth and development of ovarian tissue grafts after cryopreservation depended on the used CPA and freeze-thawing regimen. The maximum number of follicles with different maturity and *corpora lutea* was noted after using the regimen 1 with 3 M PROH application and regimen 2 with 3 M DMSO. The follicular density (a number of follicles per 1 mm³) in these groups was hereat 45.75 ± 7.9 (regimen 1: 3 M PROH) and 38.16 ± 8.6 (regimen 2: 3 M DMSO). It should be noted that when the ovarian tissue was cryopreserved with 3 M PROH and frozen according to the regimen 1, the follicular density value was comparable with the control (53.2 ± 9.3).

Thus, the folliculogenesis recovery in cryopreserved ovarian tissue grafts depends on freezing regimen and the type of CPA.

