

••• КРІОБІОЛОГІЯ ••• CRYOBIOLOGY •••

УДК: 611.651.15.085.25:57.043

Влияние композиционного состава среды инкубации на уровень жизнеспособности фолликулов при гипотермическом хранении Е.А.Мединец, В.В.Кірошка, Ю.О.Тіщенко, Т.П.Бондаренко

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (Харьков, Украина)
medynets.k@gmail.com*

В работе исследована жизнеспособность фолликулов овариальной ткани при гипотермическом хранении в средах различного композиционного состава. Установлено, что максимальную устойчивость клетки проявляют при использовании в качестве инкубационного раствора маннитолсодержащей среды. Введение 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) во все исследуемые растворы приводит к повышению жизнеспособности фолликулов на 10–15 %.

Ключевые слова: гипотермическое хранение, жизнеспособность, овариальная ткань, электролит, неэлектролит.

Вплив композиційного складу середовища інкубації на рівень життєздатності фолікулів при гіпотермічному зберіганні К.О.Мединець, В.В.Кірошка, Ю.О.Тіщенко, Т.П.Бондаренко

У роботі досліджена життєздатність фолікулів овариальної тканини при гіпотермічному зберіганні в середовищах різного композиційного складу. Максимальна стійкість клітин виявляється при використанні в якості інкубаційного розчину манітольмісного середовища. Введення 10% ембріональної телячої сироватки (ЕТС) у всі досліджувані розчини призводить до підвищення життєздатності фолікулів на 10–15 %.

Ключові слова: гіпотермічне зберігання, життєздатність, овариальна тканина, електроліт, неелектроліт.

Influence of incubation medium composition on the level of follicles viability at hypothermic storage

K.A.Medynets, V.V.Kiroshka, Yu.O.Tischenko, T.P.Bondarenko

Viability of ovarian tissue follicles after hypothermic storage in media of different composition has been studied. Maximal resistance of cells has been revealed when we used mannitol containing solution as the incubation medium. Addition of 10% fetal bovine serum (FBS) in all solutions increases follicles viability for 10–15 %.

Key words: hypothermic storage, viability, ovarian tissue, electrolyte, nonelectrolyte.

Введение

Известно, что функциональной единицей овариальной ткани является фолликул, состоящий из нескольких типов соматических клеток (клеток гранулезы и теки), а также половой клетки – ооцита. При созревании ооцита происходят изменения морфологии и физиологии не только ооцита, но и окружающих его соматических клеток, которые включают в себя архитектурную перестройку структуры межклеточных контактов, выброс цитокинов, изменение морфологии и физиологии мембраны. Все перечисленные выше факторы могут быть вовлечены в систему регуляции объема фолликулов в процессе гипотермического хранения (ГХ), которая и будет определять их жизнеспособность, состояние плазматической мембраны и метаболическую активность после ГХ.

Яичники млекопитающих содержат тысячи яйцеклеток, заключенных в преантральные фолликулы и они представляют 90% фолликулярной популяции. Однако большинство преантральных фолликулов становятся атретическими в процессе их развития. Несколько исследований показали, что для предотвращения фолликулярной атрезии можно выделять большое количество

преантральных фолликулов и развивать эти фолликулы *in vitro*. В связи с тем, что время забора ткани яичника до культивирования *in vitro* может быть очень долгим, особенно когда донор находится далеко от репродуктивной лаборатории, сохранение жизнеспособности ооцитов, заключенных в преантральные фолликулы, является критическим вопросом, поскольку клетки находятся под воздействием ишемии. В последние годы одним из методов, позволяющим повысить сохранность овариальной ткани при транспортировке в специализированные клиники, является гипотермическое хранение.

Гипотермическое хранение представляет собой вариант воздействия, в котором главным фактором, оказывающим влияние на состояние клетки, является временной, т.е. период экспонирования их в условиях, существенно отличающихся от физиологической нормы. Особенность гипотермического хранения заключается в том, что в этих условиях сохраняется жидкая фаза, обеспечивающая протекание в клетках комплекса процессов перераспределения ионов и метаболитов, обеспечивающих поддержание клеточного гомеостаза. Сами по себе эти процессы в ограниченный период времени не могут оказать влияние на состояние клетки. Однако суммирование во времени незначительных изменений способно привести к качественной трансформации состояния клетки, основа которой в значительной степени может определяться собственно клеточными механизмами.

Экспериментально доказано (Rauen, Groot, 2004), что в процессе ГХ происходят изменения поверхностного заряда мембраны клетки, ионного гомеостаза и структурной стабильности клеток. В многочисленных работах, проведенных на эритроцитах, лимфоцитах, изолированных гепатоцитах, эндотелиальных клетках, показано (Hyon, Kim, 2001; Puehler et al., 2010; Wulhfard et al., 2008; Yang, Nonamotoo, 2010), что сохранность клеток в условиях ГХ обеспечивается композиционным составом среды эквивалентности. Однако в современной литературе отсутствуют данные о влиянии таких физико-химических факторов внешней среды, как ионный состав и температура, на жизнеспособность фолликулов.

Цель данной работы – исследовать жизнеспособность фолликулов при ГХ в средах различного композиционного состава.

Методика

Объект исследования – изолированные фолликулы неонатальной и половозрелой овариальной ткани. Эксперименты проводили на половозрелых 3-месячных самках крыс весом 165–215 г и новорожденных крысах (10-ти суток постнатального развития), содержащихся в стандартных условиях вивария ИПКиК НАН Украины. Все манипуляции с животными осуществлялись согласно положениям «Европейской конвенции защиты позвоночных животных, которые используются с экспериментальной и иной научной целью» (г. Страсбург, 1985) и общепринятым Национальным нормам биоэтики.

Для получения суспензии фолликулов выделенную овариальную ткань половозрелого животного отделяли от соединительной ткани, фрагментировали ножницами для микрохирургии (0,5–1 мм³) и помещали в стерильную питательную среду 199. Фрагменты овариальной ткани были отмыты 3 раза в питательной среде 199 с добавлением антибиотиков стрептомицина и пенициллина.

Суспензию фолликулов получали путем ферментативной обработки фрагментов овариальной ткани 0,1% раствором коллагеназы типа I в течение 20 минут при 37°C. Инактивацию действия фермента осуществляли средой 199, содержащей 15% ЭТС при +4°C.

Гипотермическое хранение суспензии фолликулов в концентрации 1 млн/мл осуществляли в холодильной камере при температуре +4°C в течение 7 суток. Отбор образцов для анализа проводили на этапах 1, 2, 3, 5 и 7 суток.

Средами для гипотермического хранения суспензии фолликулов служили:

- среда 1 – фосфатно-солевой буфер (ФСБ) – 130 мМ NaCl, 20 мМ KCl, 20 мМ фосфатного буфера при pH=7,4;
- среда 2 – калиевая среда – 130 мМ KCl, 20 мМ NaCl, 20 мМ фосфатного буфера при pH=7,4;
- среда 3 – маннитолсодержащий раствор (MCP) – 250 мМ маннита, 10 мМ NaCl, 20 мМ KCl, 20 мМ фосфатного буфера при pH=7,4;
- среда 4 – сахарозосодержащий раствор (CCP) – 250 мМ сахарозы, 10 мМ NaCl, 20 мМ KCl, 20 мМ фосфатного буфера при pH=7,4.

А также указанные выше растворы с добавлением 10% ЭТС – среда 1', среда 2', среда 3' и среда 4'.

Жизнеспособность полученной суспензии фолликулов определяли по окрашиванию клеток витальным красителем трипановым синим. В экспериментах использовали суспензию фолликулов, содержащую не менее 75% непрокрашенных клеток. Концентрацию клеток в суспензии определяли по стандартной методике с подсчетом в камере Горяева (Лабораторные методы..., 1987).

Активность цитозольного фермента лактатдегидрогеназы (ЛДГ) определяли во внеклеточной среде кинетическим методом стандартным тест-набором ЛДГ «СпЛ» Pyruvate.

Определение метаболической активности суспензии фолликулов после ГХ в исследуемых растворах проводили с помощью МТТ-теста, основанного на способности митохондриальных дегидрогеназ живых клеток конвертировать водорастворимый 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромид (МТТ) в формазан, который кристаллизуется внутри жизнеспособной клетки. Показания оптической плотности измеряли при длине волны 540 нм на фотоколориметре КФК-2-УХЛ-4.2. Результаты эксперимента выражали в процентах (%) к контролю. Интенсивность окраски пропорциональна количеству жизнеспособных клеток в суспензии.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы «Excel» (приложения пакетов программ Microsoft Office 2003). Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

Как видно из данных, представленных на рис. 1, на начальных этапах ГХ (1 сутки) при использовании сред, содержащих неэлектролит (среда 3 и 4), жизнеспособность фолликулов составляла $87,6 \pm 8,5$ % и $79,6 \pm 9,1$ %, что выше по сравнению с электролитными средами (среда 1 и 2) – $71,36 \pm 7,8$ % и $63,66 \pm 7,5$ % соответственно.

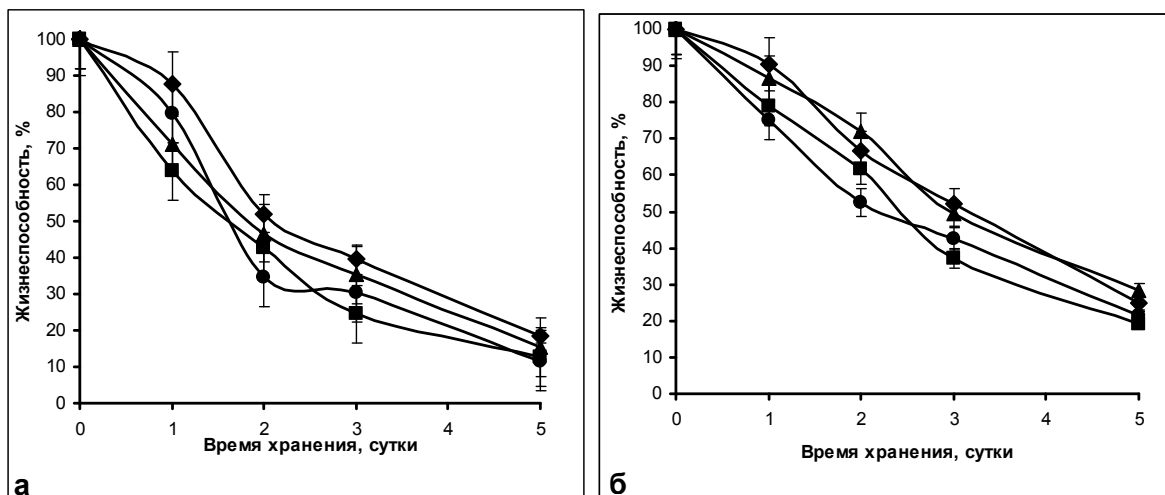


Рис. 1. Жизнеспособность изолированных фолликулов, полученных из половозрелой овариальной ткани, при ГХ (а): раствор 1 (▲), раствор 2 (■), раствор 3 (♦), раствор 4 (●) и в соответствующих средах в присутствии 10% ЭТС (б)

При увеличении сроков ГХ до 5 суток «эффект среды» нивелировался, жизнеспособность фолликулов снижалась до $20 \pm 6,7$ % во всех исследуемых средах. Сопоставляя профили кривых, представленных на рис. 1 (а) и рис. 1 (б), можно сделать вывод, что дополнительное введение в инкубационные среды 10% ЭТС приводит к повышению уровня жизнеспособности фолликулов во всех исследуемых средах на всем этапе ГХ.

Аналогичная динамика сохранности клеток при ГХ была получена при изучении суспензии фолликулов, полученных из неонатальной овариальной ткани (рис. 2).

Сопоставляя данные, представленные на рис.1 и рис. 2, можно сказать о том, что жизнеспособность фолликулов, полученных из неонатальной овариальной ткани при ГХ (рис. 2), достоверно выше по сравнению с таковым показателем фолликулов, полученных из половозрелой овариальной ткани (рис.1). Данный факт, по всей видимости, можно объяснить тем, что

неонатальна овариальна тканина містить значально більше число примордіальних фолікулів, що і визначає стійкість даної суспензії кліток до дії таких екстремальних факторів зовнішнього середовища, як іонне оточення і температура. Слід зауважити, що введення в інкубаційні середовища 10% ЕТС призводить до достовірного збільшення життєспітності фолікулів во всіх середовищах на протязі всього строку ГХ, а також нівелює вказані вище відмінності життєспітності фолікулів, отриманих з половозрєлої і неонатальної овариальної тканини.

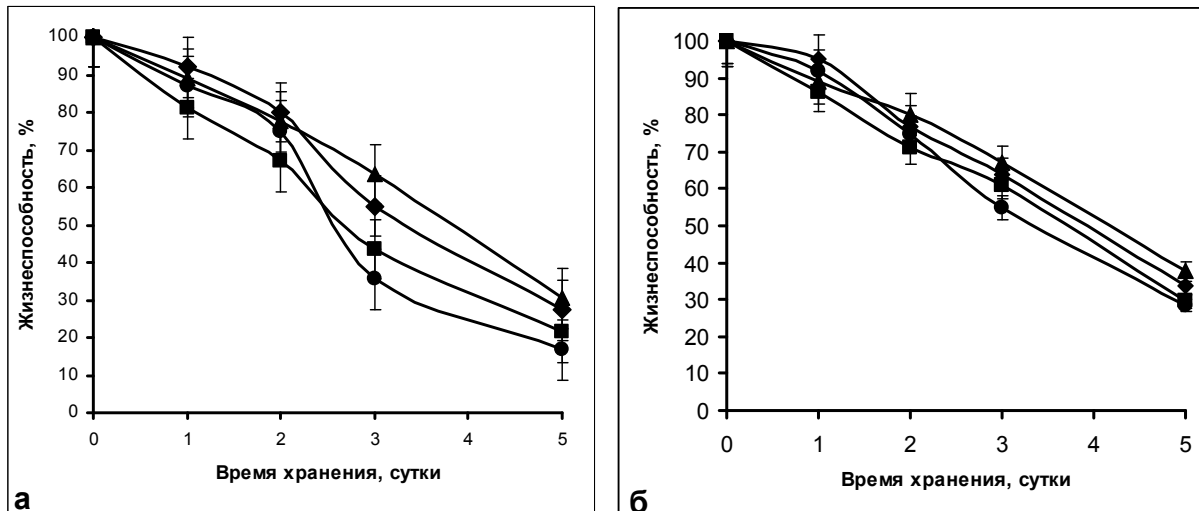


Рис. 2. Життєспітність ізолюваних фолікулів, отриманих з неонатальної овариальної тканини, при ГХ (а): розчин 1 (▲), розчин 2 (■), розчин 3 (◆), розчин 4 (●) і в відповідних середовищах в присутності 10% ЕТС (б)

Відомо, що одним з основних показувачів ішемічного пошкодження тканини і кліток в умовах ГХ є вихід до зовнішнього середовища цитозольного ферменту ЛДГ. Аналіз активності цього ферменту в зовнішньому середовищі був зроблений в наступній серії експериментів (табл. 1).

Таблиця 1.

Активність ЛДГ (ед/10⁶ кліток) в залежності від використовуваних серед

	1 сутки	2 суток	3 суток
Среда 1	287,29±12,1*	299,60±17,4*	352,96±7,6*
Среда 2	270,88±11,7*	287,29±1,2*	369,38±8,9*
Среда 3	279,08±1,2*	307,81±5,8*	377,58±3,4*
Среда 4	299,60±13,7*	324,23±5,8*	361,17±6,2*
Среда 1'	262,67±8,4*	299,60±18,2*	344,75±11,7*
Среда 2'	262,67±5,8*	287,29±17,4*	361,17±1,5*
Среда 3'	270,88±3,4*	307,81±1,1*	369,38±5,8*
Среда 4'	262,67±7,6*	311,92±17,4*	344,75±11,7*

Примечание: * – $p < 0,05$ относительно контроля (209,31±6,8 ед/10⁶ кліток)

Видно, що в течение первых 2 суток ГХ активність ферменту в зовнішньому середовищі порівнянна з такою у контрольних зразках, тоді як на 3 сутки ГХ спостерігається достовірна підвищення активності ферменту во всіх досліджуваних середовищах. Відповідно, можна зробити висновок, що на 3 сутки ГХ відбувається загибель значальної кількості кліток, що корелює з рівнем життєспітності фолікулів на даному строку ГХ. Слід зауважити, що в інкубаційних середовищах, що містять ЕТС, активність ЛДГ на 10–15 % нижче порівняно з такими середовищами без ЕТС.

Для виявлення латентних пошкоджень кліток в досліджуваних середовищах при ГХ була проаналізована їх збереженість в умовах 60-хвилинної інкубації при +37°C в середі 199,

содержащей 10% ЭТС. Как видно из данных, представленных на рис. 3, максимальная жизнеспособность суспензии фолликулов, полученных из половозрелой овариальной ткани, после 1 суток ГХ, составляла $76,5 \pm 12,3\%$, в среде, содержащей 250 мМ маннита, 10 мМ NaCl, 20 мМ KCl, 20 мМ фосфатного буфера при pH=7,4, тогда как в остальных исследуемых средах данный показатель составлял от $46,2 \pm 9,2\%$ до $53,8 \pm 11,6\%$. При увеличении сроков ГХ отмечалось снижение жизнеспособности клеток при последующей экспозиции при $+37^\circ\text{C}$ независимо от композиционного состава инкубационной среды. Дополнительное введение 10% ЭТС в состав среды ГХ приводило к достоверному повышению жизнеспособности фолликулов после 1 суток ГХ во всех исследуемых средах (рис. 3, б).

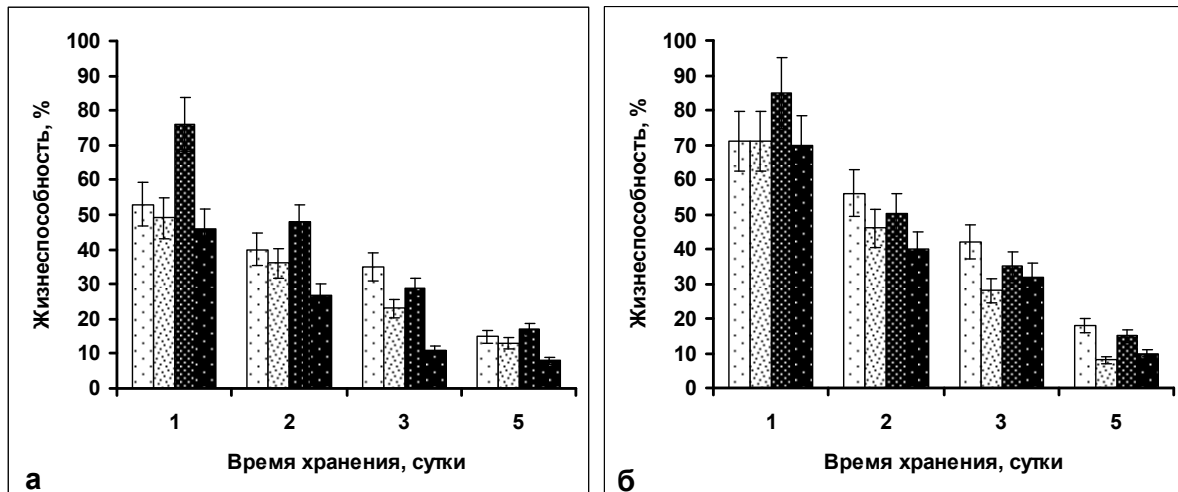


Рис. 3. Жизнеспособность изолированных фолликулов, полученных из половозрелой овариальной ткани, в условиях инкубации после ГХ (а): раствор 1 (□), раствор 2 (▨), раствор 3 (▩), раствор 4 (■) и в соответствующих средах в присутствии 10% ЭТС (б)

При анализе жизнеспособности клеток, полученных из неонатальной овариальной ткани, было установлено, что при их инкубации ($+37^\circ\text{C}$) после 1 и 2 суток ГХ во всех исследуемых средах, как в присутствии ЭТС, так и без нее, сохраняется высокий уровень жизнеспособности клеток (рис. 4, а, б).

Увеличение сроков ГХ до 5 суток выявило достоверные отличия в жизнеспособности клеток при экспозиции ($+37^\circ\text{C}$) в зависимости от композиционного состава инкубационной среды. Видно (рис. 4, а), что уровень жизнеспособности фолликулов при их культивировании после ГХ в среде 1 и в среде 3 составлял $36,2 \pm 9,2\%$ и $31,5 \pm 7,1\%$, тогда как в среде 2 и 4 был $23,2 \pm 6,8\%$ и $13,7 \pm 5,2\%$ соответственно. Следует отметить, что данная зависимость уровня жизнеспособности клеток при инкубации ($+37^\circ\text{C}$) отмечалась и после ГХ в этих средах в присутствии 10% ЭТС (рис. 4, б).

Для определения функциональной способности суспензии фолликулов при экспозиции ($+37^\circ\text{C}$) был использован МТТ-тест. На рис. 5 видно, что после ГХ максимальная метаболическая активность сохраняется в клетках, полученных как из неонатальной, так и половозрелой овариальной ткани при использовании в качестве инкубационных растворов сред 1 и 3.

Обсуждение

Анализ результатов, представленных в данной работе, позволяет сделать несколько выводов. Прежде всего, следует отметить, что сохранность фолликулов после ГХ определялась стадией их развития. Известно (Durrant et al., 1998; Rajah et al., 1992), что неонатальная овариальная ткань 10-дневных грызунов содержит максимальный пул примордиальных фолликулов, которые являются устойчивыми к гипоксии, поскольку обладают малыми размерами (около 20 мкм в диаметре), незначительным количеством клеток гранулезы вокруг яйцеклетки и низкой метаболической активностью, а также у них отсутствует zona pellucida и периферические кортикальные гранулы. Кроме того, примордиальные фолликулы имеют большой потенциал для восстановления сублетальных повреждений органелл в процессе их длительной фазы роста (JongYeob Choi et al.,

2007; Tsuribe et al., 2009). Этим, по всей видимости, можно объяснить достаточно высокую степень сохранности примордиальных фолликулов при ГХ во всех исследуемых средах.

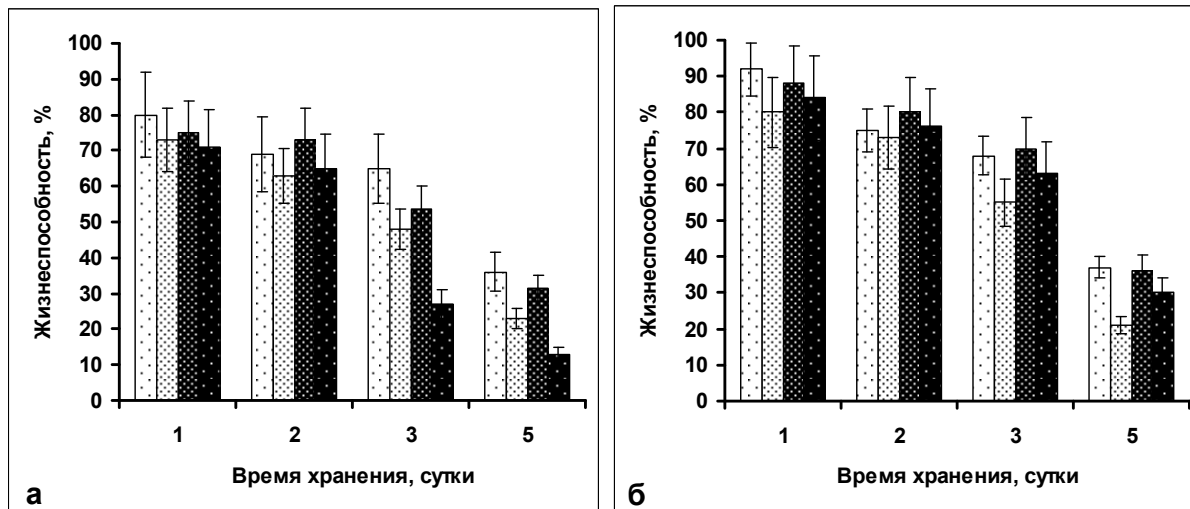


Рис. 4. Жизнеспособность изолированных фолликулов, полученных из неонатальной овариальной ткани, в условиях культивирования после ГХ (а): раствор 1 (□), раствор 2 (▨), раствор 3 (▩), раствор 4 (■) и в соответствующих средах в присутствии 10% ЭТС (б)

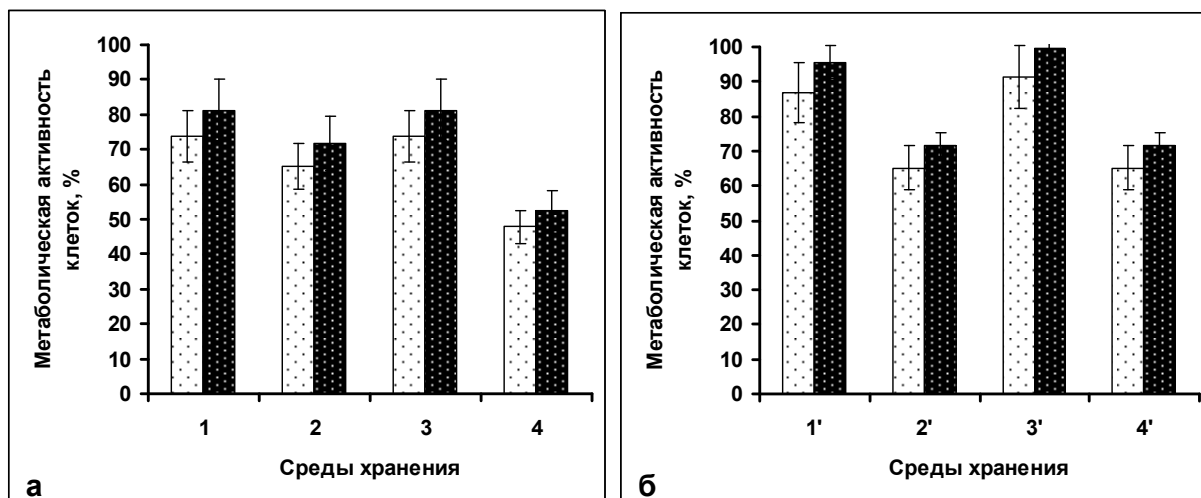


Рис. 5. Метаболическая активность изолированных фолликулов, полученных из половозрелой (□) и неонатальной (■) овариальной ткани, в условиях культивирования после ГХ в средах различного состава (а) и в соответствующих средах в присутствии 10% ЭТС (б)

Суспензия клеток, полученная из половозрелой овариальной ткани, состоит из фолликулов различной степени зрелости, которые являются более чувствительными к гипоксии, а также к изменению ионного окружения и температуры, поскольку имеют больший размер и zona pellucida, а также обладают высокой метаболической активностью (Neto et al., 2008; Santos et al., 2006; Solano et al., 1994; Songsasen et al., 2009).

Максимальная устойчивость фолликулов овариальной ткани в условиях ГХ была выявлена при использовании в качестве инкубационного раствора среды 3, содержащей 250 мМ маннита, 10 мМ NaCl, 20 мМ KCl, 20 мМ фосфатного буфера при pH=7,4.

Важным фактором, позволяющим повысить жизнеспособность фолликулов при ГХ, является добавление белкового компонента в инкубационную среду, а именно 10% ЭТС, что приводит к повышению жизнеспособности фолликулов на 10–15 % во всех исследуемых растворах, вероятно, за счет снижения чувствительности фолликулов различной степени зрелости к изменению физико-химических факторов внешней среды (ионное окружение и температура). Следует отметить, что обогащение раствора UW 5% альбумина при ГХ приводит к снижению образования реактивных форм кислорода, а также предотвращает повреждение митохондрий в органах (Puehler et al., 2010). Следовательно, можно предположить, что в наших экспериментах присутствие ЭТС, содержащей 1,7–3,4 г/дл альбумина, в инкубационных средах оказывает протектирующее действие за счет антиоксидантных свойств альбумина.

Таким образом, жизнеспособность суспензии фолликулов при ГХ зависит от степени их зрелости, электролитного состава среды инкубации и присутствия в ней белковой составляющей.

Список литературы

- Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / Под ред. В.В.Меньшиковой. – М.: Медицина, 1987. – 368с. /Laboratory methods of investigation in clinic: Reference book / Ed. V.V.Men'shikov. – M.: Meditsina, 1987. – 368s./
- Durrant B.S., Pratt N.C., Russ K.D., Bolamba D. Isolation and characterization of canine advanced preantral and early antral follicles // *Theriogenology* – 1998. – Vol.49. – P. 917–932.
- Hyon S.H., Kim D.H. Long-term preservation of rat pancreatic islets under physiological conditions // *J. Biotechnol.* – 2001. – Vol.85, №3. – P. 241–246.
- JongYeob Choi, Jin-young Lee, EunYoung Lee et al. Cryopreservation of the mouse ovary inhibits the onset of primordial follicle development // *Cryobiology.* – 2007. – Vol.54. – P. 55–62.
- Neto V., Buff S., Lornage J. et al. Effects of different freezing parameters on the morphology and viability of preantral follicles after cryopreservation of doe rabbit ovarian tissue // *Fertility and Sterility.* – 2008. – Vol.89. – P. 1348–1356.
- Puehler Th., Gleich O., Schopka S. et al. Impact of normothermic perfusion and protein supplementation on human endothelial cell function during organ preservation // *Ann. Thorac. Surg.* – 2010. – Vol.89. – P. 512–521.
- Rajah R., Glaser E.M., Hirshfield A.N. The changing architecture of the neonatal rat ovary during histogenesis // *Development dynamics.* – 1992. – №195. – P. 177–192.
- Rauen U., Groot H. New insights into the cellular and molecular mechanisms of cold storage injury // *J. Investig. Med.* – 2004. – Vol.52, №5. – P. 299–309.
- Santos S.D., Biondi F.C., Cordeiro M.S. et al. Isolation, follicular density, and culture of preantral follicles of buffalo fetuses of different ages // *Anim. Reprod. Sci.* – 2006. – Vol.95. – P. 1–15.
- Solano R., Armas R., Pupo C.A., Castro F.O. Short term preservation of intrafollicular oocytes at 4°C // *Theriogenology.* – 1994. – Vol.41. – P. 299–315.
- Songsasen N., Fickes A., Pukazhenth B.S., Wildt D.E. Follicular morphology, oocyte diameter and localisation of fibroblast growth factors in the domestic dog ovary // *Reprod. Dom. Anim.* – 2009. – Vol.44, №2. – P. 65–70.
- Tsuribe P.M., Gobbo C.A., Landim-Alvarenga F.C. Viability of primordial follicles derived from cryopreserved ovine ovarian cortex tissue // *Fertility and Sterility.* – 2009. – Vol.91, №5. – P. 1976–1983.
- Wulhfar S., Tissot St., Bouchet S. et al. Mild hypothermia improves transient gene expression yields several fold in Chinese hamster ovary cells // *Biotechnol. Prog.* – 2008. – Vol.24. – P. 458–465.
- Yang Y., Honaramooz A. Effects of medium and hypothermic temperatures on preservation of isolated porcine testis cells // *Reproduction, Fertility and Development.* – 2010. – Vol.22. – P. 523–532.

Представлено: Г.А.Семко / Presented by: G.A.Semko

Рецензент: Є.Е.Перський / Reviewer: Ye.E.Perskiy

Подано до редакції / Received: 24.01.13