

••• КРІОБІОЛОГІЯ ••• CRYOBIOLOGY •••

УДК: 591.111.1-975:547.422:611.651.1.08

Значение эмбриональной телячьей сыворотки в составе гиперосмолярных растворов 1,2-пропандиола для сохранения морфологической целостности овариальной ткани И.А.Трутаева, В.В.Кірошка, А.А.Гавас, В.А.Бондаренко

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

Для оптимизации криоконсервирования овариальной ткани с целью ее использования в клинической практике был проведен сравнительный анализ динамики объемной и морфологической трансформации ткани яичника при поэтапном насыщении (1,5–3 М) 1,2-пропандиолом (1,2-ПД) в средах различного состава. Показано, что сохранность структуры овариальной ткани и объемные изменения в условиях действия гиперосмолярного раствора проникающего криопротектора (КП) определяются композиционным составом среды насыщения и временем экспозиции. При 10 мин инкубации ткани во всех исследуемых случаях не отмечалось морфологических и объемных изменений в структуре ткани на этапе насыщения в растворах 1,2-ПД. Увеличение времени экспозиции до 30 мин выявило сжатие клеток в среде насыщения, содержащей 230 мМ NaCl, до 40% в 3 М 1,2-ПД. Присутствие эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) в аналогичных условиях приводило к набуханию клеток как в 1,5 М концентрации 1,2-ПД, так и в 3 М. Объем ооцитов при увеличении концентрации 1,2-ПД оставался в пределах физиологических значений при использовании исходной изотонической среды. Экспериментально доказано, что максимальная морфологическая сохранность овариальной ткани после насыщения/удаления КП достигалась при введении 10% ЭТС в гиперосмолярные растворы.

Ключевые слова: овариальная ткань, 1,2-пропандиол, объем ооцитов, морфологическая структура.

Значення ембріональної телячої сироватки в складі гіперосмолярних розчинів 1,2-пропандіолу для збереження морфологічної цілісності оваріальної тканини И.А.Трутаєва, В.В.Кірошка, А.А.Гавас, В.А.Бондаренко

Для оптимізації криоконсервування оваріальної тканини з метою її використання у клінічній практиці було проведено порівняльний аналіз динаміки об'ємної і морфологічної трансформації тканини яєчника при поетапному насиченні (1,5–3 М) 1,2-пропандіолом (1,2-ПД) в середовищах різного складу. Показано, що збереження структури оваріальної тканини і об'ємні зміни в умовах дії гіперосмолярного розчину проникаючого криопротектора (КП) визначаються композиційним складом середовища насичення і часом експозиції. При 10 хв інкубації тканини у всіх досліджуваних випадках не відзначалося морфологічних і об'ємних змін в структурі тканини на етапі насичення в розчинах 1,2-ПД. Збільшення часу експозиції до 30 хв виявило стиснення клітин в середовищі насичення, яке містить 230 мМ NaCl, до 40% в 3 М 1,2-ПД. Присутність ембріональної телячої сироватки (ЕТС) в аналогічних умовах приводило до набухання клітин як в 1,5 М концентрації 1,2-ПД, так і в 3 М. Об'єм ооцитів при збільшенні концентрації 1,2-ПД залишався в межах фізіологічних значень при використанні вихідного ізотонічного середовища. Експериментально доведено, що максимальне морфологічне збереження оваріальної тканини після насичення/видалення КП досягалася при введенні 10% ЕТС в гіперосмолярні розчини КП.

Ключові слова: оваріальна тканина, 1,2-пропандіол, об'єм ооцитів, морфологічна структура.

Importance of fetal bovine serum introduction in hyperosmolar solutions of 1,2-propanediol for preserving morphological integrity of ovarian tissue I.A.Trutaieva, V.V.Kiroshka, A.A.Gawas, V.A.Bondarenko

For the optimization of cryopreservation of ovarian tissue with the purpose of its using in clinical practice there have been carried out comparative analysis of the dynamics of volume and morphological transformation of the tissue at stepwise adding (1,5–3 M) of 1,2-propanediol (PROH) in various media. It has been shown that

preservation of ovarian tissue structure and volume changes in the conditions of action of hyperosmolar solution of penetrating cryoprotective agent (CPA) are defined by the composition of the saturation solution and exposure time. At 10 minutes of tissues incubation in all studied cases there were observed no morphological changes in the volume and structure of tissue on the stage of saturation in PROH solutions. Increasing exposure time to 30 minutes led to cell compression to 40% in saturation medium containing 230 mM NaCl in 3 M PROH. The presence of fetal bovine serum (FBS) in similar conditions caused cells swelling both in 1.5 M concentration of PROH and 3 M. Oocytes volume remained within physiological values when using initial isotonic medium with increasing PROH concentration. It has been experimentally proved that the maximum morphological preservation of ovarian tissue after CPA saturation/removal is achieved at introduction of 10% FBS in hyperosmolar solutions of CPA.

Key words: *ovarian tissue, 1,2-propanediol, volume of oocytes, morphological structure.*

Введение

В настоящее время трансплантация криоконсервированной овариальной ткани является одним из наиболее перспективных методов сохранения фертильности у женщин после курсов химио- и радиотерапии, а также при различных патологиях яичников (Demeestere et al., 2006b). Преимущества криоконсервирования овариальной ткани заключаются в отсутствии процедуры предварительной гормональной стимуляции, возможности забора различных слоев ткани в любое удобное время, достаточного фолликулярного запаса (Demeestere et al., 2009). В клинической практике, в основном, применяется протокол медленного замораживания овариальной ткани, разработанный (Newton, Aubard, 1996) и модифицированный (Demirci et al., 2001), однако эффективность его остается достаточно низкой (Andersen et al., 2008; Demeestere et al., 2006a; Donnez et al., 2004). Сложность криоконсервирования овариальной ткани вызывает трудности уже на первом этапе, а именно при экспозиции ее фрагментов в растворах криопротекторов (КП). Наличие плотных межклеточных контактов в структуре ткани, приводящих к неравномерной динамике проникновения КП и ограничению движения жидкости в межклеточном пространстве, вызывает объемные изменения и повреждение соматических клеток и ооцита (Woods et al., 2004). Осмотические эффекты проникающих КП при взаимодействии с ооцитами контролируются различными вариациями электролитного состава сред инкубации, а также временем и температурой экспозиции. Для фрагментов овариальной ткани подбор композиционного состава среды инкубации, времени и температуры осуществляется эмпирически на основании экспериментальных данных, полученных для ооцитов и эмбрионов (Amorim et al., 2004; Santos et al., 2007).

До настоящего времени вопросы, связанные с осмотической чувствительностью ооцитов в структуре ткани яичника при инкубации в растворах, содержащих КП, остаются открытыми. Повышение осмотической устойчивости и сохранности ткани яичника достигается при ступенчатом добавлении/удалении проникающих КП (Mazur, Schneider, 1986; Newton et al., 1999), а также введением в состав криозащитных сред непроникающих белковых компонентов (эмбриональная телячья сыворотка – ЭТС, человеческий альбумин, аутологичная сыворотка) (Hreinsson et al., 2003) либо же осмотически активных сахаров (сахароза, трегалоза и раффиноза) (Neto et al., 2008; Schubert et al., 2005).

Цель работы – исследовать сохранность морфологической структуры овариальной ткани и динамику объемных изменений ооцитов в зависимости от времени инкубации в криозащитных средах различного состава.

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 мм³) овариальной ткани крыс линии Вистар, которые содержались в стандартных условиях вивария ИПКиК НАН Украины.

Для изучения осмотической чувствительности насыщение фрагментов овариальной ткани проводили в средах различного электролитного состава: среда 1 – 130 mM NaCl, 20 mM KCl, 200 mM сахарозы, 10 mM фосфатного буфера при pH=7,4 (490 мОсмоль/л); среда 2 – 230 mM NaCl, 20 mM KCl, 10 mM фосфатного буфера при pH=7,4 (490 мОсмоль/л); среда 3 – 230 mM NaCl, 20 mM

KCl, 10 мМ фосфатного буфера, 10% ЭТС, рН=7,4 (490 мОсмоль/л). 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 1,2-ПД), каждый длительностью в 10 и 30 мин (в разных группах). Как насыщение, так и отмывание фрагментов овариальной ткани проводилось при комнатной температуре (20–22°C). Удаление КП осуществляли 3-кратным добавлением отмывочной среды (130 мМ NaCl, 20 мМ KCl, 10 мМ фосфатного буфера, 250 мМ маннита, 10% ЭТС, рН=7,4 (540 мОсм)). Следует отметить, что при первом добавлении (отмывании) отмывочный раствор дополнительно содержал 1,5 М 1,2-ПД. Время инкубации составляло 10 минут на каждом этапе.

Для морфологических исследований ткань фиксировали 2%-м раствором глutarового альдегида на 150 мМ фосфатном буфере на каждом этапе насыщения и на последней ступени отмывания во всех исследуемых средах. После чего готовили полутонкие срезы по стандартной методике (Уикли, 1975). 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. Сохранность фолликулов была оценена как отношение количества нормальных фолликулов к их общему числу, выраженное в процентах. Деструктивные изменения фолликулов (рис. 1) были оценены по следующей классификации (Gougeon, 1986; Paynter et al., 1999): 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, Б) и дегенеративный тип 2 – ооцит сжат, клетки гранулезы дезорганизованы и набухшие (рис. 1, В).

Исследования гистологических препаратов осуществляли с помощью микроскопа со встроенной камерой “Axio Observer Z1” (“Carl Zeiss”, Германия) с объективом “Plan Fluor” ×20 и ×40.

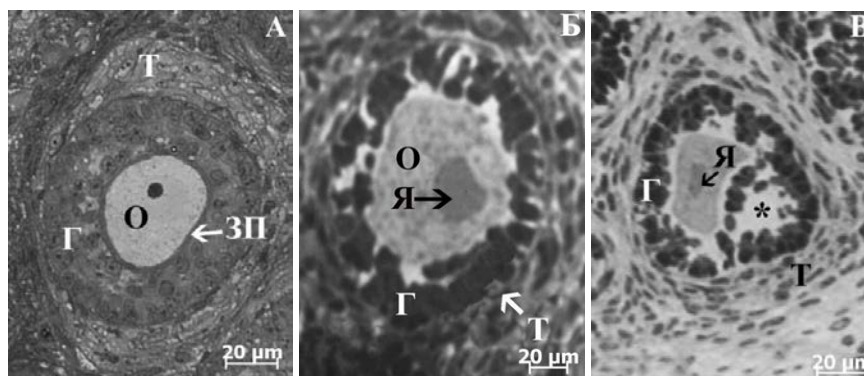


Рис. 1. Гистопрепарат неонатальной овариальной ткани после окрашивания толуидиновым синим: А – нормальный фолликул; Б – дегенеративный тип 1; В – дегенеративный тип 2; О – ооцит, Г – клетки гранулезы, Я – ядро, ЗП – зона пеллюцида, Т – клетки теки, * – аккумуляция жидкости.

Размер ооцитов анализировали с использованием компьютерной программы “Axio Vision 4.7”, объем клеток рассчитывали согласно формуле (Wang et al., 2011): $V=0,75225(A)^{1,5}$, где А – 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 в пакете программы Excel. Данные представлены в виде $M \pm m$, уровень достоверности различий – $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

На рис. 2 представлены объемные изменения ооцитов (среда 1, среда 2, среда 3) в структуре овариальной ткани в условиях поэтапного увеличения осмолярности (1,5 → 3 М 1,2-ПД)

при разном времени экспозиции (10 мин – рис. 2, А и 30 мин – рис. 2, Б). Видно, что при времени экспозиции 10 мин объем ооцитов достоверно не отличался от контрольных значений ($K=1$) независимо от концентрации 1,2-ПД и состава исходной среды инкубации. Увеличение времени инкубации до 30 мин выявило различные объемные изменения ооцитов в зависимости от состава среды и концентрации 1,2-ПД. Так, при инкубации фрагментов ткани в среде 1 не наблюдалось достоверных изменений объема ооцитов в 1,5 и 3 М концентрации КП (рис. 2, Б). В случае использования среды 2 происходило незначительное уменьшение объема клеток при инкубации в 1,5 М 1,2-ПД и сжатие клеток на 35% относительно контроля в 3 М концентрации КП. Введение 10% ЭТС в состав среды насыщения вызывало увеличение объема ооцитов на 20% при данном времени экспозиции как в 1,5 М, так и в 3 М 1,2-ПД (рис. 2, Б).

Как следует из рис. 3, А, количество нормальных фолликулов было в пределах 80–95 % при времени экспозиции фрагментов ткани в течение 10 мин независимо от состава исходной среды инкубации и конечной концентрации КП. Увеличение времени инкубации (рис. 3, Б) показало снижение уровня сохранности фолликулов до 60–70 % при использовании исходных сред 1 и 2 как в случае 1,5 М концентрации КП, так и 3 М. Наличие в составе исходной среды белкового компонента (10% ЭТС, среда 3) приводило к повышению данного показателя до 90%.

Анализ сохранности фолликулов проводили только в случае удаления 3 М раствора КП. Так, снижение уровня сохранности фолликулов до 30–50 % было независимо от времени инкубации после насыщения изотонической средой 1 (рис. 3, В). Аналогичный результат был получен при экспозиции ткани в течение 10 мин в случае использования раствора 2 для насыщения. Максимальный уровень сохранности фолликулов после удаления КП был отмечен при введении в исходную среду насыщения белкового компонента (исходная среда 3). При этом уровень сохранности фолликулов на этапе удаления КП составлял 80–90 % как при 10, так и при 30 мин экспозиции.

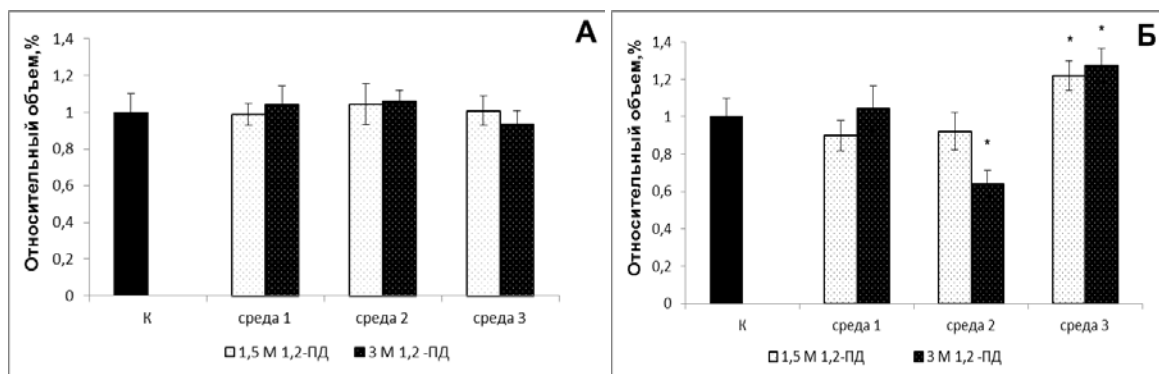


Рис. 2. Объемные изменения ооцитов при насыщении 1,2-ПД в течение 10 мин (А) и 30 мин (Б)

На рис. 4, 5 показана морфологическая структура овариальной ткани после удаления 3М 1,2-ПД. Видно, что уровень структурных повреждений в ткани определялся временем экспозиции и составом исходной среды насыщения. В случае применения исходной среды 1 (130 NaCl) на гистологических препаратах (рис. 4, А) отмечался выраженный отек стромы овариальной ткани, сжатие ооцита и клеток гранулезы, а также нарушение межклеточных контактов. При этом ооплазма имела мелкозернистую структуру, ядро было слегка деформировано. Использование среды 2 (230 NaCl) приводило к сохранению межклеточных контактов в структуре фолликула. В этом случае наблюдалось уменьшение размеров ооцитов, причем более значительное в антральных и преантральных фолликулах. При этом структура примордиальных фолликулов оставалась в пределах физиологической нормы. Минимальные деструктивные повреждения морфологии овариальной ткани после удаления КП отмечались при введении в исходный раствор насыщения белкового компонента ЭТС (среда 3). Видно (рис. 4, В), что структура фолликулов всех стадий фолликулогенеза была сохранена, отмечались только незначительные структурные изменения в строме ткани.

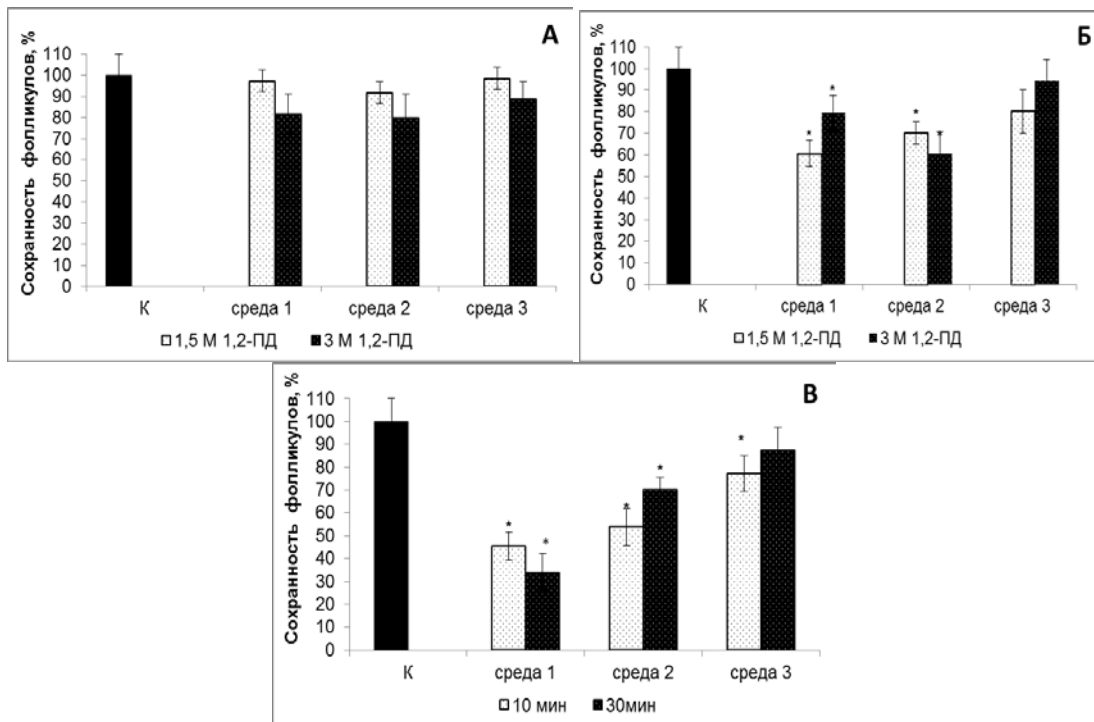


Рис. 3. Уровень сохранности фолликулов при насыщении при времени экспозиции 10 мин (А) и 30 мин (Б) и после отмыывания от 3 М 1,2-ПД (В)

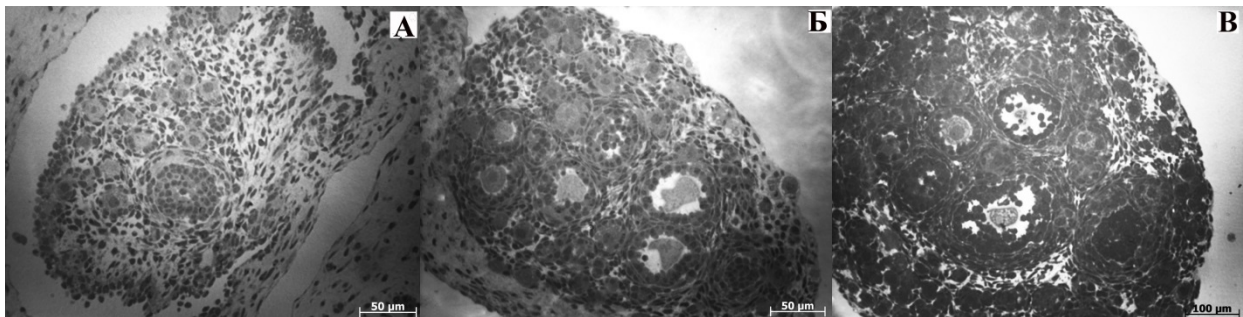


Рис. 4. Морфологические изменения овариальной ткани при 10 мин экспозиции, А – экспозиция в среде 1, Б – среде 2, В – среде 3

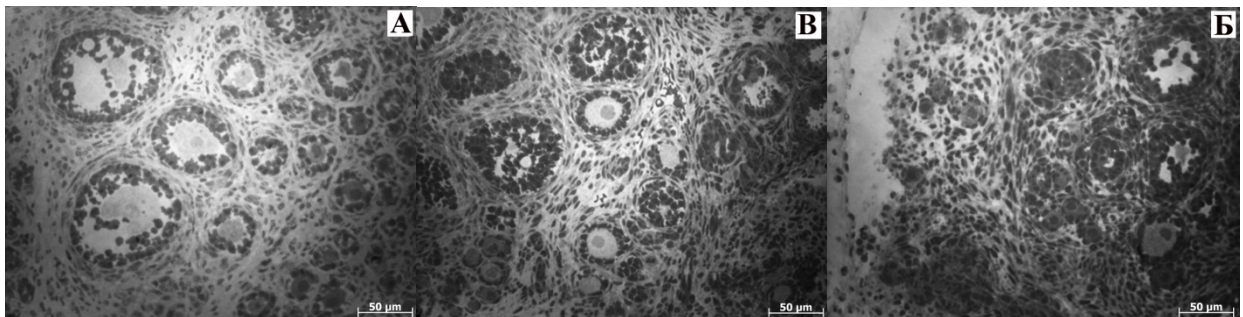


Рис. 5. Морфологические изменения овариальной ткани при 30 мин экспозиции, А – экспозиция в среде 1, Б – среде 2, В – среде 3

Как следует из гистологических препаратов, представленных на рис. 5 А, Б, В, увеличение времени экспозиции с КП до 30 мин приводило к деструкции ткани после удаления КП. Во всех случаях наблюдалась аккумуляция жидкости в строме, которая приводила к различным нарушениям сложной архитектоники овариальной ткани в зависимости от исходной среды насыщения.

Так, использование исходной среды 1 (рис. 5, А) вызывало сильное сжатие ооцита и клеток гранулезы, а также нарушение межклеточных контактов. При насыщении фрагментов в среде 2 (рис. 5, Б) ооцит сохранял свою округлую форму, тогда как клетки гранулезы были уменьшены в объеме. В случае среды 3 (рис. 5, В) наряду с набуханием ооцитов и клеток гранулезы отмечалось сохранение плотных контактов между ними, несмотря на аккумуляцию жидкости в межтканевом пространстве.

Экспериментальные данные, приведенные выше, однозначно указывают на то, что сохранность структуры овариальной ткани и объемные изменения в условиях действия гиперосмолярного раствора проникающего КП, определяются композиционным составом среды насыщения и временем экспозиции. При 10 мин инкубации ткани в гиперосмолярных растворах 1,2-ПД не отмечалось морфологических и объемных изменений в структуре ткани на этапе насыщения во всех исследуемых случаях. Увеличение времени экспозиции до 30 мин выявило качественные отличия в зависимости от состава исходной среды насыщения. Так, при использовании исходной изотонической среды (среда 1) объем ооцитов при увеличении концентрации 1,2-ПД оставался в пределах физиологических значений. Повышение концентрации NaCl (среда 2) и введение белкового компонента – ЭТС (среда 3) вызывало разнонаправленный ответ морфологических и объемных изменений овариальной ткани при 30 мин экспозиции. Насыщение ткани средой 2 вызывало незначительное сжатие клеток в 1,5 М концентрации КП и дальнейшее уменьшение объема на 40% в 3 М 1,2-ПД. Тогда как применение среды 3 приводило к набуханию клеток как в 1,5 М концентрации 1,2-ПД, так и в 3М.

Несмотря на указанный выше различный осмотический ответ клеток при насыщении ткани средами различного состава, не было выявлено корреляции между объемными изменениями ооцитов и морфологической целостностью ткани в условиях насыщения/удаления КП. Максимальный уровень сохранности фолликулов после удаления КП был отмечен при использовании исходной среды 3. Этот факт, по всей видимости, связан со снижением осмотической чувствительности клеток за счет введения белкового компонента в состав гиперосмолярных сред.

J.M.Shepard и соавт. (Shepard et al., 1987) было показано, что присутствие альбумина в гипертонической среде приводило к нарушению работы адаптационного механизма поддержания постоянства клеточного объема RVI (regulatory volume increase). При этом не наблюдалось первоначальное сжатие клеток при повышении осмолярности внеклеточной среды, что, вероятно, связано с проникновением альбумина внутрь клетки. Экспериментально было доказано, что происходит увеличение количества внутриклеточного ¹²⁵I-альбумина в эндотелиальных клетках при их культивировании в гипертонических средах. В работах (Ghinea et al., 1988; Ghinea et al., 1989; Siflinger-Birnboim, Malik, 1993; Schnitzer, Bravo, 1993) установлено, что на поверхности мембран фибробластов, эндотелиальных клеток и клеток гладкой мускулатуры существуют специфические рецепторы для связывания альбумина и его последующего трансцитоза.

Согласно нашим данным (рис. 2, Б), увеличение объема ооцитов в гипертонических средах КП в присутствии 10% ЭТС, по всей видимости, можно объяснить сочетанным проникновением в клетку 1,2-ПД и альбумина. В настоящее время установлено, что для ооцитов коэффициент проницаемости мембраны для молекул воды выше, чем для КП (ДМСО, ЭГ, 1,2-ПД), и динамика объемных изменений клеток при экспозиции в гиперосмолярных растворах КП носит двухфазный характер (Le Gal et al., 1994; Wang et al., 2011). Показано, что в течение первых минут экспозиции ооцитов в 1,5 М КП (ДМСО, ЭГ, 1,2-ПД) происходит первоначальное сжатие клеток, связанное с выходом осмотически активной воды, после чего следует восстановление их объема до 90–95 % за счет диффузии молекул воды и КП внутрь клетки по градиенту концентрации (Songsasen et al., 2002). При введении белкового компонента, в наших экспериментальных условиях, трансцитоз альбумина, очевидно, компенсировал первоначальное сжатие клеток в гиперосмолярных растворах КП. Это изменяло осмотическую чувствительность клеток и определяло максимальную

морфологическую сохранность (рис. 3 А, Б, В) после насыщения/удаления КП средами, содержащими 10% ЭТС.

Представленные выше результаты позволяют сделать заключение, что введение белкового компонента не только на этапе удаления КП из ткани, а и на этапе насыщения оказывало существенное влияние на сохранность морфологической структуры и динамику объемных изменений в условиях действия гиперосмолярных растворов КП.

Список литературы

- Уикли Б. Электронная микроскопия для начинающих – М.: Мир, 1975. – 324с. /Uikli B. Elektronnaya mikroskopiya dlya nachinayushchikh– М.: Mir, 1975. – 324 s./
- Amorim C.A., Rondina D., Rodrigues A. P.R. et al. Cryopreservation of isolated ovine primordial follicles with propylene glycol and glycerol // *Fertility and Sterility*. – 2004. – Vol.81, no 1. – P. 735–740.
- 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, no 10. – P. 2266–2272.
- 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.* – 2006a. – Vol.21. – P. 2010–2014.
- 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.* – 2006b. – Vol.61, no 5. – P. 259–263.
- Demeestere I., Simon P., Emiliani S. et al. Orthotopic and heterotopic ovarian tissue transplantation // *Hum. Reprod. Update*. – 2009. – Vol.15, no 6. – P. 649–665.
- Demirci B., Lornage J., Salle B. et al. Follicular viability and morphology of sheep ovaries after exposure to cryoprotectant and cryopreservation with different freezing protocols // *Fertility and Sterility*. – 2001. – Vol.75. – P. 754–762.
- Donnez J., Dolmans M.M., Demylle D. et al. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue // *Lancet*. – 2004. – Vol.364. – P. 1405–1410.
- Ghinea N., Fixman A., Alexandru D. et al. Identification of albumin-binding proteins in capillary endothelial cells // *J. Cell Biol.* – 1988. – Vol. 107, no 1. – P. 231–239.
- Ghinea N., Eskenasy M., Simionescu M., Simionescu N. Endothelial albumin binding proteins are membrane-associated components exposed on the cell surface // *J. Cell Biol.* – 1989. – Vol.264. – P. 4755–4758.
- Gougeon A. Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results // *Hum. Reprod.* – 1986. – No 1. – P. 81–87.
- Hreinsson J., Zhang P., Swahn M.L. et al. Cryopreservation of follicles in human ovarian cortical tissue. Comparison of serum and human serum albumin in the cryoprotectant solutions // *Hum. Reprod.* – 2003. – Vol.18. – P. 2420–2428.
- 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.
- Mazur P., Schneider U. Osmotic responses of preimplantation mouse and bovine embryos and their cryobiological implications // *Cell Biophys.* – 1986. – Vol.8. – P. 259–285.
- Siflinger-Birnboim A., Malik A.B. Neutrophil adhesion to endothelial cells impairs the effects of catalase and glutathione in preventing endothelial injury // *J. Cell Physiol.* – 1993. – Vol.155, no 2. – P. 234–239.
- Neto V., Buff S., Lornage J., Bottollier B. Effects of different freezing parameters on the morphology and viability of preantral follicles after cryopreservation of doe rabbit ovarian tissue // *Fertil. Steril.* – 2008. – Vol.89, no 5. – P. 1348–1356.
- Newton H., Aubard Y., Rutherford A. et al. Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue // *Hum. Reprod.* – 1996. – Vol.11. – P. 1487–1491.
- Newton H., Pegg D.E., Barrass R., Gosden R.G. Osmotically inactive volume, hydraulic conductivity and permeability to dimethyl sulphoxide of human mature oocytes // *Journal of Reproduction and Fertility*. – 1999. – Vol.117. – P. 27–23.
- 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.

Santos R.R., Hurk R.v.d., Rodrigues A.P.R. et al. Effect of cryopreservation on viability, activation and growth of in situ and isolated ovine early-stage follicles // *Animal Reproduction Science*. – 2007. – Vol.99. – P. 53–64.

Schnitzer J.E., Bravo J. High affinity binding, endocytosis and degradation of conformationally-modified albumins: Potential role of gp30 and gp18 as novel scavenger receptors // *J. Biol. Chem.* – 1993. – Vol.268. – P. 7562–7570.

Schubert B., Canis M., Darcha C. et al. Human ovarian tissue from cortex surrounding benign cysts: a model to study ovarian tissue cryopreservation // *Human Reproduction*. – 2005. – Vol.20, no 7. – P. 1786–1792.

Shepard J.M., Goderie S.K., Brzyski N. et al. Effects of alterations in endothelial cell volume on transendothelial albumin permeability // *Journal of Cellular Physiology*. – 1987. – Vol.133. – P. 389–394.

Songsasen N., Ratterree M.S., VandeVoort C.A. et al. Permeability characteristics and osmotic sensitivity of rhesus monkey (*Macaca mulatta*) oocytes // *Human Reproduction*. – 2002. – Vol.17, no 7. – P. 1875–1884.

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 // *Biology of Reproduction*. – 2011. – Vol.85. – P. 884–894.

Woods E.J., Benson J.D., Agca Y., Critser J.K. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues // *Cryobiology*. – 2004. – Vol.48. – P. 146–156.

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

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

Подано до редакції / Received: 11.07.2016