

Дослідження впливу кріоконсервування на морфофункціональні властивості клітин гранульози та кумулюсу яєчника людини

Н.Н. ЧУБ, М.П. ПЕТРУШКО, І.В. ДОБРУНОВА, В.В. КІРОШКА, О.Б. РЕВЕНКО
Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

Study of Cryopreservation Influence on Morphological Properties of Human Ovarian Granulosa and Cumulus Cells

N.N. CHUB, M.P. PETRUSHKO, I.V. DOBRUNOVA, V.V. KIROSHKA, O.B. REVENKO
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine
of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Останнім часом при комплексному лікуванні деяких форм безпліддя, особливо для збереження фертильності пацієнток, які проходять абляційну хіміо- та радіотерапію, використовують кріоконсервовані репродуктивні тканини, клітини, гамети або ембріони.

Мета роботи – оцінка морфофункціональних властивостей клітин гранульози та кумулюсу яєчника людини до та після кріоконсервування.

У роботі використовували кріоконсервовані за повільною програмою охолодження під захистом 5% ДМСО + 5% ПЕО-400, фрагменти клітин гранульози та кумулюсу (КГК) яєчника людини, які вилучали з преовуляторних фолікулів під час проведення програми запліднення *in vitro*. Клітини за різними методами культивували в середовищі «Upgraded B2» (Франція) або ДМЕМ («Serwa») до та після кріоконсервування. Стероїдогенну активність та життєздатність КГК оцінювали за допомогою флуоресцентних барвників: нільського червоного та пропідіуму йодиду.

Гістологічні дослідження не виявили суттєвих відмінностей у структурі КГК до та після кріоконсервування, однак у деяких препаратах спостерігали зміну тінкторіальних властивостей в бік еозинофілії після дії низьких температур. При культивуванні нативних препаратів адгезію й міграцію КГК відмічали на 2-у добу культивування, після кріоконсервування – на 3–4-у добу. Імовірно, даний факт пов'язаний з репарацією нелетальних ушкоджень, що виникають у клітинах в результаті кріоконсервування. На 7-у добу відзначали множинну міграцію клітинних елементів в моношарі. Клітини мали округлу форму з дрібнозернистою цитоплазмою. На 10-у добу спостерігали багаточарові фрагменти КГК із тонкогранульованою цитоплазмою. Флуоресцентний барвник нільський червоний виявив збереження стероїдогенної активності КГК у культурі на 10-у добу після дії кріозахисного середовища та кріоконсервування, що було підтверджено при ксенотрансплантації КГК оваріоектомованим самкам щурів. Життєздатність клітин після кріоконсервування була знижена на 29%. До 14-ї доби більшість клітин і фрагментів відкріплювалися від дна чашки, що свідчило про настання фази старіння культури.

Таким чином, низькотемпературне зберігання під захистом двохкомпонентного кріозахисного середовища незначно впливає на стероїдогенну активність, морфологічну цілісність КГК, міграцію і проліферацію клітин у культурі.

Recently in a complex treatment of some types of infertility, especially for preserving the fertility in the patients undergoing ablational chemotherapy and radiotherapy, the cryopreserved reproductive tissues, cells, gametes or embryos have been used.

The research aim was to assess morphological and functional properties of human ovarian granulosa and cumulus cells before and after cryopreservation.

In the work there were used cryopreserved under protection of 5% DMSO + 5% polyethyleneoxide-400 fragments of human ovarian granulosa and cumulus cells (GCC), isolated from pre-ovulatory follicles during *in vitro* fertilization procedure. The cells were cultured using different methods in Upgraded B2 (France) or DMEM (Serwa) media before and after cryopreservation by slow cooling program. Steroidogenic activity and viability of GCC was assessed using fluorescent dyes: Nile Red and propidium iodide.

Histological studies have found no significant differences in the structure of GCC before and after cryopreservation, however, in some samples there was observed a change in tinctorial properties towards eosinophilia after low temperature exposure. When cultured native preparations the adhesion and migration of GCC were noted to the second day of culturing after cryopreservation it was found to the 3–4th day. This fact is presumably associated with reparation of non-lethal damages appearing in the cells as a result of cryopreservation. To the seventh day there was found a multiple migration of cell elements in monolayer. The cells were of a round shape with fine-grained cytoplasm. To the 10th day there were observed the multilayer areas of GCC with fine-grained cytoplasm. Fluorescent dye Nile red revealed the preserved steroidogenic GCC activity in the culture to the 10th day after exposure to cryoprotective media and cryopreservation, which was confirmed by xenotransplantation of GCC to ovarioectomized female rats. Post-thaw cell viability was reduced by 29%. By the 14th day the majority of cells and fragments detached from the dish bottom, indicating the onset of culture aging phase.

Thus, low-temperature storage under the protection of two-component cryoprotective medium does not significantly affect steroidogenic activity, morphological integrity of GCC, migration and proliferation of cells in culture.