

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

ISSN 2224-5308

Volume 5, Number 323 (2017), 49 – 56

A. S. Seisenbayeva^{1,2,3}, V. V. Isachenko², Ye. M. Toishibekov¹¹Institute of Experimental Biology, Almaty, Kazakhstan,²Universitäts klinikum Köln IVF/Kryo-Labor, Köln, Germany,³Al-Farabi kazakh national university, Almaty, Kazakhstan

STUDY OF VIABILITY OF FROZEN-THAWED OVARIAN TISSUE BY XENOGRAFTING TO SCID MICE

Abstract. The aim of our study was to test the viability of human ovarian tissue which was either frozen just after operative removal from patient or cooled before cryopreservation to 5°C for 24 h and then frozen using xenografting and flow cytometry methods. Ovarian fragments from nine patients have been fragmented into small pieces and divided into two groups: group 1 pieces (n=15) were frozen immediately after operation without pre-cooling, thawed, transplanted to SCID mice and then, after 45 d of culture their quality was analyzed. Group 2 pieces (n=15) were frozen after 24 h pre-cooling to 5°C, thawed, transplanted to SCID mice and then, after 45 d their quality was analyzed. Efficiency of pre-cooling was estimated using of a histologic research and the FACS analysis (check of translocation of phosphatidylserine with FITC-Annexin V and Propidium Iodide). Percent of morphologically normal preantral follicles were 86% and 89% in groups 1 and 2 respectively ($P_{1,2}>0.1$). The FACS analysis showed significantly decreased intensiveness of translocation of phosphatidylserine after pre-cooling of frozen tissue (33.9%), in contrast with tissue frozen without pre-cooling (57.7%) $P<0.05$. It was established, that pre-cooling to 5°C for 24 h before cryopreservation positively influences on viability of follicles after thawing.

Keywords: ovarian tissue, follicles, cryopreservation, xenografting, SCID mice, viability.

УДК 57.086.13

A. Сейсенбаевна^{1,2}, В. В. Исаченко², Е. М. Тойшибеков¹¹Ф. М. Мухамедгалиев атындағы экспериментальді биология институты, Алматы, Қазақстан,²Кёльн Университеті, Акушерлік және гинекология клиникасы, IVF/ Cryo-Lab лабораториясы,

Кёльн, Германия,

³Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Алматы, Қазахстан

МҰЗДАТЫЛЫП-ЕРІТІЛГЕН ОВАРИАЛЬДІ ҰЛПАНЫҢ ӨМІРШЕНДІГІН SCID ТЫШҚАНДАРЫНА КСЕНОТРАНСПЛАНТАЦИЯЛАУ АРҚЫЛЫ ЗЕРТТЕУ

Аннотация. Зерттеу жұмысының мақсаты мұздатылу алдында арнайы салқыннатылған адамның овариальді ұлпасының өміршендігін ксенотрансплантациялау және ағынды цитометрия әдістерін пайдалану арқылы зерттеу. Тоғыз пациенттен алынған овариальді ұлпа кесіндісін кішкентай бөліктеге бөлшектеп, екі топка бөлдік: 1) топ, овариальді ұлпаны алдын-ала салқыннатпай операциядан кейін бірден мұздатып, ерітілген соң SCID тышқандарына ксенотрансплантациялап, 45 күн дақылдағаннан кейін өміршендігін зерттеу; 2) топ, овариальді ұлпаны мұздату алдында 5°C температурада 24 сағат тоңазытқышта салқыннатып, ерітілген соң SCID тышқандарына ксенотрансплантациялап, 45 күн дақылдағаннан кейін өміршендігін зерттеу. Алдын-ала салқыннату әдісінің тиімділігі гистологиялық талдау мен FACS-анализ арқылы тексерілді (фосфатидилсерин транслокациясын FITC-аннексин V мен йодид пропидиямен зерттеу). Морфологиялық қалыпты преандральді фолликулдардың проценті 1-ші және 2-ші топта 86% және 89% тен болды. FACS-анализ нәтижесі фосфатидилсериннің транслокация интенсивтілігі алдын-ала салқыннатылған ұлпада

(33,9%) алдын-ала салқындағы ұлпана қарағанда төмен болатынын (57,7%) көрсетті ($P<0,5$). Корытындылай келе овариальді ұлпаны мұздату алдында 5°C температурада 24 сағат тоңазытқышта салқындау фолликулдардың өміршендігіне он әсер ететінін белгілі болды.

Түйін сөздер: овариальді ұлпа, фолликулдар, криоконсервация, ксенотрансплантациялау, SCID тышқандар, өміршендік.

Қазіргі таңда Дүние жүзінде адамдар арасында бедеулік кең таралған аурулардың бірі. Дүниежүзілік Денсаулық сақтау Ұйымының статистикасы бойынша бала көтеретін жастагы ерлі-зайыпты жұптардың 15% осы мәселе мен қактығысады [1]. Этиологиясы әртүрлі бедеулік ауруларын емдеу үшін қазіргі кезде косымша репродуктивті технология (КРТ) әдістері пайдаланылады. Бірақ фолликулогенезді стимуляциялап, жетілген ооциттерді алудың КРТ әдістері пациенттерге горманальді препараттарды енгізуге негізделгендердің бұл әдістерді пайдалану көптеген аурулар катарына қарсы көрсетілімге ие, әсіреке барлық ісік ауруларында. Сонымен қатар заманауи химиотерапия әдістерін қолдану кезінде примордиальді фолликулдар қорының зақымдануына байланысты пациенттің овариальді резерві төмендейді [2-4]. Соңдықтан осындай диагнозы бар әйелдердің фертильділігін сақтауға негізделген бірнеше әдістер бар. Соның бірі химиотерапия алдында криоконсервацияланған овариальді ұлпаның қыртысты бөлігін емделіп жазылған пациенттерге қайта трансплантациялау [5, 6]. Қазіргі таңда осы бағыт қарқынды дамуда және дүниежүзінде овариальді ұлпаларды сақтайтын криобанктер құрылуда. Бірақ аналық без ұлпасын пациенттерге ретрансплантациялау кейбір ісік аурулары типтерінде рецидивке алып келуі мүмкін. Бұл методикалық әдістің тағы бір шектеуі – оның эффективтілігінің төмендігі. Себебі ретрансплантацияланған ұлпалардағы фолликулдардың қоры ишемия әсерінен төмендеп кетеді. Қазіргі кезде криоконсервацияланған овариальді ұлпаны трансплантациялау бойынша жоғарғы деңгейдегі нәтижелер алынған жоқ және осы жолмен туылған балалар саны шамамен 10 ғана жетеді [7-10].

Пациенттерге аутотрансплантация жасау алдында мұздатылып-ерітілген овариальді ұлпаның өміршендігіне болжам жасау үшін бірнеше әдістерді пайдаланып зерттеуге болады: 1) иммуносупрессорлы SCID тышқандарына ксенотрансплантациялау; 2) CAM-дақылдау (chorioallantoic membrane); 3) овариальді ұлпаларды немесе ұлпалардан жеке-жеке бөлініп алынған фолликулдарды *in vitro* дақылдау.

Иммуносупрессорлы SCID тышқандарына ксенотрансплантациялау мен CAM-дақылдау әдістері мұздатылып-ерітілген овариальді ұлпадағы фолликулдардың дамуы мен ангиогенез үрдістерін зерттеуге мүмкіндік береді. Осы әдістерді қолданып криоконсервациялау әдістерінің тиімділігін зерттеуге болады. Бірақ бұл жолмен фолликулдарды өсіріп, ооциттерді бөліп алу әдістерін клиникада қолдану этикалық тұрғыда қарастырылмаған.

Фертильділікті қайта калыптастырудың тағы бір жолы овариальды ұлпаны немесе ұлпадан бөлініп алынған фолликулдарды *in vitro* дақылдау. Бұл технологияға ғалымдар ұлкен сенім артып отыр және біршама ғалымдар тобы осы бағытпен белсенді айналысада [11-20]. Осы жолмен алынған ооциттер стандартты КРТ әдістері арқылы ұрықтандырылып, алынған эмбриондар клиникаларда кең таралған стандартты әдіс арқылы криоконсервацияланып пациентке қажет болғанша ұзак мерзімге сұйық азотта сакталады.

Сонымен жоғарыда аталған себептерге байланысты зерттеу жұмысының мақсаты овариальді ұлпаны криоконсервациялау алдында 5°C температурада салқындаудың тиімділігін мұздатылып-ерітілген ұлпалардың өміршендігін иммуносупрессорлы SCID тышқандарына ксенотрансплантациялау арқылы зерттеу.

Зерттеу әдістері мен материалдары

Зерттеу жұмысы Кёльн Университетінің акушерлік және гинекология клиникасында (Кёльн қ., Германия) жасалды. Зан жүзінде бекітілген құжаттармен танысқан 9 пациенттен лапораскопиялық жолмен оң және сол жақ аналық безінен екі кесінді алынды. Кесінділер Лейбовиц-15 пен 5% Декс-тран сары суы қосылған қоректік ортада арнайы контейнерге салынып лабораторияға жеткізілді. Пинцет пен скальпелдің көмегімен овариальді ұлпа кесіндісін көлемі 1.5-2.0 x 1.0-1.2 x 1.0-1.2 мм кішкентай бөліктерге бөліп, алынған үлгілерді екі топқа бөлдік:

№1 овариальді ұлпа бөліктері бірден мұздатылып, содан кейін ерітілген ұлпалардың өміршендігін анықтау үшін ксенотрансплантация жасалынды;

№2 овариальді ұлпа бөліктерін бір тәулік 5°C температурада тоңазтқышта салқындастып, мұздатып, ерітілген ұлпалардың өміршендігін анықтау үшін ксенотрансплантация жасалынды;

Бақылау тобы: бірден Буэн ерітіндісіне фиксацияланған мұздатылмаған овариальді ұлпа.

Баяу мұздату үшін алынған ұлпа бөліктерін бөлме температурасында 20 мл мұздату ерітіндісі құйылған контейрге салдық. Мұздату ерітіндісі 6% диметильсульфоксид, 6% этиленгликоль және 0,15M сахароза криопротекторларының қоспасынан тұрды. Криопротекторлар мен эквилибрацияланған бөліктерді алдын ала мұздату ерітіндісі құйылған 5 мл криопробиркаларга салып арнайы бағдарламалы баяу мұздатқыш IceCube 14S (SyLab, Neupurkersdorf, Austria) құрылғысында криоконсервацияладық. Баяу мұздатудың температуралық режимі келесідей болды: бастапқы температурасы -6°C; содан кейін -6°C бастап -34°C температураға дейін 0,3°C/мин мұздату жылдамдығымен; ары қарай -34°C криопробиркаларды мұздатылған үлгілермен бірге алып, сұйық азотқа салып Дьюар ыдысында сақтадық. Бұл құрылғыда сидинг процесі автоматты түрде -6°C температурада жүреді. Еріту үшін криопробиркаларды 30 сек бөлме температурасында ұстап, содан кейін 100°C қайнап жатқан су моншасына салып, мұздың көлемі 1-2 мм жеткенше ұстап тұрдық. Ерітілген үлгілерді ішіне 10 мл ерітінді құйылған 100 мл контейнерге салдық. Ерітінді құрамы негізгі қоректік ортадан және 0,5 M сахарозадан тұрды. Осмостық шокты болдырмау мақсатында криопротекторларды біртінде шығару үшін жайлігі минутына 200 цикл айналатын шейкердің үстінде бөлме температурасында 15 минут ұстадық. Осыдан кейін 10 минут ішінде SCID тышқандарына трансплантацияланды. Ксенотрансплантациялау үшін Харлан фермасынан (Терн, Ұлыбритания) алынған 7 алтаптық SCID (BALB/c) тышқандарының 30 аналық дарақтары пайдаланылды. Жануарлар стерильді ортада 12/12 сағат қараша/жарық режимінде болды, су мен жемге ad libitum. Аnestетик ретінде

Rompun 2% және Ketanest 50 мг/мл (Германия) қоспасы қолданылды. Әрбір тышқандың терісі дезинфекцияланып, омыртқа жотасының он және сол жағына ерітілген ұлпаларды трансплантацияладық. Тышқандарға бір күн өткізіп 1.0 IU рекомбинанттық ФСГ (фолликула стимулдайтын гормон) енгізіп отырдық.

Ксенотрансплантациялаудан 45 күн өткен соң тышқандарды мойын омыртқасын дислокациялау арқылы жансыздандырып, алынған 60 трансплантанттардың жартысын гистологиялық зерттеу үшін фиксациялап, ал қалған жартысын апоптозды анықтау үшін 10% FCS (Fetal calf serum) қосылған PBS (Phosphate buffer solution) ортасына салдық. Содан кейін трансплантанттарды GM 501 коллагеназамен 37°C температурада 1 сағат шейкерде инкубацияладық.

Үстіне мұздай PBS-FCS құйып, ұлпаны 20G инесімен механикалық ұсақтап, санылауы 70 мкм фильтрден өткіздік. Клеткаларды мұздай PBS-FCS 4°C температурада 1000 айналым/мин 10 минут центрифугирледік. Бөлініп алынған клеткаларды 10% FCS, 4 ммол L-глутамина, 50 мкмоль 2-меркаптоэтанол және антибиотиктер қосылған 1640 RPMI ортасында 37°C температурада 5%CO₂ 1 сағат дақылдадық. Осыдан кейін апоптозды анықтауға арналған Propidium Iodide қосылған арнайы kit I FITC-аннексин V бояуымен бояп, ағынды цитометрия BD LSR II құрылғысымен апоптоз деңгейін анықтадық.

Гистологиялық зерттеу үшін дақылданған үлгілерді Буэн ерітіндісінде фиксациялап, парафинге бекітіп, қалындығы 4 мкм кесінділер жасадық. Жасалған кесінділерді гематоксилин-эозинмен бояп микроскоп арқылы зерттедік. Зерттеу барысында закымданған фолликулдар мен морфологиялық құрылышы жақсы сақталған фолликулдарға сандық талдау жасалынды. Фолликулдардың үш типі зерттелінді: 1) примордиальді фолликулдар – ооцит жалпақ гранулезды клеткалардың бір қабатымен қоршалған; 2) біріншілік фолликулдар – ооцит куб тәрізді гранулезды клеткалардың бір қабатымен қоршалған; 3) екіншілік фолликулдар – ооцит куб тәрізді гранулезды клеткалардың екі немесе одан да көп қабатымен қоршалған. Статистикалық талдау үшін ANOVA әдісі қолданылды.

Зерттеу нәтижелері мен оларды талдау

Алынған гистологиялық зерттеулер нәтижесінде екі топта да примордиальді, біріншілік және екіншілік фолликулдардың жақсы сақталғанын көрсетті. Морфологиялық құрылышы қалыпты фолликулдардың ооциттерінің пішіні дөңгелек. Ооциттің сыртын тегіс тараған гранулезды клеткалар қоршап тұр, цитоплазмасы біртекті және ядроның тұра ортасында дөңгелек пішінді тығыздалған хроматині бар. Закымдалған фолликулдардың ооциттері деформацияланған, вакуолиз-



а



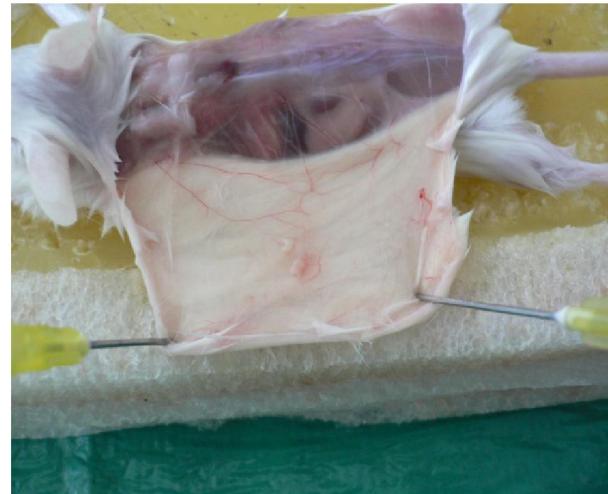
б



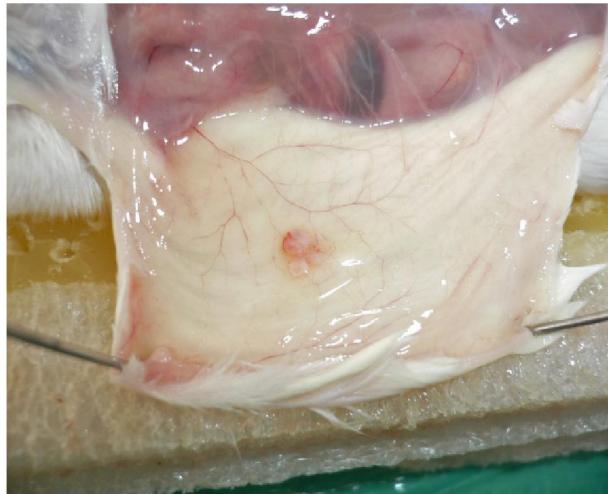
в



г



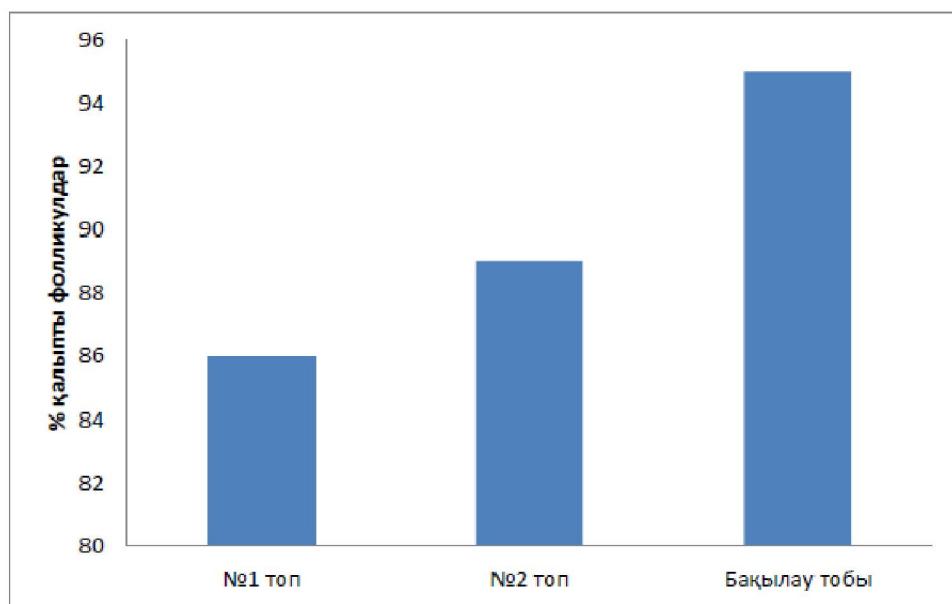
д



е

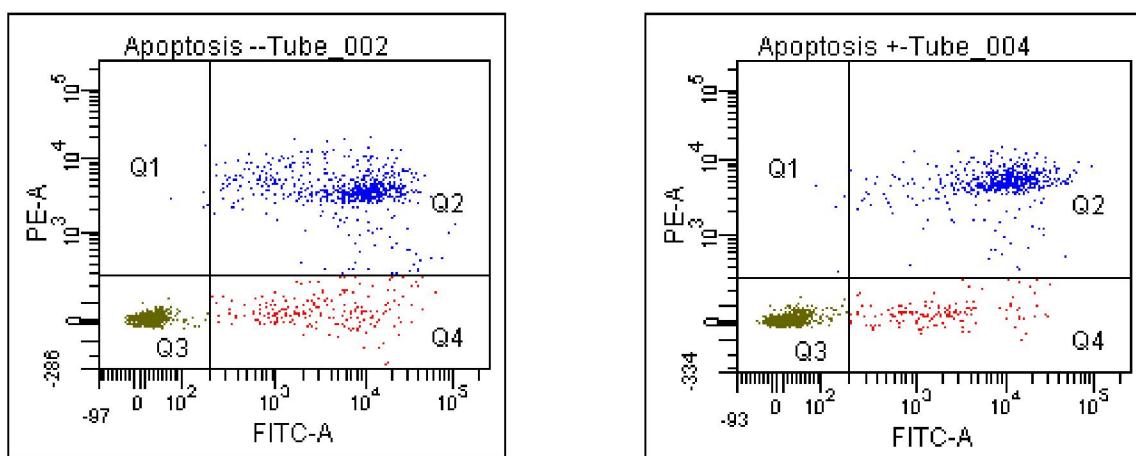
1-сурет – Мұздатылып-ерітілген овариальді үлпа бөліктерін иммуносупрессорлы SCID тышқандарына ксенотрансплантациялау: *а* – мұздатылып-ерітілген овариальді үлпа бөліктері; *б* – ксенотрансплантациялау үшін SCID тышқандардың терісін кесіп, қалташалар жасап дайындау; *б* – овариальді үлпа бөліктерін тері астына енгізу; *в* – арнағы стерильді ортадағы ксенотрансплантация жасалынған тышқандар; *г, д* – ксенотрансплантациялаганинан соң 45 күн өткеннен кейінгі трансплантттардың көрінісі

денген, тека мен гранулезды клеткалар фолликулдардың шетінен алшақтай бастаған. Гранулезды клеткаларда пикноз байқалады. Екі топтағы морфологиялық қалыпты преандральді фолликулдардың саны $89,0 \pm 4,9\%$ және $86,5 \pm 4,3\%$ құрады ($P_{1-2} > 0,1$) (2-сурет).



2-сурет – Алдын ала салқындаудың фолликулдардың сапасына әсері (морфологиялық құрылышы қалыпты сакталған фолликулдар). №1 топ: тоңазытқышта алдын ала салқындауды мұздатылып-ерітіліп ксенотрансплантацияланған овариальді үлпа; №2 топ: алдын ала 24 сағат 5°C температурада тоңазтқышта салқындауды мұздатылмай, содан кейін мұздатылып-ерітіліп ксенотрансплантацияланған овариальді үлпа; Бақылау тобы: мұздатылмай, бірден Буэн ерітіндісінде фиксацияланған үлпа. Көрсетілген топтар арасында статистикалық айырмашылыктар байқалмады (№1 топ пен №2 топ арасында ($P>0,1$)

Криоконсервациялау кезінде клеткада стреске жауап ретінде клеткаішілік апаптоз немесе некроздық сигнал басталатыны белгілі болған [21]. Некроз бен апаптоз кезінде клетка циклында сигналдарды жеткізуде негізгі роль атқаратын компонент – мембрана фосфолипидінің құрамына кіретін фосфотидилсерин болып табылады. Фосфотидилсерин цитоплазмалық мембранның ішкі бетінде орналасады. Клеткаға бір жағымсыз фактор әсір еткенде фосфотидилсерин мембранның ішкі бетінен клетканың сыртқы бетіне ауысады. Клеткаларды криоконсервациялау кезінде бес



3-сурет – Алдын ала 24 сағат 5°C температурада тоңазтқышта салқындауды, содан кейін мұздатылып-ерітіліп SCID тышқандарына ксенотрансплантацияланған овариальді үлпадағы фосфотидилсериннің транслокациясы. №1 топ: тоңазытқышта алдын ала салқындауды мұздатылып-ерітіліп ксенотрансплантацияланған овариальді үлпа; №2 топ: алдын ала 24 сағат 5°C температурада тоңазтқышта салқындауды, содан кейін мұздатылып-ерітіліп ксенотрансплантацияланған овариальді үлпа; FACS анализдің көмегімен. (Q1) Annexine V (FITC A) теріс, ал PI он боялды (бастапқы некроздық клеткалары). (Q2) Annexine V (FITC A) мен PI он боялды (кеп апоптоз). (Q3) Annexine V (FITC A) мен PI теріс боялды (тірі клеткалар). (Q4) Annexine V (FITC A) он, ал PI теріс боялды (апоптоздың ерте түрі). Көрсетілген топтар арасында статистикалық талдаудың нәтижесі $P<0,5$ болды

түрлі теріс әсер байқалады: 1) гипоксия [22]; 2) клеткашілк Ca^{2+} жогарлауы [23]; 3) клетка мембранасының осмостық зақымдануы; 4) оттегінің активті формасының генерациясы; және 5) липидтердің асқын тотығуы. Осы факторлардың кез-келгені фосфотидилсериннің ауысуын туғызуы мүмкін. 1990 жылдан бастап фосфатидилсериннің ауысуы апоптоз датчигінің рөлін атқаратыны белгілі болды [24]. Апоптозды клетка ДНҚ-сын әртүрлі бояғыштармен маркерлеу арқылы немесе терминалдың дезоксинуклеотид-трансфераза көмегімен анықтайды. Апоптозды анықтайдын kit-тің негізгі принципі клетка бетінде орналасқан фосфатидилсериннің Аннексином V-пен байланысуына негізделген. Тірі клеткаларды өлі клеткалардан ажырату үшін екінші бояғыш - йодид проподия керек. Біз алынған нәтижелерді интерпретациялау кезінде фосфатидилсериннің ауысуын клетканың криобиологиялық өндегеуге реакциясы ретінде бағаладық. Бірінші топта $6,9 \pm 0,8\%$ клеткалар бастақы апоптоз деңгейін (FITC-Annexin V он, PI теріс), ал $50,8 \pm 5,0\%$ (FITC-Annexin V және PI теріс) соңғы апоптоз немесе өлі клеткаларды көрсетті. Бұл топтағы тірі клеткалар $39,5 \pm 4,1\%$ (FITC-Annexin V және PI теріс), ал некроздық клеткалар деңгейі $0,5 \pm 0,0\%$ болды (FITC-AnnexinV теріс, PI он). Екінші топта $8,9 \pm 2,1\%$ клеткалар бастақы апоптоз деңгейін, ал $25,0 \pm 1,7\%$ соңғы апоптоз немесе өлі клеткаларды көрсетті. Бұл топтағы клеткалардың өміршеңдігі $67,0 \pm 4,2\%$, ал некроздық клеткалар деңгейі $0,3 \pm 0,0\%$ болды.

Корытынды. Галымдар арасында салқындану үрдісі клетка дамуына он әсер етеді деген пікір қалыптасқан. Жылы қанды атжалмандаудың сұық температураға адаптациясы кезінде клеткада митоз үрдісі күштейген. Адамдар мен тышқандардың сұыққа *in vitro* адаптацияланған клеткаларында да митоздың жоғарлағаны байқалған. 26 сағатқа дейін тәменгі плюс температурада сақталған овариальды ұлпана *in vitro* дақылдау барысында гипотремиялық температура әсері примордиальді фолликулдардың дамуын тоқтатпайтыны анықталған. Осы зерттеудің нәтижесінде гипотремиялық температурада 26 сағаттан артық сақталған овариальды ұлпалаарда примордиальді фолликулдардың саны азая бастағанын көрсеткен [25]. Корытындылай келе овариальды ұлпана криоконсервациялау алдында 5°C температурада 24 сағат салқындану фоффотидилсериннің ауысуын тәмендетеді, сәйкесінше ерітілген ұлпалардағы тірі клеткалардың өміршеңдігін дәлелдейді.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Mascarenhas M.N., Flaxman S.R., Boerma T., Vanderpoel S., Stevens G.A. (2012) National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys, PLoS Med, V.9. P.1-12. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001356>
- [2] Kalich-Philosoph L., Roness H., Carmely A., Fishel-Bartal M., Ligumsky H., Paglin S., Wolf I., Kanety H., Sredni B., Meirow D. (2013) Cyclophosphamide triggers follicle activation and “burnout”; AS101 prevents follicle loss and preserves fertility, Sci. Transl. Med, V.5. P.62-70. doi: 10.1126/scitranslmed.3005402.
- [3] Saleh H., Omar E., Froemming G., Said R. (2015) Tocotrienol preserves ovarian function in cyclophosphamide therapy, Hum. Exp. Toxicol, P.1-7.doi: 10.1177/0960327114564793.
- [4] Song G., Gao H., Yuan Z. (2013) Effect of leuprolide acetate on ovarian function after cyclophosphamide-doxorubicin-based chemotherapy in premenopausal patients with breast cancer: results from a phase II randomized trial, Med. Oncol, V.30. P.667-674doi: 10.1007/s12032-013-0667-8
- [5] Hovatta O. (2004) Cryopreservation and culture of human ovarian cortical tissue containing early follicles, Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol, V.113. Suppl. -S50–54.
- [6] Oktay K., Newton H., Gosden R.G. (2000) Transplantation of cryopreserved human ovarian tissue results in follicle growth initiation in SCID mice, Fertil. Steril, V.73. P.599–603. DOI:[http://dx.doi.org/10.1016/S0015-0282\(99\)00548-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0015-0282(99)00548-8)
- [7] Dolmans M.-M., Jadoul P., Gilliaux S., Amorim C.A., Luyckx V., Squifflet J., Donnez J., Van Langendonck A. (2013) A review of 15 years of ovarian tissue bank activities, J. Assist. Reprod. Genet. V.30. P.305–314. doi: 10.1007/s10815-013-9952-x
- [8] Donnez J., Jadoul P., Pirard C., Hutchings G., Demlylle D., Squifflet J., Smitz J., Dolmans M.-M. (2012) Live birth after transplantation of frozen-thawed ovarian tissue after bilateral oophorectomy for benign disease, Fertil. Steril, V.98. P.720–725. doi: 10.1016/j.fertnstert
- [9] Donnez J., Silber S., Andersen C.Y., Demeestere I., Piver P., Meirow D., Pellicer A., Dolmans M.-M. (2011) Children born after autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue. a review of 13 live births, Ann. Med., V.43. P.437–450. doi: 10.3109/07853890.2010.546807
- [10] Isachenko V., Isachenko E., Keck G., Dittrich R., Montag M., van der Ven H., Mallmann P., Müller A., Distler W., Beckmann M.W., Rahimi G. (2012) First live birth in Germany after re-transplantation of cryopreserved ovarian tissue: original device for initiation of ice formation, Clin. Lab., V.58. P.933–938. DOI: 10.7754/Clin.Lab.2013.130239
- [11] Amorim C. a, Van Langendonck A., David A., Dolmans M.-M., Donnez J. (2009) Survival of human pre-antral follicles after cryopreservation of ovarian tissue, follicular isolation and in vitro culture in a calcium alginate matrix, Hum. Reprod. V.24. P.92–99.DOI:<https://doi.org/10.1093/humrep/den343>

- [12] Dolmans M.-M., Martinez-Madrid B., Gadisseur E., Guiot Y., Yuan W.Y., Torre A., Camboni A., Van Langendonck A., Donnez J. (2007) Short-term transplantation of isolated human ovarian follicles and cortical tissue into nude mice, *Reproduction*, V.134. P.253–262. DOI:10.1530/REP-07-0131
- [13] Bertoldo M.J., Duffard N., Bernard J., Frapsauce C., Calais L., Rico C., Mermilliod P., Locatelli Y. (2014) Effects of bone morphogenetic protein 4 (BMP4) supplementation during culture of the sheep ovarian cortex, *Anim. Reprod. Sci.*, V.149. P.124–134. doi: 10.1016/j.anireprosci.2014.07.010.
- [14] Isachenko V., Mallmann P., Petrunina A.M., Rahimi G., Nawroth F., Hancke K., Felberbaum R., Genze F., Damjanoski I., Isachenko E. (2012) Comparison of in vitro and chorioallantoic membrane (CAM)-culture systems for cryopreserved medulla-contained human ovarian tissue, *PLoS One.*, V.7. P.1-9. doi: 10.1371/journal.pone.0032549
- [15] Chin Siang Kue, Kae Yi Tan, May Lynn Lam, and Hong Boon Lee (2015). Chick embryo chorioallantoic membrane (CAM): an alternative predictive model in acute toxicological studies for anti-cancer drugs. *Exp. Anim.* 64(2), 129–138
- [16] Isachenko V., Orth I., Isachenko E., Mallmann P., Peters D., Schmidt T., Morgenstern B., Foth D., Hanstein B., Rahimi G. (2013) Viability of human ovarian tissue confirmed 5 years after freezing with spontaneous ice-formation by autografting and chorio-allantoic membrane culture, *Cryobiology*, V.66. P.233–238. doi: 10.1016/j.cryobiol.
- [17] Telfer E.E., Zelinski M.B. (2013) Ovarian follicle culture: advances and challenges for human and nonhuman primates, *Fertil. Steril.* V.99. P.1523–1533. doi:10.1016/j.fertnstert
- [18] Xu M., Kreger P.K., Shea L.D., Woodruff T.K. (2006a) Tissue-engineered follicles produce live, fertile offspring, *Tissue Eng.*, V.12. P.2739–2746. DOI:10.1089/ten.2006.12.2739
- [19] Xu M., West E., Shea L.D., Woodruff T.K. (2006b) Identification of a stage-specific permissive in vitro culture environment for follicle growth and oocyte development, *Biol. Reprod.*, V.75. P.916–923. DOI:10.1095/biolreprod.106.054833
- [20] Samaneh Sadeghina and et all. (2016) Development of sheep primordial follicles encapsulated in alginate or in ovarian tissue in fresh and vitrified samples. *Cryobiology*. 72(2):100-5. doi: 10.1016/j.cryobiol.2016.03.001
- [21] Soleimani R., Heytens E., Oktay K. (2011) Enhancement of neoangiogenesis and follicle survival by sphingosine-1-phosphate in human ovarian tissue xenotransplants. *PLoS One.* 6:e19475. doi:10.1371/journal.pone.0019475
- [22] Mattson MP, Chan SL. (2003) Calcium orchestrates apoptosis. *Nature Cell Biol.* 5:1041–1043. PMID: 14647298
- [23] Chiarugi A., Moskowitz MA. (2002) PARP-1—a perpetrator of apoptotic cell death? *Science.* 297:259–263. PMID: 12114629
- [24] Vermes I., Haanen C., Reutelingsperger C.P.M. (1995) A novel assay for apoptosis: flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescence labeled annexin V. *J Immunol Methods.* 184:39–51. PMID: 7622868
- [25] Isachenko E., Isachenko V., Nawroth F., Rahimi G., Weiss JM. (2009) Effect of long-term exposure at suprazero temperatures on activity and viability of human ovarian cortex. *FertilSteri.*91:1556–1559. doi:10.1016/j.fertnstert

REFERENCES

- [1] Mascarenhas M.N., Flaxman S.R., Boerma T., Vanderpoel S., Stevens G.A. (2012) National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys, *PLoS Med.*, V.9. P.1-12. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001356>
- [2] Kalich-Philosoph L., Roness H., Carmely A., Fishel-Bartal M., Ligumsky H., Paglin S., Wolf I., Kanety H., Sredni B., Meirow D. (2013) Cyclophosphamide triggers follicle activation and “burnout”; AS101 prevents follicle loss and preserves fertility, *Sci. Transl. Med.*, V.5. P.62-70. doi: 10.1126/scitranslmed.3005402.
- [3] Saleh H., Omar E., Froemming G., Said R. (2015) Tocotrienol preserves ovarian function in cyclophosphamide therapy, *Hum. Exp. Toxicol.* P.1-7. doi: 10.1177/0960327114564793.
- [4] Song G., Gao H., Yuan Z. (2013) Effect of leuprolide acetate on ovarian function after cyclophosphamide-doxorubicin-based chemotherapy in premenopausal patients with breast cancer: results from a phase II randomized trial, *Med. Oncol.*, V.30. P.667-674. doi: 10.1007/s12032-013-0667-8
- [5] Hovatta O. (2004) Cryopreservation and culture of human ovarian cortical tissue containing early follicles, *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, V.113. Suppl. -S50–54.
- [6] Oktay K., Newton H., Gosden R.G. (2000) Transplantation of cryopreserved human ovarian tissue results in follicle growth initiation in SCID mice, *Fertil. Steril.*, V.73. P.599–603. DOI:[http://dx.doi.org/10.1016/S0015-0282\(99\)00548-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0015-0282(99)00548-8)
- [7] Dolmans M.-M., Jadoul P., Gilliaux S., Amorim C.A., Luyckx V., Squifflet J., Donnez J., Van Langendonck A. (2013) A review of 15 years of ovarian tissue bank activities, *J. Assist. Reprod. Genet.* V.30. P.305–314. doi: 10.1007/s10815-013-9952-x
- [8] Donnez J., Jadoul P., Pirard C., Hutchings G., Demlylle D., Squifflet J., Smitz J., Dolmans M.-M. (2012) Live birth after transplantation of frozen-thawed ovarian tissue after bilateral oophorectomy for benign disease, *Fertil. Steril.*, V.98. P.720–725. doi: 10.1016/j.fertnstert
- [9] Donnez J., Silber S., Andersen C.Y., Demeestere I., Piver P., Meirow D., Pellicer A., Dolmans M.-M. (2011) Children born after autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue. a review of 13 live births, *Ann. Med.*, V.43. P.437–450. doi: 10.3109/07853890.2010.546807
- [10] Isachenko V., Isachenko E., Keck G., Dittrich R., Montag M., van der Ven H., Mallmann P., Müller A., Distler W., Beckmann M.W., Rahimi G. (2012) First live birth in Germany after re-transplantation of cryopreserved ovarian tissue: original device for initiation of ice formation, *Clin. Lab.*, V.58. P.933–938. DOI: 10.7754/Clin.Lab.2013.130239
- [11] Amorim C. a, Van Langendonck A., David A., Dolmans M.-M., Donnez J. (2009) Survival of human pre-antral follicles after cryopreservation of ovarian tissue, follicular isolation and in vitro culture in a calcium alginate matrix, *Hum. Reprod.* V.24. P.92–99. DOI:<https://doi.org/10.1093/humrep/den343>

- [12] Dolmans M.-M., Martinez-Madrid B., Gadisseur E., Guiot Y., Yuan W.Y., Torre A., Camboni A., Van Langendonck A., Donnez J. (2007) Short-term transplantation of isolated human ovarian follicles and cortical tissue into nude mice, Reproduction, V.134. P.253–262. DOI:10.1530/REP-07-0131
- [13] Bertoldo M.J., Duffard N., Bernard J., Frapsauce C., Calais L., Rico C., Mermilliod P., Locatelli Y. (2014) Effects of bone morphogenetic protein 4 (BMP4) supplementation during culture of the sheep ovarian cortex, Anim. Reprod. Sci., V.149. P.124–134. doi: 10.1016/j.anireprosci.2014.07.010.
- [14] Isachenko V., Mallmann P., Petrunina A.M., Rahimi G., Nawroth F., Hancke K., Felberbaum R., Genze F., Damjanoski I., Isachenko E. (2012) Comparison of in vitro and chorioallantoic membrane (CAM)-culture systems for cryopreserved medulla-contained human ovarian tissue, PLoS One., V.7. P.1-9. doi: 10.1371/journal.pone.0032549
- [15] Chin Siang Kue, Kae Yi Tan, May Lynn Lam, and Hong Boon Lee (2015). Chick embryo chorioallantoic membrane (CAM): an alternative predictive model in acute toxicological studies for anti-cancer drugs. Exp. Anim. 64(2), 129–138
- [16] Isachenko V., Orth I., Isachenko E., Mallmann P., Peters D., Schmidt T., Morgenstern B., Foth D., Hanstein B., Rahimi G. (2013) Viability of human ovarian tissue confirmed 5 years after freezing with spontaneous ice-formation by autografting and chorio-allantoic membrane culture, Cryobiology, V.66. P.233–238. doi: 10.1016/j.cryobiol.
- [17] Telfer E.E., Zelinski M.B. (2013) Ovarian follicle culture: advances and challenges for human and nonhuman primates, Fertil. Steril. V.99. P.1523–1533. doi:10.1016/j.fertnstert
- [18] Xu M., Kreger P.K., Shea L.D., Woodruff T.K. (2006a) Tissue-engineered follicles produce live, fertile offspring, Tissue Eng., V.12. P.2739–2746. DOI:10.1089/ten.2006.12.2739
- [19] Xu M., West E., Shea L.D., Woodruff T.K. (2006b) Identification of a stage-specific permissive in vitro culture environment for follicle growth and oocyte development, Biol. Reprod., V.75. P.916–923. DOI:10.1093/biolreprod.106.054833
- [20] Samaneh Sadeghina and et all. (2016) Development of sheep primordial follicles encapsulated in alginate or in ovarian tissue in fresh and vitrified samples. Cryobiology. 72(2):100-5. doi: 10.1016/j.cryobiol.2016.03.001
- [21] Soleimani R., Heytens E., Oktay K. (2011) Enhancement of neoangiogenesis and follicle survival by sphingosine-1-phosphate in human ovarian tissue xenotransplants. PLoS One. 6:e19475. doi:10.1371/journal.pone.0019475
- [22] Mattson MP, Chan SL. (2003) Calcium orchestrates apoptosis. Nature Cell Biol. 5:1041–1043. PMID: 14647298
- [23] Chiarugi A., Moskowitz MA. (2002) PARP-1—a perpetrator of apoptotic cell death? Science. 297:259–263. PMID: 12114629
- [24] Vermes I., Haanen C., Reutelingsperger CPM. (1995) A novel assay for apoptosis: flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescence labeled annexin V. J Immunol Methods. 184:39–51. PMID: 7622868
- [25] Isachenko E., Isachenko V., Nawroth F., Rahimi G., Weiss JM. (2009) Effect of long-term exposure at suprazero temperatures on activity and viability of human ovarian cortex. Fertil Steri. 91:1556–1559. doi:10.1016/j.fertnstert

А. С. Сейсенбаевна^{1,2}, В. В. Исаченко², Е. М. Тойшибеков¹

¹Институт экспериментальной биологии, Алматы, Казахстан,

²Кёльнский университет, Клиника акушерства и гинекологии, Лаборатория IVF/ Cryo-Lab, Кёльн, Германия,

³Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Алматы, Казахстан

ИЗУЧЕНИЕ ЖИЗНеспособности ЗАМОРОЖЕННО-ОТТАЯННОЙ ОВАРИАЛЬНОЙ ТКАНИ С ПОМОЩЬЮ КСЕНОТРАНСПЛАНТАЦИИ SCID МЫШАМ

Аннотация. Целью наших исследований являлось изучение жизнеспособности овариальной ткани женщин после предварительного охлаждения ткани перед замораживанием с помощью методов ксенотрансплантации и проточной цитометрии. Овариальные фрагменты от девяти пациентов были разделены на маленькие кусочки и поделены на две группы: 1) группа, овариальную ткань сразу замораживали после операции без предварительного охлаждения, затем их оттаивали и пересадили SCID мышам, после 45 дневного культивирования проанализировали их качества; 2) группа, овариальную ткань замораживали после предварительного охлаждения при 5°C температуре в течение 24 ч, затем их оттаивали и пересадили SCID мышам, после 45 дневного культивирования проанализировали их качества. Эффективность предварительного охлаждения оценивали с использованием гистологического исследования и FACS-анализа (проверка транслокации фосфатидилсерина с FITC-аннексином V и йодидом пропидия). Процент морфологически нормальных преантравильных фолликулов составил 86% и 89% для 1 и 2 группы соответственно ($P>0,1$). Результаты FACS-анализа показали значительное уменьшение интенсивности транслокации фосфатидилсерина после предварительного охлаждения замороженной ткани (33,9%) в отличие от ткани, замороженной без предварительного (57,7%) охлаждения ($P<0,5$). Было выявлено, что предварительное охлаждение овариальной ткани при 5°C температуре в течение 24 ч перед замораживанием положительно влияет на жизнеспособность фолликулов после размораживания.

Ключевые слова: овариальная ткань, фолликулы, криоконсервация, ксенотрансплантация, SCID мыши, жизнеспособность.