

УДК 57.089.36

¹С.Б. Байкошкарова, ²М.К. Отарбаев*,
²Т.М. Шалахметова, ¹Г.А. Акбердиева, ²Ж.Б. Сабырбек

¹Клиника репродукции человека «Экомед», Республика Казахстан, г. Алматы

²Казахский национальный университет имени аль-Фараби,

Республика Казахстан, г. Алматы

*E-mail: ecomed_marat@mail.ru

In vitro перфузия целого яичника коровы как модели человека в целях криоконсервации целого яичника

Криоконсервация и трансплантация целого яичника с сосудами является эффективным решением предотвращения посттрансплантационной ишемии. На самом деле перфузия интактных яичников млекопитающих через артерии и вены является наиболее технической сложной частью всего процесса криоконсервации. В первом цикле экспериментов яичники (n=145) были перфузированы в течение 60 минут и интервалом от 1 до 1,5 часов после извлечения яичников на скотобойне. Во втором цикле экспериментов, (n=29) перфузию яичников проводили со скоростью 25 мл/час (0,42 мл/мин) в течение 60 минут. Актуальна разработка технологии длительной перфузии интактных яичников криопротекторами при низких температурах, поскольку ранее, было установлено, что 24-часовое охлаждение до 5°C перед криоконсервацией благоприятно влияет на замораживание человеческой яичниковой ткани. Целью данного исследования было изучение эффективности перфузии интактных коровьих яичников с различной скоростью перфузии и времени прошедшего между извлечением этих яичников и началом перфузии.

Ключевые слова: криоконсервация, криопротекторы, яичники, перфузия, ишемия, анастомоз.

S.B. Baikoshkarova, M.K. Otarbayev, T.M. Shalakhmetova,
G.A. Akberdieva, Zh.B. Sabyrbek

In vitro perfusion of the whole ovary as a cow in order to model human ovarian cryopreservation whole

Cryopreservation and transplantation of whole ovary with vessels is an effective solution to prevent post-transplant ischemia. In fact, perfusion intact mammalian ovary through the arteries and veins, is the most technically difficult part of the process of cryopreservation. In the first series of experiments, ovary (n = 145) were perfused for 60 minutes and at intervals of 1 to 1.5 hours after removal of the ovaries at the slaughterhouse. In a second series of experiments, (n = 29) was performed with ovarian perfusion rate of 25 ml / hour (0.42 ml / min) for 60 minutes after removal of the ovaries. Relevant technology development prolonged perfusion intact ovaries cryoprotectants at low temperatures, as previously, it was found that 24-hour cooling to 5°C before cryopreservation beneficial effect on human ovarian tissue freezing. The purpose of this study was to investigate the effectiveness of perfusion intact bovine ovaries at different rates of perfusion and time elapsed between removal of the ovaries and the beginning of perfusion.

Key words: cryopreservation, cryoprotectants, ovaries, perfusion, ischemia, anastomosis.

С.Б. Байқошқарова, М.Қ. Отарбаев, Т.М. Шалахметова,
Ғ.А. Ақбердиева, Ж.Б. Сабырбек

Адамның аналық жыныс бездерінің криоконсервациясын жүргізу үлгісі ретінде In vitro жағдайындағы сиырдың тұтас жыныс бездерінің перфузиясы

Қан тамырларымен қоса тұтас аналық жыныс бездерін криоконсервация және трансплантация жасау трансплантациядан кейінгі ишемияны үрдістерін алдын алудың тиімді шешімі болып табылды. Шындығында, сүтқоректілердің интактты аналық жыныс бездерін артерия және тамыр арқы-

лы перфузия жүргізу криоконсервация үрдісінің техникалық жағынан ең бір күрделі бөлігі болып табылады. Тәжірибелік жұмыстарымыздың бірінші бөлімінде аналық жыныс бездерін (n=145) қасапханадан алғаннан бастап 1 мен 1,5 сағат аралығындағы интервалда 60 минут бойы перфузия жүргізілді. Тәжірибелік жұмыстарымыздың екінші бөлімінде аналық жыныс бездерінің (n=29) перфузиясын 25 мл/сағ (0,42 мл/мин) жылдамдықпен 60 минут бойы жүргізілді. Ертеректе белгілі болғандай, адамның аналық жыныс бездерін криоконсервация жүргізу алдында 24 сағат бойы 5°C дейін салқындату оңтайлы нәтиже бергеніне байланысты, төменгі температураларда интакты аналық жыныс бездерін криопротекторлармен перфузия жүргізу технологиясын жасау өзекті болып табылады. Әртүрлі перфузия жылдамдықтарына және қасапханадан алғаннан бастап перфузия басталғанға дейінгі уақыт аралығына қатысты сиырдың интакты жыныс бездеріндегі перфузияның тиімділігін зерттеу осы жұмыстың мақсаты ретінде алынды.

Түйін сөздер: криоконсервация, криопротекторлар, аналық жыныс бездер, перфузия, ишемия, анастомоз.

В медицине в связи с увеличением эффективности лечения рака и улучшением прогнозов для молодых женщин проблема бесплодия постракового периода играет важную роль. Так как химиотерапия зависит от выбранного типа лечения, эффект может быть гонадотоксическим и может привести к функциональной гибели яичников. Криоконсервация ткани яичников перед терапией рака с ретрансплантацией после выздоровления является ключевым решением этой проблемы [1].

Эксперименты с криоконсервацией целого коровьего яичника с сосудистой ножкой актуальна для сохранения некоторых исчезающих видов жвачных животных, а также для медицины, когда эти яичники играют роль модели человека.

В отличие от исследования различных вопросов, связанных с криоконсервацией, осуществляемой на мелких видах жвачных животных, данные о криоконсервации, проводимой на крупных видах жвачных, ограничены [2].

В недавней публикации исследовательской группы из Франции, которая является одним из лидеров криоконсервации целого яичника млекопитающих [3], было отмечено, что диффузия криопротектора в перфузированных яичниках является потенциально ограничивающим фактором, который не достаточно исследован [3].

Криоконсервация и трансплантация целого яичника с сосудами является эффективным решением предотвращения посттрансплантационной ишемии. Однако, полученные данные показывают, что после криоконсервации целых яичников их жизнеспособность уменьшается [4,5].

Разработка технологии продолжительной перфузии интактных яичников криопротекторами при низких температурах актуальна, поскольку ранее было установлено, что 24-часовое охлаждение до 5°C перед криоконсервацией

благоприятно влияет на замораживание фрагментов человеческих яичников [6]. Было установлено, что качество фолликулов и интенсивность неоваскуляризации резко возрастает в тканях яичников, предварительно охлажденных и до культивирования и до криоконсервации.

Целью данного исследования было изучение эффективности перфузии интактных коровьих яичников с различной скоростью перфузии и времени прошедшего между извлечением этих яичников и началом перфузии.

Материалы и методы

Технологии в местных скотобойнях позволяют получить яичники в течение от 10 до 15 минут после смерти животных. Яичники с сосудами были вырезаны из дорсальной аорты и помещены в термос без жидкости и доставлены в лабораторию в течение от 30 до 40 минут. В лаборатории все манипуляции при подготовке яичников к перфузии, среды для перфузии и процесс перфузии выполнялись при комнатной температуре (22 °C). Яичники были изолированы один за другим, но соединительная ткань (mesoovarium) не была удалена. Фазы яичника (фолликулярная или лютеиновая) определяли после постперфузионного рассечения яичника на отсутствие или наличие свежих (красный или оранжевый) желтых тел. Сосуды (овариальная артерия и вена) были перерезаны на расстоянии приблизительно 20-25 см под яичниками.

Овариальная артерия (внутренний диаметр 0,8-1,2 мм) была подготовлена введением катетера 22 G и фиксированием при помощи нейлоновой нити. Перфузию проводили смесью среды Лейбовица L-15 + 100 МЕ/мл гепарина + 5% телячьей сыворотки + 6% диметилсульфоксида + 6% этиленгликоля + 0,15 M сахарозы + 25% туши.

В первом цикле экспериментов, яичники (n=145) были перфузированы в течение 60 минут и интервалом от 1 до 1,5 часов после извлечения яичников на скотобойне. Скорость перфузии составляла 150 мл/час (2,5 мл/мин), 100 мл/час (1,67 мл/мин), 75 мл/час (1,25 мл/мин), 50 мл/час (0,83 мл/мин), 25 мл/час (0,42 мл/мин), и 12,5 мл/час (0,21 мл/мин) для групп 1, 2, 3, 4, 5 и 6, соответственно.

Во втором цикле экспериментов перфузию яичников (n=29) проводили с помощью Перфузатора Secura FT (B. Braun MelsungenAG, Melsungen, Germany) со скоростью 25 мл/час (0,42 мл/мин) в течение 60 минут после извлечения яичников и их хранения при комнатной температуре 3 часа (N = 18), 4 часа (N = 5), 5 часов (N = 3) и 6 часов (N = 3) для групп 1, 2, 3 и 4, соответственно. Яичники в лютеиновой и фолликулярных фазах развития были распределены в группы случайным образом. Успешная перфузия кровяных сосудов была определена визуально окрашиванием в синий цвет сосудистой ножки и овариальной ткани. По интенсивности цвета туши выявлялась перфузия тканей. Интенсивность разрушения сосудов и повреждения тканей оценивали микроскопическим методом и отмечали следующее: отсутствие нарушения (-), слабое разрушение (+), умеренное разрушение (++) , а также сильное разрушение (+++).

Эффективность перфузии оценивали с помощью десперсионного анализа. Уровень статистической достоверности был рассчитан при помощи $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

После успешной перфузии примерно 95% ткани яичников и сосудов окрасились в синий цвет. Ткань яичников с неокрашенными областями свидетельствует о неполной перфузии средой замораживания (таблица 1).

Нарушение сосудов и повреждение тканей в результате высокого давления перфузии (замораживающей средой) с различной интенсивностью (сильное (+ + +), недостаточное (+ +), и слабое (+)) наблюдались в различных скоростях перфузии, а именно 150, 100 и 75 мл/час для групп 1, 2 и 3, соответственно (таблица 1).

В первом цикле экспериментов оптимальная скорость перфузии была установлена для яичников 4 и 5 групп (50 и 25 мл/час, соответственно) (таблица 1). Во втором цикле экспериментов успешная перфузия яичников со скоростью перфузии 25 мл/ч была установлена только для яичников группы 1 (3 часа после извлечения). Эффективность перфузии в группе 2 (4 часа после извлечения) резко снижалась.

Таблица 1 – Эффективность перфузии целых яичников коровы средой для замораживания

Группы	Скорость перфузии		Количество яичников в группе, n	Насыщение ткани, %	Интенсивность разрушения сосудов и повреждения тканей
	мл/час	мл/мин			
1	150	2,5	6	95	+++
2	100	1,67	12	95	++
3	75	1,25	12	95	+
4	50	0,83	50	95	-
5	25	0,42	50	95	-
6	12,5	0,21	15	15	-

Ишемия – серьезная проблема, сопровождающая процесс извлечения ткани яичников для криоконсервации и ретрансплантации. Известно, что наличие кровеносных сосудов является очень важным фактором для успешной трансплантации ткани яичников [7]. Было показано, что пересаженные яичники у крыс стали усиленно васкуляризоваться повторно в течение 48 часов после аутоперфузии

[7]. В коре развитие первичных фолликулов полностью зависит от сосудов стромы [8]. При повторной васкуляризации трансплантаты уязвимы к ишемии, которая является главным препятствием для выживания тканей после трансплантации. Такое повреждение может привести к снижению размера трансплантата от 30 до 70% сопровождающегося фиброзными изменениями [9]. Гипоксия наблюдается в течение первых 5

дней после пересадки, и ишемические повреждения, происходящие в этот период, могут вызвать потерю примордиальных фолликулов [10] и нарушение фолликулярной активации [11, 12].

Когда мы говорим о криоконсервации целого яичника с размораживанием и ретрансплантацией через сосудистый анастомоз, проблема неоваскуляризации будет решена «автоматически». Мы провели наши исследования на коровьих яичниках, которые являются хорошей моделью криоконсервации целого яичника человека с сосудистой ножкой. Мы выбрали три «популярных» видов млекопитающих по следующим двум причинам.

Первым видом являются анатомические и физиологические факторы. Мы полностью разделяем точку зрения Gerritse соавторов [2], которые выполняли свои эксперименты с использованием коровьих яичников в качестве модельной системы для человека. Авторы пояснили, что они использовали коровьи яичники из-за следующих причин: (I) яичники сравнимы по размеру с человеческими яичниками; (II) в них созревает только один или два фолликула за цикл, созревание нескольких фолликулов существенно влияет на объем яичников и, следовательно, на исход процесса замораживания; и (III) у коров есть месячный цикл. Авторы [2] для их исследования действительно рассматривали яичники крупного рогатого скота, свиней, овец и коз в качестве возможных кандидатов для модельной системы. Измерения объемов показали, что свиные яичники сопоставимы по размерам с яичниками человека, коровьи яичники значительно больше, яичники овец и коз гораздо меньше. Эти авторы отмечают, что у свиней созревают несколько фолликулов за цикл, что может привести к изменению формы и/или сосудистой функции яичников по сравнению с яичниками, в которых каждый месяц созревает только один или два фолликула. Таким образом, эти авторы [2] выбирают коровьи яичники в качестве модельной системы [2].

Вторым видом мы выбрали корову в качестве модели для наших криоисследований по «криобиологическим» причинам. Как правило, криоисследования на тканях человека основаны на успешно используемых протоколах аналогичных экспериментов, проведенных на лабораторных и сельскохозяйственных животных. Прежде чем что-либо использовать для замораживания клеток человека, оно должно пройти успешное испытание на животных тканях. Од-

нако стоит принять во внимание, что человеческие клетки имеют свои особенности. Одним из таких особенностей, является наличие внутриклеточных липидов. Внутриклеточные липиды являются «камнем преткновения» для криоконсервации. Данные, демонстрирующие роль этих внутриклеточных структур при криоконсервации, были опубликованы [13]. Предлагаемый в нем метод включает поляризацию и перемещение цитоплазматических липидов из ооцитов или эмбрионов до криоконсервации. В 1995 году Нагашима в соавт. [13] были первыми, которые успешно получили эмбрионы из GV-ооцитов свиней, которые были криоконсервированы после делипидизации. С помощью этого метода авторы избежали отрицательных эффектов, вызванных внутриклеточными липидами. В соответствии с данными, предоставленными авторами, удаление внутриклеточных липидов не приводит к ухудшению дальнейшего развития ооцитов и эмбрионов. При успешной витрификации ооцитов после удаления цитоплазматических липидов возникает вопрос о возможном изменении физико-химических свойств цитоплазматических мембранных липидов, возникающих при низких температурах, о которых шла речь, как об одной из основных причин криобиологической проблемы во время экспериментов.

Мы считаем, что нельзя сбрасывать со счетов классические данные о роли внутриклеточных липидов, энергетических материалов ооцитов и строительных материалов для мембран будущих эмбрионов. Тот факт, что объем митохондрий, а также липидных пузырьков увеличивается во время развития ооцита до стадии метафазы II (MII), косвенно подтверждает эту точку. Кроме того, в 1992 году Sathananthan соавт., [14] показали, что в клеточном комплексе под названием «гладкой эндоплазматической сети – липидных глобул – митохондрий» существует связь. Они также показали, что эти связи могут быть повреждены после охлаждения или замораживания ооцитов.

В подавляющем большинстве работ по изучению влияния охлаждения на ооциты и эмбрионы млекопитающих отрицательное влияние криотемператур объясняется с точки зрения влияния на элементы цитоскелета. Например, охлаждение ооцитов человека вызывает деполимеризацию структуры белка цитоскелета, а у большинства ооцитов мыши, охлажденных до 25°C в течение 10 минут, имелись нарушения в цитоскелете [15].

Мы считаем, что негативный эффект охлаждения на ткани можно объяснить эффектом охлаждения липидных структур цитоскелета. Во время выполнения наших исследований мы обнаружили, что перераспределение липидов в ооцитах свиней происходит после центрифугирования в течение 48 часов в *in vitro* культивировании ооцитов, не подвергавшихся к витрификации/размораживанию. Однако при витрификации/размораживании поляризованных ооцитов липидная поляризация является необратимой. Это, на наш взгляд, позволяет предположить, что витрификация/размораживание вызывает изменение физико-химических свойств внутриклеточных липидов.

Известно, что МП ооциты более устойчивы при замораживании к повреждениям, чем ооциты на GV-стадии. Мы считаем, что это может быть связано с различиями в свойствах элементов цитоскелета. Одним из важных отличий является то, что конфигурация микротрубочек и микрофиламентов отличается на этих двух стадиях созревания ооцитов. Элементы цитоскелета в GV-ооцитах кажутся прямыми и жесткими, в то время как появление микрофиламентов и микротрубочек в ооцитах стадии МП делает их волнистыми и гибкими. На основе гипотезы о сложном взаимодействии липидной фазы клеток и элементов цитоскелета можно предположить, что затвердевание этих липидов может привести к деформации и разрушению цитоскелета. В случае GV-ооцитов в их жестком цитоскелете, видимо, происходят необратимые повреждения, в то время как у МП-ооцитов более гибкий цитоскелет препятствует появлению необратимых повреждений. Цитохалазины имеют специфические обратимые воздействия на элементы цитоскелета, делая их более гибкими и менее восприимчивыми к эффекту от охлаждения липидов.

Оптимальный протокол криоконсервации должен предотвращать изменение физико-химических свойств охлажденных липидов, избегать необратимых повреждений липидов в мембранах и везикулах, а также защищать от разрушения при охлаждении ретикулум-липидной связи.

Известно, что ооциты коров в значительной степени более криостабильны, чем ооциты свиней. Существует также информация о том, что диаметры коровьих и свиных внутриклеточных липидных везикул различны. Характеристики внутриклеточных мембран, гранул липидов также является темой для обсуждения.

Мы сравнивали ультраструктуры липидных капель и эффект охлаждения на внутриклеточные липидные везикулы коровьих и свиных GV-ооцитов [16]. Было показано, что липидные капельки коровьих клеток имеют однородную структуру. Использование липидов происходит непосредственно от этих везикул без образования промежуточных соединений липидов. В противоположность этому, существуют два вида липидных капель в свиных GV-ооцитах: «темные» и «серые».

Пузырьки каждой конкретной группы соединены друг с другом. После 12-часового культивирования формируется слой цистерн эндоплазматического ретикулума, этот слой всегда ассоциируется с «серыми» липидными везикулами. Это свидетельствует о том, что во время оогенеза липолиз происходит только в «серых» пузырьках. Предполагается, что цитоплазматический липолиз имеет два этапа: «темные» пузырьки превращаются в «серые» с последующим использованием этих «серых» липидов. Кроме того, морфология обоих типов липидных капель в ооцитах свиней меняется при охлаждении: они преобразуются от круглых в сферические формы со светящимися полосами. В липидных каплях коровьих GV-ооцитов не было выявлено никаких видимых морфологических изменений после охлаждения [16].

Для сравнения внутриклеточных липидов и криотолерантности овечьих и человеческих пронуклеарных эмбрионов мы витрифицировали эмбрионы обоих видов и оценивали ультраструктуру внутриклеточных липидов до и после витрификации.

Криоконсервацию эмбрионов проводили в соответствии с описанным ранее способом на овечьих GV-ооцитах с двумя различными методами удаления криопротекторов: поэтапной и прямой регидратацией. Мы отметили, что в отличие от пронуклеарных эмбрионов человека, где прямая регидратация имеет летальный эффект после оттаивания, напротив, овечьи пронуклеарные эмбрионы показывают высокую частоту развития в *in vitro* культивировании (31-34%) [17].

Свежие липидные капли в обоих видах (человека и коровьих ооцитах) по структуре однородны. Было отмечено, что после витрификации внутриклеточные липиды в криоконсервированных эмбрионах человека не претерпевали видимых морфологических изменений, в то время как различные изменения наблюдались в липид-

ных каплях в эмбрионах овец. Эти изменения, связанные с процессом витрификации, отражают изменения в физических и химических свойствах липидов, таких, как стабильность.

Мы полагаем, что специфика человеческих клеток, отражающая их высокую чувствительность к осмотическим процессам, связана со спецификой как внутриклеточных липидов, так и цитоплазматических и органойдных мембран. Липиды являются наиболее криолабильными внутриклеточными соединениями ооцитов и эмбрионов. Действительно, специфика внутриклеточных липидов в ооцитах свиней делает их практически непригодными для криоконсервации, особенно для витрификации. Было установлено, что внутриклеточные липиды в свежих клетках человека до и после витрификации не имеют никаких изменений. Мы сравнили эти липиды с теми, которые в овечьих клетках, применяя для них такой же протокол, который был использован для ооцитов человека с прямой регидратацией в наших предыдущих исследованиях. Эти липиды в жизнеспособных эмбрионах показали ультраструктурные изменения после витрификации, не выявленные в ооцитах человека [18].

Принимая во внимание резистентность клеток овец к прямой регидратации при размораживании увеличивается плотность, и происходят морфологические изменения во внутриклеточных липидах во всех овечьих ооцитах подверженных охлаждению. Эти изменения отсутствовали во всех человеческих ооцитах, которые однозначно не могут переносить прямую регидратацию. Можно предположить, что в пределах одной клетки структура внутриклеточных и мембранных липидов является одинаковой. Учитывая отрицательную роль липидов в процессе криоконсервации, криостабильность липидов и, напротив, осмотическая нестабильность клеток человека еще далеко не полностью изучены. Прямая регидратация после размораживания вызывает летальный осмотический эффект в человеческих пронуклеарных ооцитах, но эта методика успешно используется на овечьих ооцитах. Корреляция между криостабильностью ооцитов млекопитающих и ультраструктурой внутриклеточных липидов является целью дальнейших исследований. Учитывая, что ультраструктура внутриклеточных липидов лабораторных и сельскохозяйственных животных отличается от внутриклеточных липидов человека, мы считаем, что использование жи-

вотных ооцитов в качестве модели для человеческих ооцитов в криоисследованиях является сомнительной [26].

Однако принимая во внимание все приведенные выше данные посредством трех видов сельскохозяйственных животных, свиньи, коровы и овцы, коровья яичниковая ткань является наиболее подходящей моделью для человека, поскольку внутриклеточные и мембранные липиды являются наиболее чувствительны к осмотическому влиянию, как у клеток человека. Только поэтому коровья модель была использована в наших экспериментах.

На сегодняшний день нет никаких данных об успешной трансплантации человеческих интактных яичников с сосудистой ножкой после криоконсервации. Тем не менее криоконсервация целого яичника с сосудистыми анастомозами и ретрансплантацией после размораживания может рассматриваться как перспективная стратегия для больных раком. Были описаны случаи трансплантации незамороженных яичников с сосудистыми анастомозами человека и была зафиксирована одна беременность [19].

Проблема криоконсервации яичников с нетронутой сосудистой ножкой у животных еще далеко не решена. Несмотря на многочисленные попытки и доказательства восстановления долгосрочного развития фолликулов, были зафиксированы только три случая рождения ягнят после ретрансплантации замороженных овечьих яичников [4, 5].

Недавно была показана важная роль среды с криопротекторами в перфузии целого яичника овцы [3]. Было проведено обширное исследование на 360 яичниках овец, окрашенных *in vitro* путем перфузии с качественным маркером кровоснабжения тканей. Модель логистической регрессии была построена, чтобы определить факторы, связанные с неполным окрашиванием яичника. Целые яичники овец с их сосудистой ножкой были перфузированы при 0,35 мл/мин в течение 2 часов при 39°C в 19 различных экспериментальных условиях. Ножки были удалены, яичники разрезали и сфотографировали. Неокрашенные места на разрезанной поверхности были измерены. У 64,4% яичников наблюдались неокрашенные участки. Многомерный анализ показал, что неполное окрашивание яичников было независимо от малого опыта экспериментатора, меньшей поверхности среза яичников, и наличия желтого тела. Наличие неокрашенных участков не зависело от экспериментальных ус-

ловий. Частота неполного окрашивания яичников снизилась с 83% до 60% [3]. Из этих экспериментов можно сделать следующий вывод, что нарушения кровоснабжения, которые приводят к неполной перфузии, могут отрицательно сказаться на последующих результатах криоконсервации целого яичника. Улучшенные методы перфузии должны положительно повлиять на успех криоконсервации [3]. Перфузия тушью в исследованиях Gerritse соавт. [2] проводилась на интактных коровьих яичниках. Авторы отметили, что более крупные сосуды были хорошо перфузированы, в то время как более мелкие и капилляры были менее хорошо перфузированы. Авторы предположили, что относительно меньшая молекулярная масса криопротекторов, таких, как диметилсульфоксид и сахаразы, позволяет быть менее подверженными молекулярным механизмам фильтрации эндотелиальными клетками и базальными мембранами [2]. В наших экспериментах в качестве раствора для перфузии была использована смесь, которая включает в себя 5% телячьей сыворотки + 6% диметилсульфоксида + 6% этиленгликоля + 0,15 М сахаразы, являющейся средой для замораживания. В самом деле, присутствие из этих компонентов не приводит к увеличению проницаемости перфузирующей среды в мелких капиллярах. Наличие криопротекторов (особенно

непроницающего криопротектора сахаразы) и сыворотки теленка в перфузирующем растворе можно объяснить тем, что для успешной перфузии мелких кровеносных сосудов и особенно капилляров [2] (2,5 мл/мин). Увеличение скорости перфузии в яичниках группы 3 (1,25 мл/мин) приводит к разрывам сосудов и повреждению тканей.

Время, прошедшее между гибелью животных в бойне и извлечением яичников, а также началом процесса перфузии, является важным параметром технологии криоконсервации, поскольку влияет на ишемическое повреждение яичников. Мы показали, что этот период при комнатной температуре не должен превышать 3 часов, потому что за это время начинается закупорка маленьких и больших сосудов коагулированными эритроцитами. Конечно, это время может быть увеличено с помощью более низких температур для транспортировки яичников. Для проведения эффективной перфузии коровьих интактных яичников с сосудистой ножкой необходимо использовать замораживающую среду (6 % этиленгликоль + 6% диметилсульфоксид + 0,15 М сахаразы) при комнатной температуре, со скоростью перфузии 25 или 50 мл/час. Кроме того, яичники должны быть перфузированы в течение 3 часов после смерти животных.

Литература

- 1 Dittrich R., Maltaris T., Hoffmann I., et al. Fertility preservation in cancer patients // *Minerva Gynecology*. – 2010. – № 62. – P. 51-59.
- 2 Gerritse R., Beerendonk C.C., Tijink M.S., et al. Optimal perfusion of an intact ovary as a prerequisite for successful ovarian cryopreservation // *Human Reproduction*. – 2008. – № 23. – P. 329-335.
- 3 Torre A., Ben Brahim F., Popowski T., et al. Factors related to unstained areas in whole ewe ovaries perfused with a metabolic marker // *Human Reproduction*. – 2013. – № 28. – P. 423-429.
- 4 Grazul-Bilska A.T., Banerjee J., Yazici I., et al. Morphology and function of cryopreserved whole ovine ovaries after heterotopic autotransplantation // *Reproduction Biology and Endocrinology*. – 2008. – № 6. – P. 16-18.
- 5 Onions V.J., Mitchell M.R., Campbell B.K., Webb R. Ovarian tissue viability following whole ovine ovary cryopreservation: assessing the effects of sphingosine-1-phosphate inclusion // *Human Reproduction*. – 2008. – № 23. – P. 606-618.
- 6 Isachenko V., Isachenko E., Mallmann P., Rahimi G. Long-time cooling of human ovarian tissue before cryopreservation as obvious procedure: stimulation of follicular development and neo-vascularisation // *Clinical Laboratory*. – 2012. – № 58. – P. 1293-300.
- 7 Weissman A., Gotlieb L., Colgan T., et al. Preliminary experience with subcutaneous human ovarian cortex transplantation in the NOD-SCID mouse // *Biology Reproduction*. – 1999. – № 6. – P. 1462-1467.
- 8 Disson G.A., Lara H.E., Fahrenbach W.H. Immature rat ovaries become revascularized rapidly after autotransplantation and show a gonadotrop independent increase in angiogenic factor gene expression // *Endocrinology*. – 1994. – № 134. – P. 1146-1154.
- 9 Kim S.S., Soules M.R., Battaglia D.E. Follicular development, ovulation, and corpus luteum formation in cryopreserved human ovarian tissue after xenotransplantation // *Fertility and Sterility*. – 2002. – № 78. – P. 77-82.
- 10 Aubard Y., Piver P., Cogni Y., et al. Orthotopic and heterotopic autografts of frozen-thawed ovarian cortex in sheep // *Human Reproduction*. – 1999. – № 14. – P. 2149-2154.

- 11 Donnez J., Martinez-Madrid B., Jadoul P., et al. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: a review // *Human Reproduction Update*. – 2006. – № 12. – P. 519-535.
- 12 Dolmans M.M., Martinez-Madrid B., Gadisseux E., et al. Shortterm transplantation of isolated human ovarian follicles and cortical tissue into nude mice // *Reproduction*. – 2007. – № 134. – P. 253-262.
- 13 Nagashima H., Kashiwazaki N., Ashman R.J., et al. Cryopreservation of porcine embryos // *Nature*. – 1995. – № 374. – P. 416-418.
- 14 Sathananthan A.H., Kirby C., Peura A., Trounson A. Mouse oocyte cooling // *Journal of Assisted reproductive genetics*. – 1992. – № 9. – P. 138-148.
- 15 Pickering S.J., Braude P.R., Johnson M.H. Transient cooling to room temperature can cause irreversible disruption of the meiotic spindle in the human oocyte // *Fertility and Sterility*. – 1990. – № 54. – P. 102-108.
- 16 Isachenko V., Michelmann H.W., Alabart J.L., et al. Lipolyse and ultra-structural changes of an intracellular lipid vesicles after cooling of bovine and porcine GV-oocytes // *Anatomy Histology and Embryology*. – 2001. – № 30. – P. 333-338.
- 17 Isachenko V., Alabart J.L., Nawroth F., et al. The open pulled straw vitrification of ovine GV-oocytes: positive effect of rapid cooling or rapid thawing or both? // *Cryo Letters*. – 2001. – № 22. – P. 157-162.
- 18 Van der Ven H., Isachenko V., Isachenko E., et al. Vitrification of pronuclear embryos: research basis for aseptic technology and its application to oocytes and blastocysts. – London: Informa Healthcare, 2008 – 210 p.
- 19 Hilders C.G., Baranski A.G., Peters L. Successful human ovarian autotransplantation to the upper arm // *Cancer*. – 2004. – № 101. – P. 2771-2778.