УДК 611.651.15.085.23:615.832.9

И.В. Добрунова, Н.Н. Чуб*, М.П. Петрушко

Культивирование клеток гранулезы и кумулюса после гипотермического хранения

UDC 611.651.15.085.23:615.832.9

I.V. Dobrunova, N.N. Chub*, M.P. Petrushko

Culturing of Granulosis and Cumulus Cells After Hypothermic Storage

Основными функциями яичников человека являются стероидогенез и оогенез. При росте и созревании фолликула в яичнике ооцит расположен на одном из полюсов фолликула и окружен слоем фолликулоцитов (лучистым венцом – кумулюсом). Остальные фолликулярные клетки (клетки гранулезы) образуют слой, который ограничивает полость фолликула, и содержат многочисленные пиноцитозные пузырьки, участвующие в продукции фолликулярной жидкости [1]. Клетки гранулезы под влиянием фолликулостимулирующего гормона являются основным продуцентом (более 90%) 17β-эстрадиола в фолликуле [4]. В настоящее время в связи с развитием метода оплодотворения вне организма появилась возможность получения изолированных фрагментов клеток гранулезы и кумулюса (КГК), что позволило расширить исследования по изучению влияния различных физико-химических факторов на КГК, взаимодействия данного комплекса клеток с ооцитом *in vitro*, а также использовать их для сокультивирования и других биотехнологий.

Известно, что после выделения органа или ткани из организма адаптационные механизмы сохраняют структурно-функциональную полноценность клеток и обеспечивают их приживление после трансплантации [2].

Цель работы – изучить влияние гипотермического хранения на сохранность клеток гранулезы и кумулюса яичников человека в условиях культивирования.

Материалы и методы

Фолликуляную жидкость (ФЖ) с КГК (n=15) получали с согласия женщин, проходивших программу экстракорпорального оплодотворения в медицинских центрах “Имплант” и “ART-Klinika”. Полученные ооцит-корона-кумулюсные комплексы, которые по морфологическим критериям соответствовали 3–4-й степени зрелости, помещали в

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

* *Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:* ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.:+38 (057) 373-31-19, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта: cryo@online.kharkov.ua

The main functions of ovaries are steroidogenesis and oogenesis. During growth and maturation of follicle in an ovary an oocyte is located at one of the follicle poles and is surrounded with the layer of folliculocytes (corona radiate, cumulus). The rest of follicular cells (granulosis cells) form the layer, limiting the cavity of follicle and contain numerous pinocytotic vesicles, participating in the production of follicular fluid [1]. Granulosis cells under the effect of follicle-stimulating hormone are basic producers of 17 β-estradiol (above 90%) in follicle [4]. Nowadays due to the development of the IVF technologies the possibility to obtain isolated fragments of the granulosis and cumulus cells (GCC) have appeared, this enabled the extending of the researches of studying the interaction of this complex of cells with oocyte in vitro, as well as investigating the effect of various physical and chemical factors on GCC and using them for co-culturing and other biotechnological protocols.

It is known that in a cell for a certain time period after isolation of an organ or tissue form an organism the adaptation mechanisms preserve structural and functional integrity of cells and provide their grafting after transplantation [2].

The research aim is to study the effect of hypothermic storage on integrity of granulosis and cumulus cells of human ovaries under culturing conditions.

Materials and methods

Follicular fluid (FF) with GCC (n =15) was derived on informed consent of the women, participating in IVF program in the medical centers “Implant” and “ART-Klinika”. The obtained “oocyte-corona-cumulus” complexes, which are on morphological criteria corresponded to the 3rd–4th grade of maturity were placed into nutritive medium into CO_2-incubator for culturing and following insemination. Follicular fluid with GCC fragments was collected into plastic vials,

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

* *To whom correspondence should be addressed:* 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.:+380 57 373 3119, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

питательную среду в CO_2-инкубатор для культивирования и дальнейшей инсеминации. Фолликулярную жидкость с фрагментами КГК собирали в стерильные пластиковые пробирки, транспортировали в ИПКиК НАН Украины на льду и хранили до культивирования при температурах 3–4 и 18–20°С в течение 1–2 и 20–24 ч. Фрагменты КГК (2–4 мм^2) отмывали от ФЖ и клеток крови в среде культивирования и помещали в 4-луночные планшеты или чашки Петри (d=5 см) в капли с питательной средой под минеральным маслом. Контролем служили образцы, которые помещали сразу после отбора ооцитов в условия культивирования (37°С, 5% CO_2 в воздухе). Для исследования использовали следующие среды: 1 – Менезо-В2; 2 – среда 199, содержащая 10% криоконсервированной ФЖ; 3 – среда 199, содержащая 10% эмбриональной сыворотки; 4 – среда HEM F-10 с 200 мМ l-глютамина; 5 – HTF. Состояние культуры оценивали под инвертированным микроскопом (при ×120, 480) фирмы Leitz (Германия) на 3-, 7-, 10- и 14-е сутки культивирования. Фотосъемку препаратов осуществляли на микроскопе фирмы Carl Zeiss (Германия).

Результаты и обсуждение

Для успешного культивирования клеток и тканей необходимы контроль и точное соблюдение осмолярных, температурных, газовых и других характеристик. Отклонение от нормы этих параметров может привести к гибели клеточной культуры или появлению хромосомных или генных аномалий. В работе не использовали компактные, многослойные КГК.

В результате исследования тканевой погруженной культуры наблюдали адгезию и миграцию КГК на 3-и сутки культивирования во всех средах, кроме среды HTF. В контроле клетки мигрировали уже на 2-е сутки культивирования, что согласуется с данными [3]. На 7-е сутки культивирования отмечали множественную миграцию клеточных элементов по подложке. Клетки имели округлую форму с мелкозернистой цитоплазмой. На 10-е сутки культивирования определяли участки КГК с активно пролиферирующими фибробластоподобными элементами (рисунок), а также многослойные фрагменты с тонкогранулированной цитоплазмой. К 14-м суткам большинство клеток и фрагментов открепялось от дна чашки, что свидетельствует о наступлении фазы старения культуры. Имели место конденсированные участки КГК. В экспериментах не установлены существенные различия в состоянии образцов в зависимости от температуры и срока хранения КГК до культивирования.

Таким образом, полученные результаты показали, что гипотермическое хранение КГК не влияет на морфологическую сохранность клеток в куль-

transported on ice to IPC&C of the National Academy of Sciences of Ukraine and then stored at 3-4 and 18-20°C for 1-2 and 20-24 hrs. GCC fragments (2-4 mm^2) were washed out from FF and blood cells in culturing medium and placed into 4-wells' plates or Petri dishes (d = 5 cm) into drops with nutritive media with mineral oil.

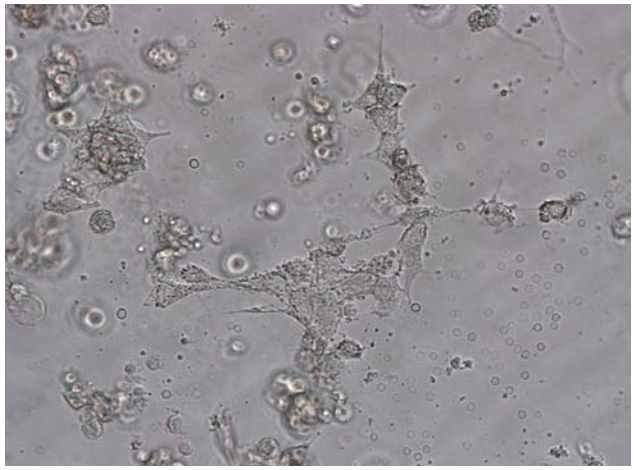
The samples placed immediately after the selection of oocytes into culturing conditions (37°C, 5% CO_2, in air) served as the control. For investigations the following media were used: 1 – Meneso-B2; 2 – medium 199, containing 10% of cryopreserved FF; 3 – medium 199, containing 10% fetal serum; 4 – HEM F-10 with 200 mM 1-glutamin; 5 – HTF. Culture state was assessed with inverted microscope (×120, 480) (Leitz, Germany) to the 3-, 7-, 10- and 14-th day of culturing. The preparations were recorded with Carl Zeiss microscope (Germany).

Results and discussion

For successful culturing of cells and tissues the control and distinct keeping of osmolar, temperature, gas and other characteristics are necessary. The deviation of these parameters from the norm may lead to the death of cell culture or appearance of chromosome or gene abnormalities. In the paper no compact, multilayer GCC.

In the result of the studies of tissue embedded culture the adhesion and migration of GCC to the 3rd day of culturing in all the media except HTF one were observed. In the control the cell migrated even to the 2nd day, that is confined with the data [3]. To the 7th day of culturing multiple migration of cell elements on embedding was noted.

The cells were of roundish shape with finely grained cytoplasm. To the 10th day of culturing there were found GCC sites with actively proliferating fibroblast-like elements (Figure) as well as multilayer



Культивирование КГК (10-е сутки) после гипотермического хранения при 4°С в течение 24 ч

GCC culturing at the 10th post-hypothermic storage day at 4°C for 24 hrs.

туре, что согласуется с данными, полученными при трансплантации иммунодефицитным мышам жизнеспособного изолированного овариального кортекса и примордиальных фолликулов, которые хранились на льду в течение 4-х часов до подсадки [5]. Можно предположить, что высокий адаптационный потенциал и компенсаторно-приспособительная реакция данных клеток генетически детерминированы для защиты ооцита от неблагоприятных условий среды. Возможно, толерантность КГК к низким положительным температурам зависит от воздействия на организм гормональных препаратов, используемых для стимуляции суперовуляции.

Выводы

Показано, что гипотермическое хранение КГК в течение 24 ч не влияет на морфологическую сохранность единичных клеток и материнских фрагментов в условиях тканевой культуры.

Литература

1. *Йен С.К., Джаффе Р.Б.* Репродуктивная эндокринология.– М.: Медицина, 1998.– Т. 1.– С. 269–309.
2. *Медведев П.М.* Принципы консервирования ткани и органов для целей трансплантации // Хирургия.– 1977. – №8.– С. 46–51.
3. *Чуб Н.Н., Айдаева М.В., Алипова Е.К.* Морфофункциональное состояние фолликулярных клеток и кумулюса человека // Бесплодие. Вспомогательные репродуктивные технологии.– Киев, 1997.– С. 116–117.
4. *McNatty K.P., Baird D.T., Bolton A. et al.* Concentration of oestrogens and androgens in human ovarian venous plasma and follicular fluidthroughout the menstrual cycle // J. Endocrinol.– 1976.– N2.– P. 71–77.
5. *Schmidt K.L., Ernst E., Byskov A.G., et al.* Survival of primordial follicles following prolonged transportation of ovarian tissue prior to cryopreservation // Hum Reprod.– 2003.– Vol. 18, N12.– P. 2654–2659.

Поступила 20.05.2008

fragments with finely granulated cytoplasm. To the 14th day the majority of cells and fragments detached from the dish bottom, that testified to an onset of culture aging phase. There were condensed sites of GCC. In the experiments significant difference sin the state of the samples depending on temperature and storage term of GCC prior to culturing have been established.

Thus the obtained results have shown that hypothermic storage of GCC does not affect morphological integrity of cells in culture, thta conforms with the data? obtained during transplantation to immune defficient mice of viable isolated ovarial cortex and primordial follicles, stored on ice for 4 hrs prior to grafting [5]. One may suppose that high adaptation potential and compensatory-adaptive reaction of these cells are genetically determined for the protection of oocyte from unfavorable environmental conditions. GCC tolerance to low positive temperatures likely depends on the effect on an organism of hormonal preparations, used for stimulation of superovulation.

Conclusions

Hypothermic storage of GCC for 24 hrs has been shown as not affecting the morphological integrity of single cells and mother's fragments under conditions of tissue culture.

References

1. *Yen S.K., Jaffe R.B.* Reproductive endocrinology. – Moscow: Meditisna, 1998.– Vol. 1.– P. 269-309.
2. *Medvedev P.M.* Principles of preservation of tissues and organs for transplantation// Khirurgiya.– 1977.– N8.– P. 46-51.
3. *Chub N.N., Aidayeva M.V., Alipova E.K.* Morphofunctional state of human follicular cells and cumulus// Infertility. Assisted reproductive technologies.– Kiev, 1997.– P. 116–117.
4. *McNatty K.P., Baird D.T., Bolton A. et al.* Concentration of oestrogens and androgens in human ovarian venous plasma and follicular fluidthroughout the menstrual cycle // J. Endocrinol.– 1976.– N2.– P. 71–77.
5. *Schmidt K.L., Ernst E., Byskov A.G., et al.* Survival of primordial follicles following prolonged transportation of ovarian tissue prior to cryopreservation // Hum. Reprod.– 2003.– Vol. 18, N12.– P. 2654–2659.

Accepted in 20.05.2008