

^{1,2}Сейсенбаева А.С.,
¹Тойшибеков Е.М.,
¹Игманов У.И.,
¹Валиева Б.А.,
^{1,2}Есимсиитова З.Б.

¹Институт экспериментальной биологии имени Ф.М. Мухамедгалиева, Казахстан
Алматинская обл.,
²Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы

Влияние различных криопротекторов на жизнеспособность ткани яичника овец при замораживании в парах жидкого азота

^{1,2}Seisenbayeva A.S.,
¹Toishibekov Y.M.,
¹Iglmanov U.I.,
¹Valieva B.A.,
^{1,2}Yessimsiitova Z.B.

¹Institute of Experimental Biology named after F. Mukhamedgaliyev, Kazakhstan, Almaty
²Al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, Almaty

Influence of various cryoprotectors on survival of sheep's ovarian tissue with freezing in vapors of liquid nitrogen

^{1,2}Сейсенбаева А.С.,
¹Тойшибеков Е.М.,
¹Игманов У.И.,
¹Валиева Б.А.,
^{1,2}Есимсиитова З.Б.

¹Ф.М.Мұхамедғалиев атындағы эксперименттік биология институты, Қазақстан, Алматы обл.
²Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Қазақстан, Алматы қ.

Сұйық азот буында мұздатылған қойдың аналық без ұлпасының өміршеңдігіне әртүрлі криопротекторлардың әсері

© 2016 Al-Farabi Kazakh National University

Современные методы вспомогательной репродуктивной технологии используются не только для сохранения репродуктивного потенциала человека, но и для сохранения биоразнообразия диких и исчезающих видов сельскохозяйственных животных. В настоящее время методы искусственного оплодотворения и трансплантации эмбрионов хорошо развиты и используются в программах разведения и сохранения. Для получения ооцитов и эмбрионов необходимо проводить стимуляцию яичников, требующую время в зависимости от вида животных. Стимуляция яичников не приемлема в экстренных случаях. Кроме того, полученные в меньшем количестве ооциты *in vivo* не гарантируют максимального сохранения генетического материала. Поэтому альтернативным методом сохранения генетического материала является криоконсервация незрелых ооцитов в примордиальных фолликулах, расположенных в коре яичника. В связи с тем, что яичник содержит большое количество фолликулов, то криоконсервация ткани яичника имеет преимущества перед криоконсервацией ооцитов и эмбрионов. В данном исследовании криоконсервацию ткани яичника овец аборигенной Чуйской популяции проводили в парах жидкого азота на высоте 5 см от поверхности в течение 20 минут с использованием различных криопротекторов: 1,5 М диметилсульфоксид (ДМСО), 1,5 М пропиленгликоль (ПГ), 1,5 М этиленгликоль (ЭГ) и 1,5 М глицерин (ГЛ). Анализ сравнительного гистологического изучения показывает, что использование 1,5 М ПГ и 1,5 М ДМСО является наиболее эффективными для сохранения жизнеспособности овариальных фолликулов.

Ключевые слова: глицерин, диметилсульфоксид, замораживание, пропиленгликоль, ткани яичника, фолликул, этиленгликоль.

Biological diversity is the key to maintaining life. Therefore preservation of biodiversity is important for sustaining a healthy Earth, but it also is immensely valuable to the health and lifestyle of human society. Today new methods of auxiliary reproductive technology allow using them not only for preservation of reproductive potential of the person, and also for preservation a biodiversity of wild and endangered species of farm animals. Captive breeding programs, genetic resource banks and artificial reproductive techniques have been suggested as important tools for conservation. Today, biotechnological methods, such as artificial insemination and transplantation of embryos are well developed and are used in programs of animal husbandry and preservation. Receiving oocytes and embryos requires stimulation of ovaries on what some time depending on a species of animals usually is required. These methods are not acceptable in case of emergency, and the *in vivo* received oocytes in smaller quantity do not guarantee the maximum storage of genetic material. Therefore an alternative method of preservation of genetic material is the cryopreservation of immature oocytes in the primordial follicles which are located in ovary cortex. The procedure of ovarian tissue cryopreservation permits conservation of hundreds of immature oocytes kept within the protective environment of the original ovarian tissue. An important advantage of this technique that the hormonal stimulation is not required in this case. Additionally, because the primordial follicles are small and have a simple structure, they are much more tolerant to manipulation and to the freeze-thaw procedure compared with the large growing follicles. A key element of a good cryopreservation to cell survival is the physiochemical relationship of heat and water transport between the intra- and extracellular environment. The art of cryobiology involves the addition of one or more cryoprotectants which generally reduce both the eutectic and freezing points. Therefore the purpose of this work is identification of an optimum method of a cryopreservation of sheep's ovarian tissue using of various cryoprotectors. In the present study, the cryopreservation of indigenous Chui population sheep's ovarian tissue was conducted in vapors of liquid nitrogen at distance of 5 cm from surface within 20 minutes with use of various cryoprotectors: 1,5 M dimethyl sulfoxide (DMSO), 1,5 M propylene glycol (PG), 1,5 M ethylene glycol (EG) and 1,5 M glycerol (HL). The analysis of comparative histology studying shows that use 1,5 M PG and 1,5 M DMSO has more effective effect on viability of ovarian follicles, than use 1,5 M EG and 1,5 M HL.

Key words: dimethyl sulfoxide, ethylene glycol, freezing, follicles, glycerol, ovarian tissue, propylene glycol.

Қосымша репродуктивті технологияның жаңа әдістері адамдардың репродуктивті потенциалын сақтаумен қатар жабайы және сиреп бара жатқан үй жануарларының биоалуантүрлілігін сақтау мақсатында да қолданылады. Соның ішінде қолдан ұрықтандыру мен эмбрионды трансплантациялау қазіргі кезде жақсы жетілген әдістер болып саналады. Сондықтан бұл әдістер жануарлар биотехнологиясы саласында, көбейту мен сақтау бағдарламаларында кең қолданысқа ие. Бірақ ооциттер мен эмбриондарды криоконсервациялаудың кемшілігі – оларды алу үшін аналық безді стимуляциялау керек, бұл процесс жануарлардың түріне байланысты белгілі бір уақытты қажет етеді. Бұл әдістер тез арада пайдалануға жарамсыз, ал *in vivo* жолымен алынған ооциттердің саны аз болғандықтан генетикалық материалды максимальды деңгейде сақтауға жеткіліксіз болып саналады. Ұсынылып отырған зерттеу жұмысында аборигенді Шу популяциясы қойының аналық без ұлпасы әртүрлі криопротекторларды: 1,5 М диметилсульфоксид (ДМСО), 1,5 М пропиленгликоль (ПГ), 1,5 М этиленгликоль (ЭГ) және 1,5 М глицеринді (ГЛ) қолдана отырып сұйық азоттың буында 5 см биіктікте мұздатылды. Салыстырмалы гистологиялық талдау әдісі бойынша сұйық азот буында мұздату кезінде криопротектор ретінде 1,5 М ПГ мен 1,5 М ДМСО қолдану без фолликулдарының өміршеңдігіне эффективті әсер ететіні белгілі болды.

Түйін сөздер: аналық без ұлпасы, глицерин, диметилсульфоксид, мұздату, пропиленгликоль, фолликул, этиленгликоль.

¹Институт экспериментальной биологии имени Ф.М. Мухамедгалиева,
Алматинская обл., Республика Казахстан

²Казахский национальный университет имени аль-Фараби,
Республика Казахстан, г. Алматы

*E-mail: S_akerke@mail.ru

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ КРИОПРОТЕКТОРОВ НА ЖИЗНЕСПОСОБ- НОСТЬ ТКАНИ ЯИЧНИКА ОВЕЦ ПРИ ЗАМОРАЖИВАНИИ В ПАРАХ ЖИДКОГО АЗОТА

Введение

Исходя из положений Международной конвенции о биологическом разнообразии одной из первоочередных задач является «сохранение, устойчивое использование и инвентаризация генетических ресурсов живых организмов». В конвенции подчеркивается значение сохранения и регионального использования генетических ресурсов для продовольствия и сельского хозяйства, с учетом взаимозависимости стран, обладающих этими ресурсами, для продовольственной безопасности планеты. В республике Казахстан работы по сохранению биоразнообразия ведутся в основном посредством сохранения диких популяций редких видов животных. Однако доступными и экономически целесообразными методами сохранения генетического ресурса животных *in vitro* в настоящее время являются криосохранение репродуктивных клеток, эмбрионов и тканей [1, 2]. Во всех развитых странах созданы национальные программы по сохранению, воспроизводству и исследованию пород сельскохозяйственных животных. Приоритетными объектами охраны в агробиоценозах являются сорта культурных растений и локальные породы одомашненных животных [3, 4]. Наиболее общими критериями при сохранении локальных пород являются: жизнеспособность, адаптивность, состояние здоровья, воспроизводительные способности, а также уникальный генетический полиморфизм на молекулярном и морфологическом уровнях [5]. В связи с этим становится актуальной сохранения генофондов локальных сельскохозяйственных видов животных, представляющих генетическую ценность.

В настоящее время для сохранения генетических ресурсов животных используются такие современные методы биотехнологии как культивирование и оплодотворение яйцеклеток, криоконсервация гамет и тканей [6, 7]. Криоконсервация ткани яичника, содержащей примордиальные фолликулы, позволяет сохранить женских гамет в максимальном количестве. Яичники млекопитающих содержат тысячи яйцеклеток, заключенных в фолликулы, что представляет 90% фолликулярной популяции. Сохранения ткани яичника позволяет получить сотни незрелых ооцитов *in situ* без необходимости индукции

овуляции. Криоконсервация ткани яичника имеет большие преимущества в виду большого содержания фолликулов и меньшее количество этических дилемм [8, 9]. Вероятность успешности этого метода объясняется следующими положениями: ооцит менее дифференцирован, имеет небольшие размеры, клеточную стадию деления (профаза 1-го мейотического деления), низкую метаболическую активность, отсутствие прозрачной оболочки, монослой клеток гранулезы, корковые гранулы не существуют и фолликул менее чувствителен к ишемии [10]. Метод низкотемпературного консервирования ткани яичника состоит из нескольких этапов: забор ткани, инкубация с криопротектором, замораживание и отогрев. От подбора оптимальных условий на всех перечисленных выше этапах зависит сохранение жизнеспособности ткани яичника. Современные направления криоконсервации ткани яичника включают оптимизацию протоколов замораживания/размораживания и технологии культивирования, чтобы сохранить максимальный пул фолликулов с целью увеличения количества жизнеспособных фолликулов после криоконсервации. При этом разработка криогенной технологии сохранения генома животных способствует международному обмену геноматериалами, созданию банка их генофонда.

Целью данной работы является исследование степени жизнеспособности фолликулов при замораживании ткани в парах жидкого азота с использованием различных криопротекторов для выявления оптимального метода криоконсервации ткани яичника овец.

Материалы и методы

Коллекция кортикальной ткани и разделение на группу.

Объектом исследования служили яичники 2,5-годовалых овец абorigine Чуйской популяции. Яичники были взяты путем забоя животных, транспортированы в лабораторию при 37°C в фосфатно-солевом буфере Дюльбекко (ФСБД). Яичники в количестве 8 экземпляров освободили от связок и промыли несколько раз в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) с антибиотиками (пенициллин, стрептомицин). После снятия макроскопических данных яичники помещали в буфер Herpes 199 с 10% антибиотиком, удаляли мозговую часть яичника, кортикальную часть разделили на мелкие кусочки с размером 1x5x10 мм с помощью одноразового скальпеля. Затем полученные образцы поделили на 5 подо-

пытных групп по принципу аналогов: 1) криопротектор 1,5 М ДМСО; 2) криопротектор 1,5 М ЭГ; 3) криопротектор 1,5 М ПГ; 4) криопротектор 1,5 М ГЛ; 5) контрольная группа не подвергалась воздействию криопротекторов и не замораживалась.

Криоконсервация ткани яичника (замораживание и размораживание)

Для эквilibрации использовали трехэтапное введение криопротекторов во всех подопытных группах:

1) 0,3 М криопротектор (ДМСО; ЭГ; ПГ; ГЛ) на ФСБД + 0,5 М сахараза. Образцы эквilibрировали в течение 5 мин.;

2) 0,75 М криопротектор (ДМСО; ЭГ; ПГ; ГЛ) на ФСБД + 0,5 М сахараза. Образцы эквilibрировали в течение 5 мин.;

3) 1,5 М криопротектор (ДМСО; ЭГ; ПГ; ГЛ) на ФСБД + 0,5 М сахараза. Образцы эквilibрировали в течение 10 мин.

Для замораживания образцов использовали соломинки (IMV technologies, Франция) емкостью 0,5 см³. Заполнение и запаивание промаркированных соломинок проводили в течение 10 минут до начала замораживания. За это время образцы эквilibрировались (3-й этап введения криопротектора) в размораживающем растворе. Временной интервал от помещения образца в среду с криопротектором до начала охлаждения не превышал 10-20 минут. Образцы в соломинках замораживали в парах жидкого азота на высоте 5 см от поверхности в течение 20 минут, затем погружали в жидкий азот и хранили в сосудах Дьюара.

Для размораживания замороженные образцы в соломинках 5 сек. держали в атмосферном воздухе при комнатной температуре, затем помещали в водяную баню при температуре 37°C. Время экспозиции в водяной бане визуальнo контролировали присутствием льда в пробирке; как только лед был истончен до 1-2 мм и извлекали образцы с раствора в чашки Петри. Для выведения криопротекторов кусочки ткани последовательно помещали в следующие растворы:

- 0,75 М сахараза + 10% ФТС (фетальная телячья сыворотка) + ФСБД в течение 10 мин.;
- ФСБД + 10% ФТС в течение 30 мин.;
- в питательной среде для *in vitro* культивирования ткани в течение 15 мин [11].

Все реактивы, использованные в исследовании, фирмы «Sigma-Aldrich» (США).

Гистологическая обработка

Контрольные и размороженные образцы ткани яичника фиксировали в 10% нейтраль-

ном формалине в течение 24 часов, дегидратировали и заключали в парафиновые блоки. С каждого образца делали серийные срезы толщиной 5 мкм, окрашивали гематоксилин-эозином и по Ван Гизону [12]. Исследование полутонких и гистологических препаратов осуществляли с использованием светового микроскопа при увеличениях объектива х20 и х40. Микрофото съемку осуществляли с помощью микроскопа Zeiss Axiostar plus, «Видеотест морфология» (Carl Zeiss, Германия). Анализ гистологических срезов осуществляли, изучая только фолликулы с видимым ядром для исключения повторного счета одного и того же фолликула в анализируемом срезе.

Жизнеспособность ткани яичника определяли по целостности структуры примордиальных, первичных, вторичных и антральных фолликулов в гистосрезе. Морфологию фолликулов идентифицировали согласно классификации К. Октау [13], модифицированной по Cougeon [14]: примордиальный – ооцит окружен одним слоем уплощенных гранулезных клеток; первичный – ооцит окружен одиночным слоем кубических клеток гранулезы; преантральный – ооцит окружен более чем двумя слоями гранулезных клеток, расположенных на базальной мембране, вокруг которой находятся единичные тека-клетки; антральный – ооцит увеличен в объеме, окружен несколькими слоями гранулезных клеток, формируется полость, содержащая фолликулярную жидкость.

Результаты исследования

Микроскопический анализ препаратов свежей ткани окрашенных гематоксилин эозином показал неповрежденную морфологию примордиальных и вторичных фолликулов с плотным контактом ооцитом и окружающими гранулезными клетками, а также между соседними гранулезными клетками (рис. 1 и 2).

Исследование показало, что при замораживании ткани яичника в пару жидкого азота с использованием в качестве криопротектора диметилсульфоксида обычную структурную организацию сохраняют отдельные антральные и примордиальные фолликулы. В сохранившихся антральных фолликулах ооцит был шаровидной формы, имел мелкозернистую цитоплазму, четко выраженную блестящую оболочку, почти полностью окруженную венцом кумулезных клеток (рис. 3 и 4).

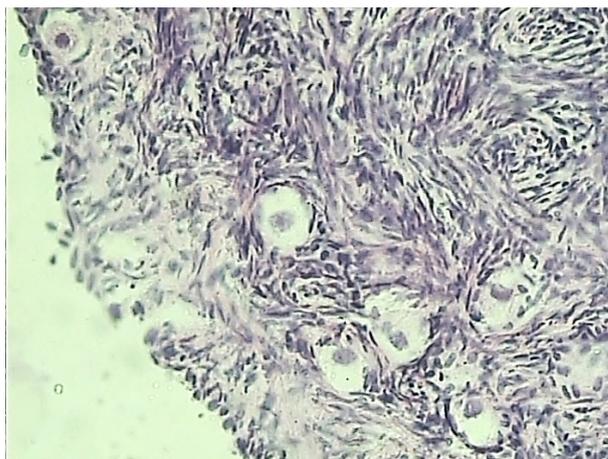


Рисунок 1 – Контрольная группа. Примордиальные фолликулы. Окраска по Гематоксилин-Эозин. Об. х40



Рисунок 2 – Контрольная группа. Вторичный фолликул. Окраска по Гематоксилин-Эозин. Об. х40

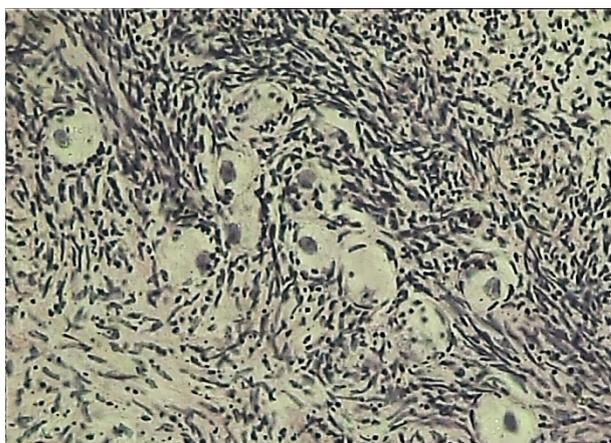


Рисунок 3 – Гистологический срез замороженной ткани яичника с диметилсульфоксидом. Отдельные примордиальные фолликулы не повреждены. Окраска по Ван-Гизону. Об. х40

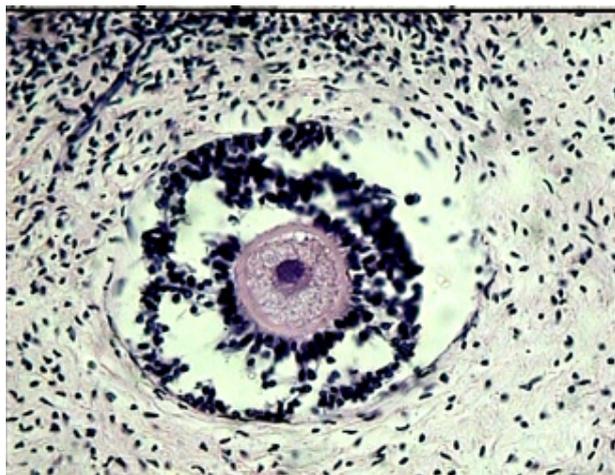


Рисунок 4 – Гистологический срез замороженной ткани яичника с диметилсульфоксидом.
Не поврежденный антральный фолликул
со здоровым ооцитом. Окраска по Гематоксилин –
Эозин. Об. x40

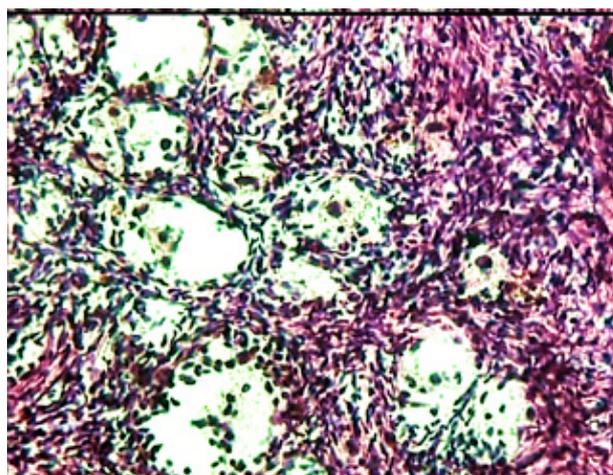


Рисунок 5 – Гистологический срез замороженной ткани яичника с глицерином.
Примордиальные фолликулы повреждены.
Окраска по Ван-Гизону.
Об. x40

При использовании глицерина в качестве криопротектора примордиальные и антральные фолликулы были повреждены (рис. 5 и 6). Разрушение антральных фолликулов проявлялось, в частности, потерей ооцитом блестящей оболочки и кумулезного слоя, разрыхлением гранулезы и пикноморфностью ее клеток. В одних разрушающихся ранних антральных фолликулах ооцит, лишенный блестящей оболочки и кумулезы, имел обычную шаровидную форму, мелкозернистую ооплазму, отдельные белковые гранулы и округлое неповрежденное ядро. По-видимому, процесс повреждения фолликула начинается с повреждения фолликулярного эпителия, затем вовлекается в деструктивный процесс кумулеза и блестящая оболочка ооцита.

Морфологическая оценка замороженной ткани с этиленгликолем показала, что примордиальные и антральные фолликулы были в состоянии разрушения (рис. 8 и 9). В ранних антральных фолликулах было отмечено отторжение клеток гранулезы и их пикноморфность. Ооцит, потерявший блестящую оболочку в процессе кумулезы, был также пикноморфен, цитоплазма его мелко вакуолизирована, лишена кортикальных зерен.

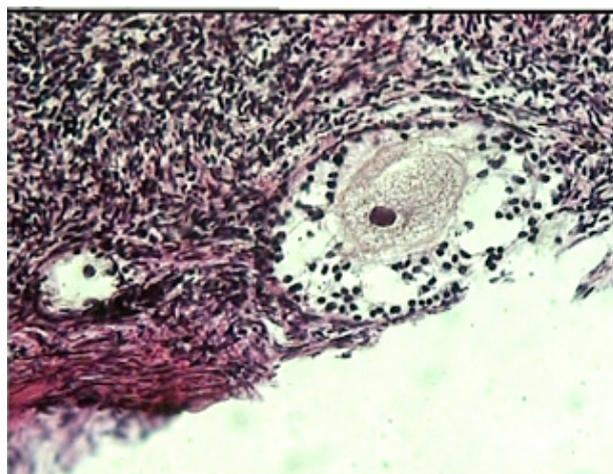


Рисунок 6 – Гистологический срез замороженной ткани яичника с глицерином. Разрушение раннего антрального фолликула. Окраска по Ван-Гизону.
Об. x40

Исследование ткани яичника, где в качестве криопротектора использовался пропиленгликоль, показало, что количество сохранивших обычную структурную организацию фолликулов ранних и мелких антральных фолликулов было сравнительно значительным (рис. 10 и 11).

При размере раннего антрального фолликула 461,4 мкм ооцит в размере равнялся 78,0 мкм, на месте подвергшихся атрезии примордиальных фолликулов обнаруживались скопления клеток фолликулярного эпителия в виде темноокрашенных комочек.

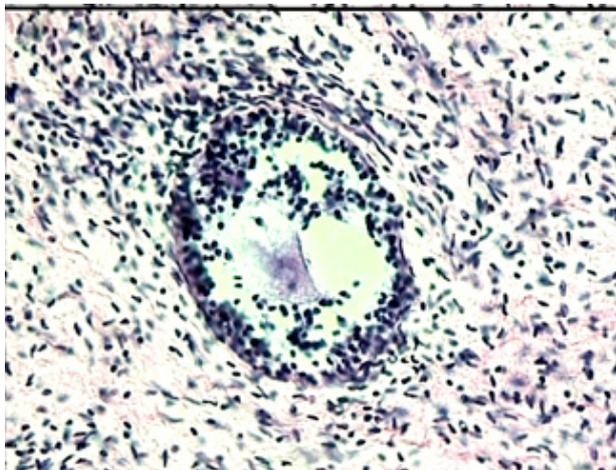


Рисунок 8 – Гистологический срез замороженной ткани яичника с этиленгликолем. Повреждение раннего антрального фолликула. Окраска по Гематоксилин – Эозин. Об. x40

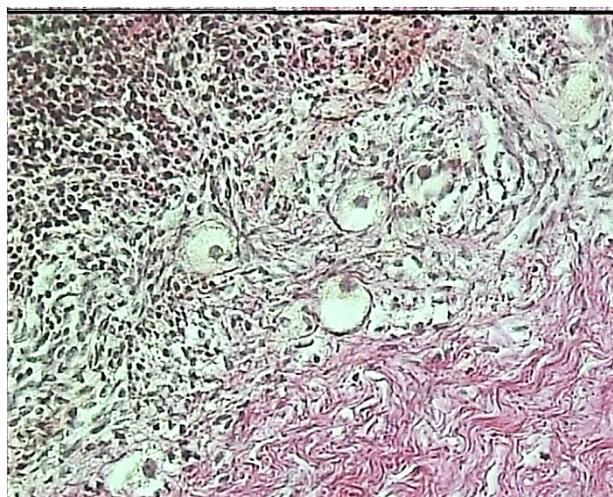


Рисунок 9 – Гистологический срез замороженной ткани яичника с этиленгликолем. Примордиальные фолликулы повреждены. Окраска по Гематоксилин – Эозин. Об. x40

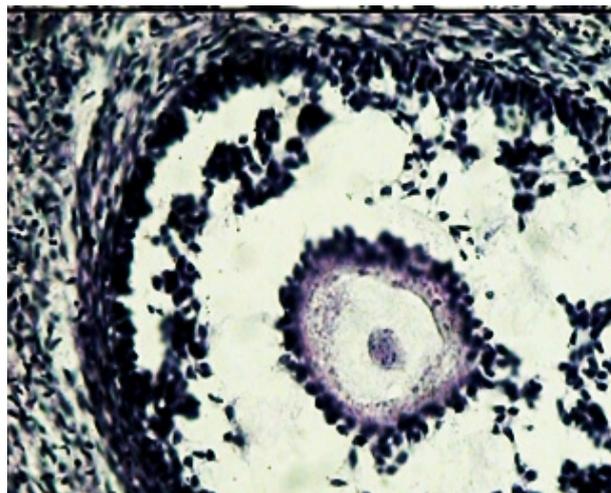


Рисунок 10 – Гистологический срез замороженной ткани с пропиленгликолем. Ранний антральный фолликул сохранен. Окраска по Гематоксилин – Эозин. Об. x20



Рисунок 11 – Гистологический срез замороженной ткани с пропиленгликолем. Ранний антральный фолликул сохранен. Окраска по Гематоксилин – Эозин. Об. x20

Обсуждение

Влияние различных криопротекторов при замораживании в парах жидкого азота на выживаемость ткани яичника овец в нашем эксперименте показало, что примордиальные и

антральные фолликулы хорошо сохранили свою жизнеспособность в группе, где в качестве криопротектора использовался 1,5 М ПГ, чем в остальных группах. Также было обнаружено, что отдельные примордиальные и антральные фолликулы сохранили целостность структуры в группе 1,5 М ДМСО. В группах, где в качестве криопротектора использовались ГЛ и ЭГ, наблюдалось разрушение как примордиальных, так и антральных фолликулов.

Сложность криоконсервирования ткани яичника соизмерима с консервированием целых органов, так как требует сохранения гетерогенной функциональной единицы яичника – фолликулы, состоящей из нескольких типов соматических клеток (гранулы, кумулюса, теки) и половой клетки (ооцита), которые отличаются размером, объемом и проницаемостью мембраны. Криоконсервация ткани яичника может быть выполнена двумя основными методами: с помощью медленного замораживания и витрификации. Медленное программное замораживание (в англоязычной литературе – «slow freeze») заключается в постепенном программируемом понижении температуры [15-17]. Предотвращение образования внутрисклеточного льда и, соответственно, сохранность клеток достигается путем медленного понижения температуры, что приводит к постепенному выходу воды и замене последней на криопротекторы после предварительной экспозиции в эквипотенциальном растворе. Важные факторы при замораживании клеток – это скорость охлаждения, свойство и концентрация криопротекторов и температура сидинга. Сидинг – необходимый процесс для уменьшения изменения температуры в момент ледяного образования. Эти изменения вызваны экзотермической реакцией, являющейся результатом формирования ледяных кристаллов. Температура сидинга варьируется в зависимости от свойства и концентрации криопротектора и скорости охлаждения. Например, для 1,5 М диметилсульфоксида (ДМСО), используя один и тот же замораживающий протокол (0,38°С/мин), можно применять разные температуры сидинга: -7°С, -8°С и -9°С [18-20]. При использовании более точной скорости охлаждения были получены хорошие результаты. В данном исследовании мы продемонстрировали, что криоконсервация ткани яичника овец в парах жидкого азота также позволяет сохранить жизнеспособность примордиальных и некоторых антральных фолликулов в зависимости от криопротектора. Хотя при замораживании в парах жидкого азота происходит спонтанный сидинг.

Для предотвращения криоповреждения клеток при криоконсервации используются такие основные проникающие криопротекторы, как диметилсульфоксид, этиленгликоль, пропиленгликоль, глицерин и непроницающий криопротектор сахараза. В 90-х годах было проведено несколько успешных экспериментов по низкотемпературному консервированию ткани яичника в присутствии ДМСО [21-23], который является часто используемым криопротектором при криоконсервации ткани яичника овец [22] и мышей [19, 24, 25]. Диметилсульфоксид – превосходный криопротектор, однако из-за дестабилизации клеточной мембраны и полимеризации микротрубочек приводит к анеуплоидии (мутагенный эффект) [26]. Поэтому его нужно сравнить с менее токсичными криопротектантами, такими как этиленгликоль, пропиленгликоль и глицерин. Следует отметить, что при рассмотрении токсичности криопротектора для оценки жизнеспособности клетки после криоконсервации необходимо учитывать его защитные эффекты и скорость охлаждения. Сравнительное изучение различных 1,5 М криопротекторов при замораживании в нашем исследовании показывает, что жизнеспособность овариальных фолликулов в наибольшей степени сохраняются с ПГ и ДМСО, чем ЭГ и ГЛ. ЭГ считается менее токсичным, однако проницаемость ДМСО очень высока. Таким образом, разрушения овариальных фолликулов в группах ЭГ и ГЛ могут быть вызваны осмотическим повреждением из-за более медленного проникновения этих криопротекторов.

Основополагающий протокол низкотемпературного консервирования в присутствии ДМСО для ткани яичника овец был разработан Gosden R.G и его соавторами в 1994 г. В результате последующей аутотрансплантации данной криоконсервированной ткани яичника появилось потомство [22]. В дальнейшем этот протокол был модифицирован Okaue K. и его соавторами для криоконсервирования ткани яичника человека в криозащитном растворе, содержащем 1,5 М ДМСО с добавлением 0,1 М сахаразы и увеличением времени эквипотенциации до 30 мин при 4°С. В результате использования данного протокола на гистологических срезах ткани яичника человека после криоконсервирования было выявлено незначительное количество первичных фолликулов [27]. Многочисленные экспериментальные данные, полученные Gook D.A. и его соавторами [28, 29], показали успешное замораживание фрагментов ткани

яичника в присутствии ПГ, где процент выживаемости фолликулов составлял более 50%. Позже исследования, проведенные Novatta O. и соавт. в 1996 г., доказали устойчивость ткани яичника человека к низкотемпературному консервированию в присутствии ДМСО или в сочетании ПГ и сахарозы. По данным некоторых исследований, выживаемость овариальных фолликулов при криоконсервации овариальной ткани женщин [30] и мышей [19] показала отсутствие существенной разницы между криопротекторами ДМСО и ПГ. Эти различные результаты могут произойти из-за различия между методами, включая состав и концентрацию криопротекторов, их время воздействия и кон-

тейнера. Исследователи использовали различные типы контейнеров, такие как криопробирки или криосоломинки, которые могут повлиять на результаты. Также эффект криопротекторов на выживаемость фолликулов может быть зависимым от метода и шагов, которые использовались во время замораживания и размораживания. Это требует дальнейшего исследования.

Данная работа была выполнена в рамках проекта 3846/ГФ4 «Изучение выживаемости ткани яичника и вторичных фолликулов местных пород овец Казахстана после различных методов криосохранения». Номер госрегистрации: 0115PK00422.

Литература

- 1 Preetmoninder L, Andrea S (2012) Biotechnologies for the Management of Genetic Resources for Food and Agriculture, Book: Advances in Genetics, Chapter 1, 78:1–167. ISBN: 978-0-12-394394-1
- 2 Watson, PF, Holt WV (2003) Book review. Cryobanking the genetic resource; wildlife conservation for the future, Cryobiology, 46:103–105. doi:10.1016/S0011-2240(02)00156-6
- 3 Global plan of action for animal genetic resources and the Interlaken Declaration adopted by the International Technical Conference on Animal Genetic Resources for Food and Agriculture Interlaken, Switzerland (2007), © FAO, P.1-35. ISBN 978-92-5-105848-0
- 4 Andrabi SMH, Maxwell WMC (2007) A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species, Animal Reproduction Science, 99:223–243. doi:10.1016/j.anireprosci.2006.07.002
- 5 Blackburn HD, Toishibekov Y, Toishibekov M, Welsh CS, Spiller SF, Brown M, Paiva SR (2011) Genetic diversity of Ovis aries populations near domestication centers and in the New World, Genetica, 139(9):1169–1178. doi 10.1007/s10709-011-9619-4
- 6 Torsten NK, Ary AH, Cino P, Astrid VS (2015) What can livestock breeders learn from conservation genetics and vice versa? Front Genetica, 6:38. doi: 10.3389/fgene.2015.00038
- 7 Welders H, Hiemstra SJ (2011) The potential of cryopreservation and reproductive technologies for animal genetic resources conservation strategies, Cryobiology, 63:306–342 doi:10.1016/j.cryobiol.2011.09.042
- 8 Pierre C, David W (2014) Mammalian fertility preservation through cryobiology: value of classical comparative studies and the need for new preservation options, Reproduction, Fertility and Development, 26(1): 91–98. doi: 10.1071/RD13259
- 9 Campbell BK, Hernandez MJ and at all. (2014) Restoration of ovarian function and natural fertility following the cryopreservation and autotransplantation of whole adult sheep ovaries, Human Reproduction, 29(8):1749–1763. doi: 10.1093/humrep/deu144
- 10 Michel DV, Johan S, Teresa K Woodruff (2014) Fertility preservation 2. Fertility preservation in women with cancer, NIH Public Access, Lancet., 4; 384(9950): 1302–1310. doi: 10.1016/S0140-6736(14)60834-5
- 11 Seisenbayeva A., Toishibekov Y., Iglmanov U., Kayubaeva B., Valiyeva B (2015) Effective method for in vitro culture of cryopreserved ovine ovarian tissue. Reproduction. Proceedings of the Annual Conference of the International Embryo Transfer Society. Reproduction, Fertility and Development 28(2): 193-194, <http://dx.doi.org/10.1071/RDv28n2Ab126>
- 12 Hewitson TD, Darby IA (2010) Hystology protocols. Shpringer protocols, Humana Press, 3-171. doi: 10.1007/978-1-60327-345-9
- 13 Oktay K, Newton H, Mullan J (1998) Development of human primordial follicles to antral stages in SCID/hpg mice stimulated with follicle stimulating hormone, Human Reproduction, 13(5):1133–1138. doi:10.1093/humrep/13.5.1133
- 14 Gougeon A. (1986) Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results, Human Reproduction, 1: 81–87. <http://humrep.oxfordjournals.org>
- 15 Matheus R, Karinna L and et al. (2013) Fresh embryo transfer versus frozen embryo transfer in vitro fertilization cycles: a systematic review and meta analysis, Fertility and Sterility, 99(1):156–162. doi:10.1016/j.fertnstert.2012.09.003
- 16 Wiedemann C, Zahmel J, Jewgenow K (2013) Short-term culture of ovarian cortex pieces to assess the cryopreservation outcome in wild felids for genome conservation, BMC Vet Res., 9(37):1746–6148. doi: 10.1186/1746-6148-9-37
- 17 Mahajan N (2015) Fertility preservation in female cancer patients: An overview, J Human Reproduction Science, 8(1): 3–13. doi: 10.4103/0974-1208.153119
- 18 Abedelahi A, Rezaei-Tavirani M, Mohammadnejad D (2013) Fertility Preservation Among the Cancer Patients by Ovarian Tissue Cryopreservation, Transplantation, and Follicular Development, Iran J Cancer Prev., 6(3): 123–132. PMC 4142925

- 19 Candy CJ, Wood MJ, Whittingham DG (1997) Effects of cryoprotectants on the survival of follicles in frozen mouse ovaries, *Journal of Reproduction and Fertility*, 110:11–19. doi: 10.1530/jrf.0.1100011
- 20 Parrott DMV (1960) The fertility of mice with orthotopic ovarian grafts derived from frozen tissue, *Journal of Reproduction and Fertility*, 1:230–241. doi: 10.1530/jrf.0.0010230
- 21 Cox SL, Shaw J, Jenkin G (1996) Transplantation of cryopreserved fetal ovarian tissue to adult recipients in mice, *Journal of Reproduction and Fertility*, 107:315–322. doi: 10.1530/jrf.0.1070315
- 22 Gosden RG, Baird DT, Wade JC, Webb G (1994) Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at –196°C, *Human Reproduction*, 9:597–603. <http://humrep.oxfordjournals.org>
- 23 Harp R, Leibach J, Black J and et al. (1994) Cryopreservation of murine ovarian tissue, *Cryobiology*, 31:336–343. doi:10.1006/cryo.1994.1042
- 24 Parkes AS (1956) Grafting of mouse ovarian tissue after freezing and thawing, *Journal of Endocrinology*, 14:30–31. <http://joe.endocrinology-journals.org/>
- 25 Szein J, Sweet H, Farley J, Mobraaten K (1998) Cryopreservation and orthotopic transplantation of mouse ovaries: new approach in gamete banking, *Biol. Reprod.*, 58(4): 1071–1074. doi:10.1095/biolreprod58.4.1071
- 26 Milenkovic M, Wallin A, Ghahremani M, Brännström M. Whole sheep ovary cryopreservation: evaluation of a slow freezing protocol with dimethylsulphoxide, *J Assist Reprod Genet.*, 28(1):7–14. doi: 10.1007/s10815-010-9477-5
- 27 Oktay K, Newton H, Gosden RG (2000) Transplantation of cryopreserved human ovarian tissue results in follicle growth initiation in SCID mice, *Fertility and Sterility*, 73(3):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)
- 28 Gook DA, Osborn SM, Bourne H, Johnston WI (1994) Fertilization of human oocytes following cryopreservation; normal karyotypes and absence of stray chromosomes, *Human Reproduction*, 9(4):684–691. <http://humrep.oxfordjournals.org>
- 29 Gook DA, Osborn SM, Johnston WI (1993) Cryopreservation of mouse and human oocytes using 1,2-propanediol and the configuration of the meiotic spindle, *Human Reproduction*, 8(7):1101–1109. <http://humrep.oxfordjournals.org>
- 30 Hovatta O, Silye R, Krausz T, Abir R, Margara R, Geoffrey T, et al. (1996) Cryopreservation of human ovarian tissue using dimethylsulphoxide and propanediol-sucrose as cryoprotectants, *Human Reproduction*, 11: 1268–1272. <http://humrep.oxfordjournals.org>