

УДК 611.651.018+612.621.3J-089:57.086.13

В.В. Киروشка¹, Е.А. Бородай¹, І.А. Трутаєва^{1,*},
Н.М. Пасієшвили², Т.П. Бондаренко¹

Функция трансплантатов овариальной ткани после гипотермического хранения: значение состава среды инкубации

UDC 611.651.018+612.621.3J-089:57.086.13

V.V. Kiroshka¹, K.O. Borodai¹, I.A. Trutaieva^{1,*},
N.M. Pasieshvili², T.P. Bondarenko¹

Function of Ovarian Tissue Grafts After Hypothermic Storage: Importance of Incubation Medium Composition

Реферат: В работе проведен сравнительный анализ морфологической структуры, эндокринной функции и фолликулогенеза трансплантатов половозрелой и неонатальной овариальной ткани крыс после гипотермического хранения (ГХ) в средах различного состава. Для выполнения работы были использованы следующие методы: гетеротопическая трансплантация (исследование структуры и функции овариальной ткани после ГХ); иммуноферментный анализ (определение концентрации половых гормонов в плазме); морфологический (оценка целостности структуры трансплантатов ткани после ГХ). Экспериментально доказано, что определяющим фактором фолликулярного развития и эндокринной функции трансплантатов овариальной ткани различных стадий гистогенеза после ГХ является состав среды инкубации. Установлено, что после применения фосфатно-солевого буфера для ГХ значительно уменьшался фолликулярный пул и снижалась стероидогенная функция трансплантатов как половозрелой, так и неонатальной овариальной ткани. Показано, что в результате гипотермического хранения в среде, содержащей маннитол, количество фолликулов разной степени зрелости и желтых тел и эндокринная функция после трансплантации овариальной ткани были сравнимы с таковыми после трансплантации свежeweыделенной ткани.

Ключевые слова: гипотермическое хранение, морфологическая структура, фолликулы, половые гормоны, маннитол, овариальная ткань.

Реферат: У роботі проведено порівняльний аналіз морфологічної структури, ендокринної функції та фолікулогенезу трансплантатів статевозрілої та неонатальної овариальної тканини щурів після гіпотермічного зберігання (ГЗ) у середовищах різного складу. Для виконання роботи були використані наступні методи: гетеротопічна трансплантатія (дослідження структури і функції овариальної тканини після ГЗ); імуноферментний аналіз (визначення концентрації статевих гормонів у плазмі); морфологічний (оцінка цілісності структури трансплантатів тканини після ГЗ). Експериментально доведено, що основним фактором фолікулярного розвитку та ендокринної функції трансплантатів овариальної тканини різних стадій гистогенезу після ГЗ є склад середовища інкубації. Встановлено, що після застосування фосфатно-солевого буфера для ГЗ значуще зменшувався фолікулярний пул і знижувалася стероїдогенна функція трансплантатів як статевозрілої, так і неонатальної овариальної тканини. Показано, що під час гіпотермічного зберігання у середовищі, яке містило манітол, кількість фолікулів різного ступеню розвитку та жовтих тіл і ендокринна функція після трансплантації овариальної тканини були порівняні з такими після трансплантації свіжовиділеної тканини.

Ключові слова: гіпотермічне зберігання, морфологічна структура, фолікули, статеві гормони, манітол, овариальна тканина.

Abstract: There were comparatively analyzed the morphology, endocrine function and folliculogenesis of mature and neonatal rat ovarian tissue grafts after hypothermic storage (HS) in the media with different composition. For research performance the following methods were used: heterotopic transplantation (study of ovarian tissue structure and function after HS); immunoassay (determining the concentration of sex hormones in plasma); morphological method (evaluation of tissue graft structure integrity after HS). The composition of incubation medium was experimentally proven to be a key factor in follicular development and endocrine function of ovarian tissue grafts of different stages of histogenesis after HS. It was found that the use of phosphate-buffered saline for HS significantly reduced the follicular pool and decreased the steroidogenic function of grafts in both mature and neonatal ovarian tissue. It was shown that when using the mannitol-containing solution for HS, the number of follicles of different maturity degree and *corpus luteum* and the endocrine function after ovarian tissue transplantation were comparable with those after fresh tissue transplantation.

Key words: hypothermic storage, morphology, follicles, sex hormones, mannitol, ovarian tissue.

¹Відділ кріоендокринології, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків
²КЗОЗ «Харківський обласний клінічний перинатальний центр»

¹Department of Cryoendocrinology, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine
²Kharkiv Regional Clinical Perinatal Center, Kharkiv, Ukraine

*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52
електронна пошта: irinatoleubekova@gmail.com

*To whom correspondence should be addressed:

23, Pereyaslavka str., Kharkiv, Ukraine 61016;
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952
e-mail: irinatoleubekova@gmail.com

Надійшла 08.05.2018
Прийнята до друку 18.02.2019

Received May, 08, 2018
Accepted February, 18, 2019

© 2019 I.A. Trutaieva et al. Published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

В настоящее время к числу наиболее перспективных методов восстановления репродуктивной функции у женщин после курсов химио- и радиотерапии относится трансплантация овариальной ткани [7, 16, 24]. При этом к моменту реваскуляризации фрагментов овариальной ткани наблюдалась гибель от 60–80% фолликулов общего пула, из которых 20–30% повреждалось во время извлечения, транспортировки и хранения [10, 15]. Известно, что одним из основных методов хранения органов и тканей во время транспортировки является гипотермическое хранение (ГХ) [11, 13, 25, 26]. Для ГХ овариальной ткани в основном применяются такие электролитные среды, как физиологический раствор, среда 199 [18], фосфатно-солевой буфер, раствор Брауна-Коллинза [9]. Однако в современной литературе сведения о сохранности овариальной ткани после ГХ в инкубационных средах [26], содержащих маннитол («Celsior», «Custodiol»), отсутствуют.

Важно отметить, что в результате использования маннитола при перфузии головного мозга [8], сердца [19], скелетных мышц [21] уменьшалась зона некроза в ишемизированных органах. N. Sagsoz [23] и соавт. на модели перекрута яичника показали, что при введении в нижнюю полую вену 20%-го раствора маннитола выраженность ишемических повреждений ткани *in vivo* уменьшалась. Полученные нами экспериментальные данные свидетельствуют о протективном эффекте маннитола при ГХ неонатальной овариальной ткани [2]. Известно, что в половозрелой овариальной ткани структура цитоскелета ооцита и организация системы микротрубочек отличаются от таковых в неонатальной ткани, что может приводить к различным изменениям морфологической структуры ткани в процессе ГХ [20, 27].

В связи с вышеизложенным целью работы было проведение сравнительного анализа морфологической структуры и эндокринной функции трансплантатов половозрелой и неонатальной овариальной ткани после гипотермического хранения в фосфатно-солевом буфере и маннитол-содержащем растворе.

Материалы и методы

Объектом исследования служила овариальная ткань 10-суточных и 3-месячных крыс линии Вистар, которые содержались в стандартных условиях вивария Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (г. Харьков).

Эксперименты проводили в соответствии с Законом Украины «О защите животных от жес-

Currently, the ovarian tissue transplantation is among the most promising methods for restoring reproductive function in women after chemo- and radiotherapy sessions [1, 11, 23]. Herewith, by the time of ovarian tissue fragment revascularization, there was observed the death of 60–80% of follicles of the whole pool, among which 20–30% were damaged during extraction, transportation and storage [5, 10]. Hypothermic storage (HS) is known to be one of the main methods for organ and tissue preservation during transportation [6, 8, 24, 26]. For ovarian tissue HS one mostly applies such electrolyte media as normal saline solution, medium 199 [15], phosphate-buffered saline, Braun-Collins solution [4]. However, there are no reported data on the ovarian tissue integrity after HS in the mannitol-containing incubation media (Celsior, Custodiol) [26].

Of note is the fact that the mannitol use for brain [2], heart [16] and skeletal muscle [18] perfusion entails the reduction of necrotic zone in ischemized organs. N. Sagsoz [22] *et al.* in ovarian-torsion model demonstrated the administration of 20% mannitol solution into the inferior vena cava to decrease the severity of ischemic tissue injuries *in vivo*. Our findings testify to a protective effect of mannitol in HS of neonatal ovarian tissue [13]. It is known that in mature ovarian tissue, the structure of oocyte cytoskeleton and the organization of microtubule system are different from those in neonatal tissue, which may result in different changes in morphological structure of tissue during HS [17, 27].

Proceeding from the mentioned above this research was aimed to comparatively analyze the morphological structure and endocrine function of mature and neonatal ovarian tissue grafts after hypothermic storage in phosphate-buffered saline and mannitol-containing solution.

Materials and methods

The research object was the ovarian tissue of 10-day and 3-month-old Wistar rats, housed in the animal facility of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine (Kharkiv).

The experiments were carried out in accordance with the Law of Ukraine 'On Protection of Animals Against Cruelty' (№3447-IV of February 21, 2006), agreed to the statements of European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasburg, 1986) in compliance with the requirements of the Bioethics Committee of the Institute for Problems of Cryobiology and

токого обращения» (№3447-IV от 21.02.2006) и положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986) и по разрешению комитета по биоэтике Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины.

Неонатальную овариальную ткань выделяли из 10-суточных крыс под микроскопом МБС-10 (ПО «Рубин», СССР), затем ее переносили в чашку Петри с физиологическим раствором, содержащим пенициллин и стрептомицин (100 Ед на 100 мл). Овариальную ткань половозрелого животного фрагментировали (0,5–1 мм³) ножницами для микрохирургии и помещали в стерильную питательную среду. Образцы подвергали ГХ в течение 24 ч при температуре 4°C в инкубационных средах различного состава: фосфатно-солевой буфер (ФСБ) –130 мМ NaCl, 20 мМ KCl, 20 мМ фосфатного буфера при pH = 7,4; маннитол-содержащий раствор (МСР) –250 мМ маннитола («Дніпрофарм», Україна), 10 мМ NaCl, 20 мМ KCl, 20 мМ фосфатного буфера при pH 7,4.

Для оценки роста и эндокринной функции овариальной ткани после ГХ использовали метод гетеротопической трансплантации под капсулу левой почки. Трансплантацию овариальной ткани (0,15 мг/г массы тела животного) во всех группах осуществляли половозрелым крысам одновременно с двухсторонней овариоэктомией в стерильных условиях и под наркозотизацией. Время проведения трансплантации составляло 20 мин.

Экспериментальные животные были разделены на следующие группы: 1 – трансплантация свежывделенной неонатальной овариальной ткани (подгруппа 1А) и половозрелой овариальной ткани (подгруппа 1В), 2 – трансплантация овариальной ткани после ГХ в ФСБ (неонатальной – подгруппа 2А и половозрелой – подгруппа 2В), 3 – трансплантация овариальной ткани после ГХ в МСР (неонатальной – подгруппа 3А и половозрелой – подгруппа 3В). Контрольную группу составили крысы без овариоэктомии (К1) и с двухсторонней (К2) овариоэктомией. На 30-е сутки после трансплантации животных подвергали эвтаназии.

Для определения концентрации половых гормонов кровь брали внутрисердечной пункцией, центрифугировали 20 мин при 3000g для получения плазмы. Уровень эстрадиола и прогестерона в плазме крови животных-реципиентов определяли методом хемилуминесцентного иммуноферментного анализа с использованием стандартных тест-наборов «ST AIA-PACK hsE2 G» и

Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine.

The neonatal ovarian tissue was isolated from 10-day-old rats under MBS-10 microscope (PA Rubin, USSR), then it was transferred into a Petri dish with saline, containing penicillin and streptomycin (100 U per 100 ml). Ovarian tissue of mature animal was fragmented (0.5–1 mm³) with microsurgery scissors and placed into a sterile nutrient medium. The samples were subjected to HS for 24 hrs at 4°C in incubation media of different composition: phosphate-buffered saline (PBS) –130 mM NaCl, 20 mM KCl, 20 mM phosphate buffer at pH = 7.4; mannitol-containing solution (MCS) – 250 mM mannitol (Dniprofarm, Ukraine), 10 mM NaCl, 20 mM KCl, 20 mM phosphate buffer at pH 7.4.

To assess the growth and endocrine function of ovarian tissue after HS, the method of heterotopic transplantation under the left renal capsule was used. The ovarian tissue transplantation (0.15 mg/g of animal body weight) in all the groups was carried out to adult rats simultaneously with bilateral ovariectomy under sterile conditions and anesthesia. The transplantation procedure lasted 20 min.

Experimental animals were divided into the following groups: the group 1 – the transplantation of fresh neonatal ovarian tissue (subgroup 1A) and mature one (subgroup 1B), group 2 – transplantation of ovarian tissue after HS in PBS (neonatal and mature ones – subgroup 2A and 2B, respectively), group 3 – transplantation of ovarian tissue after HS in MCS (neonatal and mature ones – subgroup 3A and 3B, respectively). The control group comprised non-ovariectomized rats (C1) and those with bilateral ovariectomy (C2). To day 30 after transplantation the animals were sacrificed.

To determine the concentration of sex hormones, the blood was taken by intracardiac puncture, then centrifuged for 20 min at 3000g for plasma procurement. The estradiol and progesterone levels in blood plasma of recipient animals were determined with chemiluminescent enzyme immunoassay using the standard test kits 'ST AIA-PACK hsE2 G' and 'ST AIA-PACK PRO' (Tosoh Corporation, Japan) according to the instructions and enzyme immunoassay analyzer (Tosoh AIA 1200, Japan).

For morphological studies of grafts, the kidney was removed from a recipient animal, fixed for 48 hrs in 10% formalin solution, then dehydrated and embedded in paraffin blocks [14, 20]. Serial sections of the entire graft of 10 µm thickness were made from each kidney. Every third section was stained with hematoxylin and eosin. For histological

«ST AIA-PAK PRO» («Tosoh Corporation», Япония) согласно инструкции и иммуноферментного анализатора («Tosoh AIA 1200», Япония).

Для морфологических исследований трансплантатов у животного-реципиента извлекали почку, фиксировали в течение 48 ч в 10%-м растворе формалина, дегидратировали и заключали в парафиновые блоки [3, 4]. С каждой почки делали серийные срезы всего трансплантата толщиной 10 мкм. Каждый третий срез окрашивали гематоксилином и эозином. Для гистологического анализа считали только фолликулы с видимым ядром для исключения повторного счета одного и того же фолликула.

Фолликулы идентифицировали согласно классификации А. Gougeon [12]: 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, формирование полости, содержащей фолликулярную жидкость.

Гистологические препараты исследовали с помощью микроскопа со встроенной камерой «Axio ObserverZ1» («Carl Zeiss», Германия) с объективами «Plan Fluor» $\times 20$ и 40 , используя пакет прикладных программ для обработки изображения «Axio Vision Release 4.7.2» («Carl Zeiss»).

Развитие трансплантата овариальной ткани оценивали по изменению его объема (длина \times ширина \times толщина $\times 0,523$) и количеству фолликулов в 1 мм^3 [6]. Для морфометрического анализа использовали компьютерную программу «AxioVisionRelease 4.7.2» («CarlZeiss»).

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программ «Excel» («Microsoft», США) и «Statistica v.6.0» («StatSoft», США). В зависимости от распределения данных для сравнения выборок использовали t -критерий Стьюдента или U -критерий Манна-Уитни [1]. Результаты представляли в виде $M \pm m$ ($p < 0,05$).

Результаты и обсуждение

На 30-е сутки наблюдения установлено, что структура трансплантатов свежeweделенной неонатальной овариальной ткани (подгруппа 1А) и овариальной ткани после ГХ в МСР (подгруппа 3А) ткани имеет сходный характер (рис. 1, А, С).

На гистологических срезах обнаружены фолликулы, характерные как для ранних (примор-

analysis, only the follicles with a visible nucleus were counted to exclude re-counting of the same follicle.

The follicles were identified according to the A. Gougeon's classification [7], where primordial follicle was the oocyte, surrounded by one layer of flat granulosa cells; primary one was the oocyte, surrounded by a single layer of cuboidal granulosa cells; preantral one represented the oocyte, surrounded by more than two layers of granulosa cells, located on basal membrane, surrounded by single theca cells; antral one was the oocyte, increased in volume, surrounded by several layers of granulosa cells with formation of the cavity, containing follicular fluid.

Histological preparations were studied using AxioObserverZ1 microscope (CarlZeiss, Germany) with PlanFluor $\times 20$ and 40 lenses, using the AxioVisionRelease 4.7.2 image processing software (CarlZeiss).

The ovarian tissue graft development was assessed by the change in its volume (length \times width \times thickness $\times 0.523$) and the number of follicles in 1 mm^3 [25]. The AxioVisionRelease 4.7.2 software (Carl Zeiss) was used for morphometric analysis.

The results were statistically processed using the Excel (Microsoft, USA) and Statistica v.6.0 (StatSoft, USA) software. Depending on the data distribution, either Student's t -test or Mann-Whitney U -test [3] were used to compare the samples. The results were presented as $M \pm m$ ($p < 0.05$).

Results and discussion

To day 30 of observation, the structure of grafts from fresh neonatal ovarian tissue (subgroup 1A) and ovarian tissue after HS in MCS (subgroup 3A) was established to have a similar character (Fig. 1A, C).

Histological sections revealed the follicles, inherent to both early (primordial and primary) and later (preantral and antral) stages of folliculogenesis, as well as the *corpus luteum*. When analyzing the morphological structure of the grafts of subgroups 1A and 3A there were revealed the follicular cysts, the inner wall of which was lined with several layers of elongated fibroblast-like cells with content (transparent or pale-stained with eosin) [21]. When using PBS as HS medium (Fig. 1B), the tissue grafts (subgroup 2A) showed both sclerotic sites and well vascularized ovarian stroma, where the growing follicles were located.

The analysis of morphological structure of mature ovarian tissue grafts in animals of all the studied groups demonstrated the presence of follicles of different maturity degrees and *corpus luteum*.

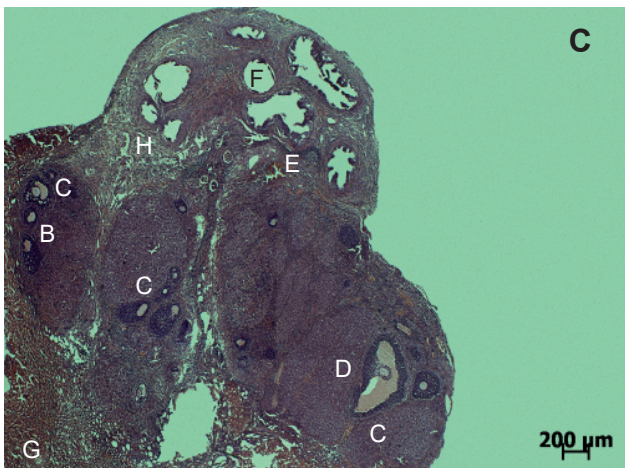
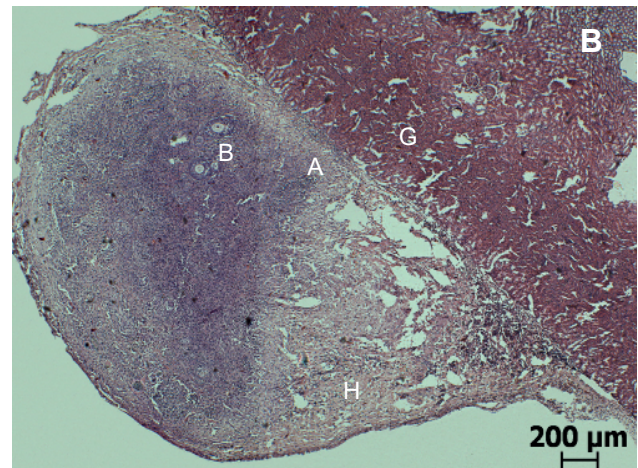
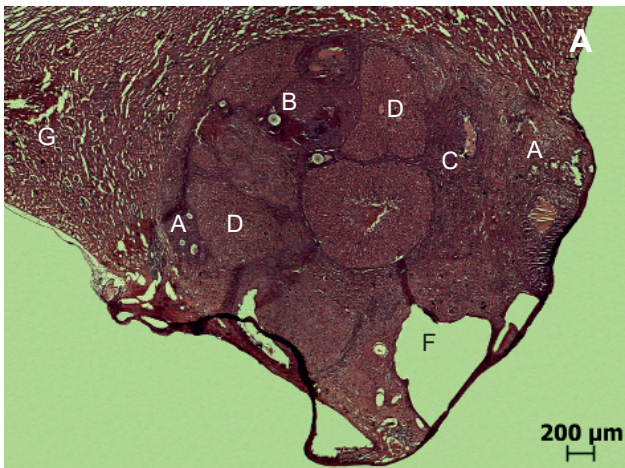


Рис. 1. Морфологическая структура трансплантатов неонатальной овариальной ткани на 30-е сутки: **А** – свежeweыделенная (подгруппа 1А); **В** – после ГХ в ФСБ (подгруппа 2А); **С** – после ГХ в МСР (подгруппа 3А). **А** – примордиальный фолликул, **В** – преантральный фолликул, **С** – антральный фолликул, **Д** – желтое тело, **Е** – кровеносный сосуд, **Ф** – полость кисты, **Г** – ткань почки, **Н** – участок фиброза ткани.

Fig. 1. Morphological structure of neonatal ovarian tissue grafts to day 30: **A** – fresh (subgroup 1A); **B** – after HS in PBS (subgroup 2A); **C** – after HS in MCS (subgroup 3A). **A** – primordial follicle, **B** – preantral follicle, **C** – antral follicle, **D** – *corpus luteum*, **E** – blood vessel, **F** – cyst cavity, **G** – kidney tissue, **H** – site of tissue fibrosis.

дильные и первичные), так и для более поздних (преантральные и антральные) стадий фолликулогенеза, а также желтые тела. При анализе морфологической структуры трансплантатов подгрупп 1А, и 3А выявлены фолликулярные кисты, внутренняя стенка которых выстлана несколькими слоями вытянутых фибробластоподобных клеток с содержимым (прозрачным либо бледно окрашенным эозином) [5]. При использовании ФСБ в качестве среды ГХ (рис. 1, В) в трансплантатах ткани (подгруппа 2А) отмечались как склерозированные участки, так и хорошо васкуляризованная строма яичников, в которой располагались растущие фолликулы.

Анализ морфологической структуры трансплантатов половозрелой овариальной ткани у животных всех исследованных групп показал наличие фолликулов разной степени зрелости и желтых тел. Следует отметить, что после одних суток ГХ развитие трансплантатов половозрелой овариальной ткани как в ФСБ (подгруппа 2В), так и в МСР (подгруппа 3В) имеет зональный характер, который может свидетельствовать о повреждении поверхностного слоя фрагментов овариальной ткани после ГХ (рис. 2).

It should be noted that after one day of HS the development of mature ovarian tissue grafts in both PBS (subgroup 2B) and in MCS (subgroup 3B) is of zonal character, which may indicate a damage of surface layer of ovarian tissue fragments during HS (Fig. 2).

In addition, the fibrosis of about 5–10% of tissue was revealed in the subgroup 2B graft, that was probably due to its lower survival rate during HS in PBS (Fig. 2B).

The follicle development in ovarian tissue grafts after HS in the media with different composition was assessed by the follicle number per 1 mm³. In the grafts of subgroups 3A and 3B, the number of follicles per 1 mm³ was 30.4 ± 5.2 and 36.5 ± 5.8, respectively, which was comparable to that in subgroups 1A and 1B, *i. e.* 38.6 ± 5.2 and 49.1 ± 7.4 respectively. At the same time, the studied index in subgroups 2A and 2B was significantly lower *vs.* the control subgroups 1A and 1B (Fig. 3).

The analysis of steroidogenic function of fresh ovarian tissue grafts and those after HS in the media of different composition showed the level of sex hormones in recipient animals of subgroups 1A and 1B after transplanting the fresh ovarian tissue

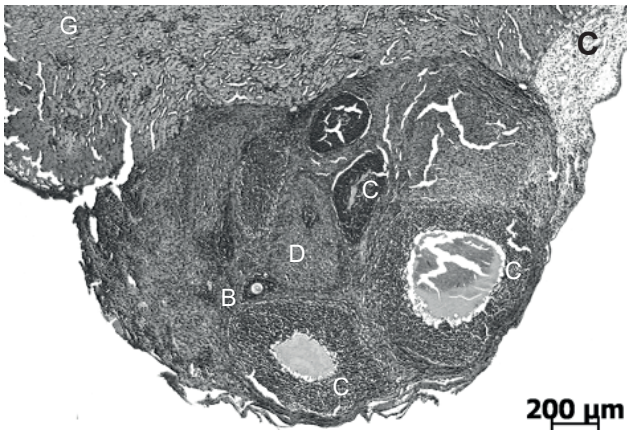
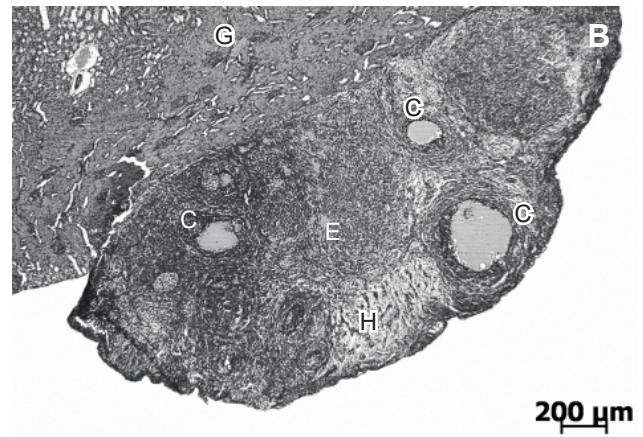
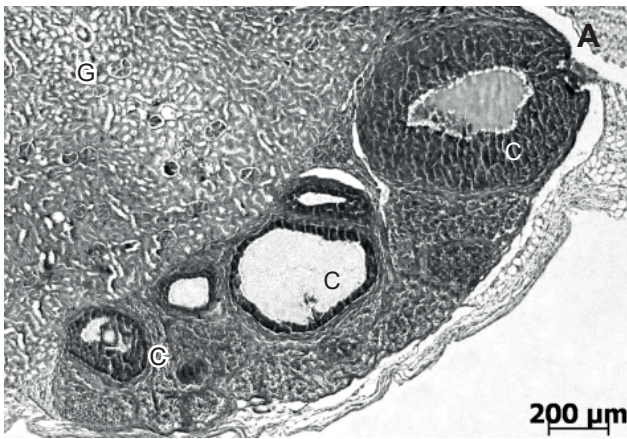


Рис. 2. Морфологическая структура трансплантатов половозрелой овариальной ткани на 30-е сутки: **A** – свежесыводенная (подгруппа 1В); **B** – после ГХ в ФСБ (подгруппа 2В); **C** – после ГХ в МСР (подгруппа 3В). А – примордиальный фолликул, В – преантральный фолликул, С – антральный фолликул, D – желтое тело, E – кровеносный сосуд, F – полость кисты, G – ткань почки, H – участок фиброза ткани.

Fig. 2. Morphological structure of mature ovarian tissue grafts to day 30: **A** – fresh (subgroup 1B); **B** – after HS in PBS (subgroup 2B); **C** – after HS in MCS (subgroup 3B). A – primordial follicle, B – preantral follicle, C – antral follicle, D – corpus luteum, E – blood vessel, F – cyst cavity, G – kidney tissue, H – site of tissue fibrosis.

Помимо этого в трансплантате подгруппы 2В выявлен фиброз около 5–10% ткани, что, возможно, связано с меньшей степенью ее сохранности при ГХ в ФСБ (рис. 2, В).

Развитие фолликулов в трансплантатах овариальной ткани после ГХ в средах с разным составом оценивали по количеству фолликулов на 1 мм³. В трансплантатах подгрупп 3А и 3В количество фолликулов на 1 мм³ составляло 30,4 ± 5,2 и 36,5 ± 5,8 соответственно, что сравнимо с таковым в подгруппах 1А и 1В 38,6 ± 5,2 и 49,1 ± 7,4 соответственно. В то же время исследуемый показатель в подгруппах 2А и 2В был значимо ниже относительно контрольных подгрупп 1А и 1В (рис. 3).

Анализ стероидогенной функции трансплантатов свежесыводенной овариальной ткани и после ГХ в средах различного состава показал, что уровень половых гормонов у животных-реципиентов подгрупп 1А и 1В после трансплантации свежесыводенных фрагментов ткани яичника находится в пределах физиологической нормы (рис. 4). Следует отметить, что после 24-часового ГХ эндокринная функция овариальной ткани определялась составом среды инкубации. Так, концентрация эстрадиола (рис. 4, А) и прогестерона (рис. 4, В) в крови крыс после транс-

фрагментов to be within the physiological norm (Fig. 4). It should be noted that after 24-hour HS, the endocrine function of ovarian tissue was deter-

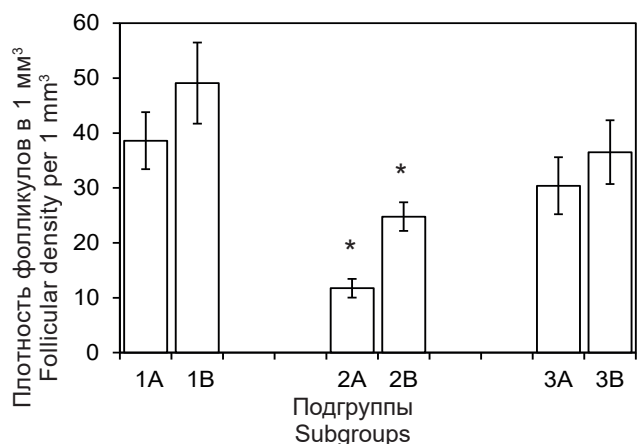


Рис. 3. Плотность фолликулов (количество фолликулов в 1 мм³) в трансплантатах овариальной ткани: свежесыводенной (контроль) – подгруппы 1А и 1В; после ГХ в ФСБ – подгруппы 2А и 2В; после ГХ в МСР – подгруппы 3А и 3В. * – разница статистически значима по сравнению с контролем, $p < 0,05$.

Fig. 3. Follicle density (number of follicles per 1 mm³) in ovarian tissue grafts: fresh (control) – subgroups 1A and 1B; after HS in PBS – subgroups 2A and 2B; after HS in MCS – subgroups 3A and 3B. * – difference is statistically significant vs. the control, $p < 0.05$.

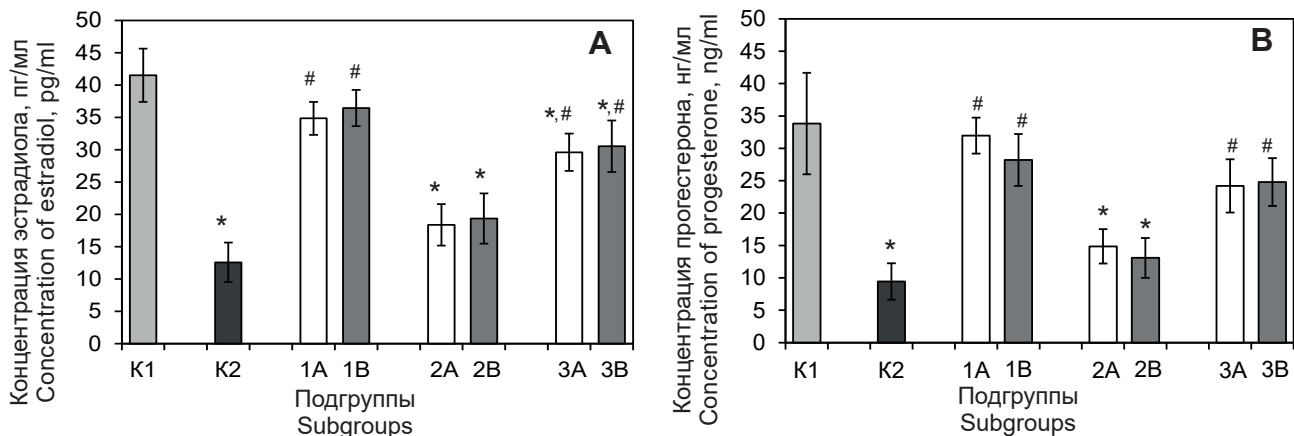


Рис. 4. Концентрация половых гормонов у животных-реципиентов после трансплантации овариальной ткани. * # – разница статистически значима по сравнению с K1 и K2 соответственно, $p < 0,05$.

Fig. 4. Concentration of sex hormones in recipient animals after ovarian tissue transplantation. *, # – difference is statistically significant vs. C1 and C2, respectively, $p < 0.05$.

плантации овариальной ткани, подверженной ГХ в ФБС (подгруппы 2А и 2В), значимо не отличалась от таковой у овариоэктомированных животных, тогда как после ГХ в МСР (подгруппы 3А и 3В) этот показатель был сопоставим с таковым у животных с трансплантацией свежесодержанной ткани (подгруппы 1А и 1В).

Приведенные экспериментальные данные однозначно указывают на то, что фактором, определяющим фолликулярное развитие и эндокринную функцию трансплантатов овариальной ткани, является состав среды инкубации. Применение ФБС в качестве инкубационной среды при ГХ значимо снижало фолликулярное развитие и стероидогенную функцию трансплантатов как половозрелой, так и неонатальной овариальной ткани, а при использовании МСР для ГХ данные показатели были сопоставимы с контрольными (подгруппы 1А и 1В). Следовательно, при ГХ деструктивные повреждения инкубированной в ФБС овариальной ткани имеют общий характер и не связаны с разной морфологической структурой фолликулярной единицы и количеством фолликулов на 1 мм^3 исходного материала [14]. Снижение степени повреждений овариальной ткани при использовании МСР для ГХ можно объяснить протективным действием маннитола при ишемии, которое обусловлено его осмотическими свойствами. R.P. Paczynski и соавт. [22] экспериментально доказали, что в результате многократного введения маннитола в постисшемическом периоде уменьшается количество воды в паренхиме мозга и снижается внутритканевое давление. R.J. Andrews и соавт. [8] показали, что после введения маннитола усиливается мозговое кровообращение и снижается артериальное давление в ишемизированной ткани, но синаптичес-

кисимые повреждения определяются составом среды инкубации. Таким образом, концентрация эстрадиола (рис. 4А) и прогестерона (рис. 4В) в крови крысы после трансплантации овариальной ткани, подверженной ГХ в ФБС (подгруппы 2А и 2В) не отличалась от таковой у овариоэктомированных животных, тогда как после ГХ в МСР (подгруппы 3А и 3В) этот показатель был сопоставим с таковым у животных с трансплантацией свежесодержанной ткани (подгруппы 1А и 1В).

Представленные данные однозначно указывают на то, что фактором, определяющим фолликулярное развитие и эндокринную функцию трансплантатов овариальной ткани, является состав среды инкубации. Применение ФБС в качестве инкубационной среды при ГХ значимо снижало фолликулярное развитие и стероидогенную функцию трансплантатов как половозрелой, так и неонатальной овариальной ткани, а при использовании МСР для ГХ данные показатели были сопоставимы с контрольными (подгруппы 1А и 1В). Следовательно, при ГХ деструктивные повреждения инкубированной в ФБС овариальной ткани имеют общий характер и не связаны с разной морфологической структурой фолликулярной единицы и количеством фолликулов на 1 мм^3 исходного материала [9]. Снижение степени повреждений овариальной ткани при использовании МСР для ГХ можно объяснить протективным действием маннитола при ишемии, которое обусловлено его осмотическими свойствами. R.P. Paczynski et al. [19] экспериментально доказали, что в результате многократного введения маннитола в постисшемическом периоде уменьшается количество воды в паренхиме мозга и снижается внутритканевое давление. R.J. Andrews et al. [2] показали, что после введения маннитола усиливается мозговое кровообращение и снижается артериальное давление в ишемизированной ткани, но синаптические повреждения определяются составом среды инкубации. Таким образом, концентрация эстрадиола (рис. 4А) и прогестерона (рис. 4В) в крови крысы после трансплантации овариальной ткани, подверженной ГХ в ФБС (подгруппы 2А и 2В) не отличалась от таковой у овариоэктомированных животных, тогда как после ГХ в МСР (подгруппы 3А и 3В) этот показатель был сопоставим с таковым у животных с трансплантацией свежесодержанной ткани (подгруппы 1А и 1В).

кая передача нервных импульсов не восстанавливается. G.J. Magovern и соавт. [19] установили, что реперфузия сердца гиперосмолярными растворами маннитола улучшает диастолическую функцию желудочка по сравнению со стандартными кристаллоидными растворами. H.I. Karibe и соавт. выявили протективный эффект маннитола в условиях гипотермии и показали, что в результате их сочетаного применения не только уменьшается зона некроза головного мозга при ишемии, но и снижается нейрофункциональный дефицит [17].

Следовательно, исследование влияния различных инкубационных сред на морфологическую структуру фрагментов неонатальной и половозрелой овариальной при ГХ, а также на их функционирование в организме реципиента после гетеротопической трансплантации при экспериментальной двусторонней овариоэктомии актуально для репродуктивной медицины и криобиологии.

Выводы

Использование МСР для ГХ овариальной ткани имеет существенные преимущества по сравнению с ФСБ. Экспериментально доказано, что в трансплантатах овариальной ткани после ГХ в МСР наблюдается фолликулярное развитие, сопоставимое с таковым после трансплантации свежeweыделенной ткани. У овариоэктомированных животных-реципиентов при трансплантации овариальной ткани после 24-часового ГХ восстанавливается эндокринная функция.

Литература

1. Атраментова ЛА, Утевская ОМ. Статистические методы в биологии учебник. Горловка: 2008. 248 с.
2. Киروشка ВВ, Мединец ЕА, Тищенко ЮО, Бондаренко ТП. Динамика изменения морфологии неонатальной овариальной ткани при гипотермическом хранении в зависимости от состава среды инкубации. Проблемы криобиологии. 2012; 22(1): 61–70.
3. Коржевский ДЭ, Гиляров АВ. Основы гистологической техники. Санкт-Петербург: СпецЛит; 2010. 95 с.
4. Пятикоп ВА, Карамышев ВД, Шеверева ВМ, Дворцовой ВК. Гистологический анализ изменений тканей головного мозга крыс с экспериментальным паркинсонизмом до и после трансплантации криоконсервированных эмбриональных нервных клеток. Проблемы криобиологии. 2006; 16(2): 211–6.
5. Пятикоп ВА, Щегельская ЕА, Микулинский ЮЕ, и др. Восстановление структурно-функциональных параметров у крыс с криогенной травмой головного мозга после трансплантации клеток стромы костного мозга, индуцированных в нейробласты. Проблемы криобиологии. 2005; 15(3): 449–51.
6. Татарчук ТФ, Сольский ЯП. Эндокринная гинекология (клинические очерки). Київ: 2003. 303 с.

that cardiac reperfusion with hyperosmolar mannitol solutions improved the ventricular diastolic function compared with the standard crystalloid solutions. H.I. Karibe et al. revealed a protective effect of mannitol under hypothermia and showed their combined use to entail not only a decrease in brain necrotic zone during ischemia, but the reduction of neuro-functional deficiency as well [12].

Consequently, the study of the effect of various incubation media on morphological structure of neonatal and mature ovarian tissue fragments during HS, as well as on their functioning in a recipient's body after heterotopic transplantation in experimental bilateral ovariectomy, is relevant for reproductive medicine and cryobiology.

Conclusions

The MCS use for ovarian tissue HS has significant advantages as compared to PBS. It was experimentally proven that in the ovarian tissue grafts after HS in MCS, a follicular development comparable to that in fresh tissue grafts was observed. In ovariectomized recipient animals, transplanted with the ovarian tissue after a 24-hour HS, the endocrine function was restored.

References

1. Abir R, Biron-Shental T, Orvieto R, et al. Transplantation of frozen-thawed late-gestational-age human fetal ovaries into immunodeficient mice. *Fertil Steril*. 2009; 92(2): 770–7.
2. Andrews RJ, Bringas JR, Muto RP. Effects of mannitol on cerebral blood flow, blood pressure, blood viscosity, hematocrit, sodium, and potassium. *Surg Neurol*. 1993; 39(3): 218–22.
3. Atramentova LA, Utevskaia OM. [Statistical methods in biology]. Horlovka: Likhtar; 2008. 248 p. Russian.
4. Carvalho FCA, Lucci CM, Silva JRV, et al. Effect of Braun-Collins and saline solutions at different temperatures and incubation times on the quality of goat preantral follicles preserved *in situ*. *Anim Reprod Sci*. 2000; 66(3): 195–208.
5. Gastal GDA, Alves BG, Alves KA, et al. Ovarian fragment sizes affect viability and morphology of preantral follicles during storage at 4°C. *Reprod*. 2017; 153(5): 577–87.
6. Giwa S, Lewis JK, Alvarez L, et al. The promise of organ and tissue preservation to transform medicine. *Nat Biotechnol*. 2017; 35(6):530–42.
7. Gougeon A. Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results. *Hum Reprod*. 1986; 1(2): 81–7.
8. Guiberta EE, Petrenko AY, Balaban CL, et al. Organ preservation: current concepts and new strategies for the next decade. *Transfus Med Hemother*. 2011; 38(2): 125–42.
9. Hirshfield AN, DeSanti AM. Patterns of ovarian cell proliferation in rats during the embryonic period and the first three weeks postpartum. *Biol Reprod*. 1995; 53(5): 1208–21.
10. Israely T, Nevo N, Harmelin A, et al. Reducing ischaemic damage in rodent ovarian xenografts transplanted into granulation tissue. *Hum Reprod*. 2006; 21(6): 1368–79.

7. Abir R, Biron-Shental T, Orvieto R. et al. Transplantation of frozen-thawed late-gestational-age human fetal ovaries into immunodeficient mice. *Fertil Steril.* 2009; 92(2): 770–7.
8. Andrews RJ, Bringas JR, Muto RP. Effects of mannitol on cerebral blood flow, blood pressure, blood viscosity, hematocrit, sodium, and potassium. *Surg Neurol.* 1993; 39: 218–22.
9. Carvalho FCA, Lucci CM, Silva JRV, et al. Effect of Braun-Collins and saline solutions at different temperatures and incubation times on the quality of goat preantral follicles preserved *in situ*. *Anim Reprod Sci.* 2000; 66(3):195–208.
10. Gastal GDA, Alves BG, Alves KA, et al. Ovarian fragment sizes affect viability and morphology of preantral follicles during storage at 4°C. *Reprod.* 2017; 153 (5), 577–87.
11. Giwa S, Lewis JK, Alvarez L, et al. The promise of organ and tissue preservation to transform medicine. *Nat Biotechnol.* 2017; 35(6):530–42.
12. Gougeon A. Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results. *Hum Reprod.* 1986; 1(2): 81–7.
13. Guiberta EE, Petrenko AY, Balaban CL, et al. J.Organ Preservation: Current Concepts and New Strategies for the Next Decade. *Transfus Med Hemother.* 2011; 38(2):125–42.
14. Hirshfield AN, DeSanti AM. Patterns of ovarian cell proliferation in rats during the embryonic period and the first three weeks postpartum. *Biol Reprod.* 1995; 53: 1208–21.
15. Israely T, Nevo N, Harmelin A, et al. Reducing ischaemic damage in rodent ovarian xenografts transplanted into granulation tissue. *Hum Reprod.* 2006; 21(6): 1368–79.
16. Jensen AK, Macklon KT, Fedder J, et al. 86 successful births and 9 ongoing pregnancies worldwide in women transplanted with frozen-thawed ovarian tissue: focus on birth and perinatal outcome in 40 of these children. *J Assist Reprod Genet.* 2017; 34(3): 325–36.
17. Karibe H, Zarow GJ, Weinstein PR. Use of mild intraischemic hypothermia versus mannitol to reduce infarct size after temporary middle cerebral artery occlusion in rats. *J Neurosurg.* 1995; 83: 93–8.
18. Lucci C, Kacinskis M, Rumpf R. Effects of lowered temperatures and media on short-term preservation of zebu (*Bos indicus*) preantral ovarian follicles. *Theriogenology.* 2004; 61 (2–3): 461–72.
19. Magovern GJ, Belling SF, Casale AS, et al. The mechanism of mannitol in reducing ischemic injury: hyperosmolarity or hydroxyl scavenger. *Circulation.* 1984; 70: 191–5.
20. Matson BA, Albertini DF. Oogenesis: chromatin and microtubule dynamics during meiotic prophase. *Mol. Reprod Dev.* 1990; 25: 374–83.
21. Oredsson S, Plate G, Qvarfordt P. The effect of mannitol on reperfusion injury and postschaemic compartment pressure in skeletal muscle. *Eur. J. Vasc Surg.* 1994; 8: 326–31.
22. Paczynski RP, He YY, Diringner MN, Hsu CY. Multiple-dose mannitol reduces brain water content in a rat model of cortical infarction. *Stroke.* 1997; 28(7): 1437–43.
23. Sağsöz N, Kisa U, Apan A. Ischaemia-reperfusion injury of rat ovary and the effect of vitamin C, mannitol and verapamil. *Hum Reprod.* 2002; 17(11): 2972–6.
24. Salama M, Isachenko V, Isachenko E, et al. Advances in fertility preservation of female patients with hematological malignancies. 2017; 10 (11): 951–60.
25. Snow M, Cleary M, Cox S-L, et al. Comparison of the effects of *in vitro* and *in situ* storage on the viability of mouse ovarian tissue collected after death. *Reprod Fertil Dev.* 2001; 13(5–6): 389–94.
26. THart NA, Lmvenink HGD, Ploeg RJ. New Solutions in Organ Preservation. *Transplantation Reviews.* 2002; 16(3): 131–41.
27. Wright CS, Becker DL, Lin JS, et al. Stage-specific and differential expression of gap junctions in the mouse ovary: connexin-specific roles in follicular regulation. *Reprod.* 2001; 121(1): 77–88.
11. Jensen AK, Macklon KT, Fedder J, et al. 86 successful births and 9 ongoing pregnancies worldwide in women transplanted with frozen-thawed ovarian tissue: focus on birth and perinatal outcome in 40 of these children. *J Assist Reprod Genet.* 2017; 34(3): 325–36.
12. Karibe H, Zarow GJ, Weinstein PR. Use of mild intraischemic hypothermia versus mannitol to reduce infarct size after temporary middle cerebral artery occlusion in rats. *J Neurosurg.* 1995; 83(1): 93–8.
13. Kiroshka VV, Medinets EA, Tischenko Yu O, Bondarenko TP. Dynamics of morphological change in neonatal ovarian tissue during hypothermic storage depending on composition of incubation medium. *Probl Cryobiol Cryomed.* 2012; 22(1): 61–70.
14. Korzhevsky DE, Gilyarov AV. [Fundamentals of histological techniques]. St. Petersburg: SpetsLit; 2010. 95 p. Russian.
15. Lucci C, Kacinskis M, Rumpf R. Effects of lowered temperatures and media on short-term preservation of zebu (*Bos indicus*) preantral ovarian follicles. *Theriogenology.* 2004; 61 (2–3): 461–72.
16. Magovern GJ, Belling SF, Casale AS, et al. The mechanism of mannitol in reducing ischemic injury: hyperosmolarity or hydroxyl scavenger. *Circulation.* 1984; 70(3 Pt 2): 191–5.
17. Matson BA, Albertini DF. Oogenesis: chromatin and microtubule dynamics during meiotic prophase. *Mol Reprod Dev.* 1990; 25(4): 374–83.
18. Oredsson S, Plate G, Qvarfordt P. The effect of mannitol on reperfusion injury and postschaemic compartment pressure in skeletal muscle. *Eur J Vasc Surg.* 1994; 8(3): 326–31.
19. Paczynski RP, He YY, Diringner MN, Hsu CY. Multiple-dose mannitol reduces brain water content in a rat model of cortical infarction. *Stroke.* 1997; 28(7): 1437–43.
20. Pyatikop VA, Karamyshev VD, Shevereva VM, Dvortsevoy VK. Histological analysis of changes in brain tissues of rats with experimental Parkinson disease prior to and after transplantation of cryopreserved embryonic nerve cells. *Problems of Cryobiology.* 2006; 16(2): 211–6.
21. Pyatikop VA, Schegelskaya EA, Mikulinsky YuE, et al. [Restoration of structural and functional parameters in rats with cryogenic brain injury after transplantation of bone marrow stromal cells induced into neuroblasts]. *Problems of Cryobiology.* 2005; 15(3): 449–51. Russian
22. Sağsöz N, Kisa U, Apan A. Ischaemia-reperfusion injury of rat ovary and the effect of vitamin C, mannitol and verapamil. *Hum Reprod.* 2002; 17(11): 2972–6.
23. Salama M, Isachenko V, Isachenko E, et al. Advances in fertility preservation of female patients with hematological malignancies. *Expert Rev Hematol.* 2017; 10(11): 951–60.
24. Snow M, Cleary M, Cox S-L, et al. Comparison of the effects of *in vitro* and *in situ* storage on the viability of mouse ovarian tissue collected after death. *Reprod Fertil Dev.* 2001; 13(5-6): 389–94.
25. Tatarchuk TF, Solskyi YP. [Endocrine gynecology (clinical essays)]. Kyiv: Zapovit; 2003. 300 p. Russian.
26. THart NA, Leuvenink HGD, Ploeg RJ. New solutions in organ preservation. *Transplantation Reviews.* 2002; 16(3): 131–41.
27. Wright CS, Becker DL, Lin JS, Warner AE, Hadry K. Stage-specific and differential expression of gap junctions in the mouse ovary: connexin-specific roles in follicular regulation. *Reprod.* 2001; 121(1): 77–88.