

УДК 616-005.4:612.621.38.014

В.В. Кірошка¹, Ю.О. Божкова¹, А.А. Гавас²,
І.А. Рула^{1*}, Т.П. Бондаренко^{1,2}, Г.О. Семко³, В.О. П'ятикоп³

Ендокринна функція трансплантатів оваріальної тканини після нормо- та гіпотермічного зберігання

UDC 616-005.4:612.621.38.014

V.V. Kiroshka¹, Yu.O. Bozhkova¹, A.A. Gavas²,
I.A. Rula^{1*}, T.P. Bondarenko^{1,2}, G.O. Semko³, V.O. Pyatikoop³

Endocrine Function of Ovarian Tissue Grafts After Normo- and Hypothermic Storage

Реферат: У роботі досліджено морфологічні характеристики і функцію оваріальної тканини після 2–120-годинного зберігання при 4 і 37°C у різних за складом середовищах інкубації (манітоловмісний розчин (МВР) та фосфатно-сольовий буфер (ФСБ)). Функцію оваріальної тканини після нормо- та гіпотермічного зберігання вивчали методом гетеротопічної трансплантації тваринам-реципієнтам із одночасною двосторонньою оваріоектомією. Експериментально доведено, що після 2-годинного зберігання при 37°C і 24-годинного зберігання при 4°C у всіх досліджуваних середовищах концентрація естрадіолу в плазмі тварин-реципієнтів складала 18,2–27,5 пг/мл, прогестерону 13,5–18,5 нг/мл (значення після трансплантації свіжовиділеної тканини: естрадіол (28,1 ± 3,6) пг/мл, прогестерон (19,1 ± 2,8) нг/мл). Подовження часу зберігання тканини при 37°C призводило до збільшення кількості дегенеративних фолікулів, підвищення концентрації ТБК-активних продуктів і зниження рівня статевих гормонів після трансплантації за використання як МВР, так і ФСБ. Після 48-годинного гіпотермічного зберігання оваріальної тканини встановлено протективну дію лише МВР, яка виражалася у відновленні ендокринної функції у тварин реципієнтів після трансплантації (естрадіол (13,5 ± 2,5) пг/мл), за використання ФСБ рівень естрадіолу знаходився в межах оваріоектомованих тварин ((7,1 ± 1,5) пг/мл).

Ключові слова: гіпотермічне зберігання, нормотермічне зберігання, морфологічні характеристики, фолікули, статеві гормони, манітоловмісний розчин.

Abstract: Morphological characteristics and function of ovarian tissue after 2–120 hrs of storage at 4 and 37°C in incubation media with different composition (mannitol-containing solution (MCS) and phosphate buffered saline (PBS)) were investigated. The function of ovarian tissue after normo- and hypothermic storage was studied by heterotopic transplantation to recipient animals simultaneously with bilateral ovariectomy. After 2-hour storage at 37°C and 24-hour one at 4°C in all the studied media, the estradiol and progesterone levels in plasma of recipient animals were experimentally proved to be 18.2–27.5 and 13.5–18.5 ng/ml, respectively, (after fresh tissue transplantation these values for estradiol and progesterone made (28.1 ± 3.6) pg/ml and (19.1 ± 2.8) ng/ml, respectively). Prolongation of tissue storage time at 37°C increased the number of degenerative follicles, augmented TBARS concentration and reduced sex hormone levels after transplantation using both MCS and PBS. A protective effect of MCS only, manifested in endocrine function restoration in recipient animals after transplantation ((13.5 ± 2.5) pg/ml of estradiol) was found after 48 hrs of ovarian tissue hypothermic storage. If PBS was used, the estradiol level was within the indices for ovariectomized animals ((7.1 ± 1.5) (pg/ml)).

Key words: hypothermic storage, normothermic storage, morphological characteristics, follicles, sex hormones, mannitol-containing solution.

Вивчення патофізіологічних механізмів ішемічних ушкоджень тканин і органів при нормо- та гіпотермічному зберіганні є одним із актуальних завдань сучасної фізіології. Основна причина ішемії органів і тканин – часткове або повне припинення кровопостачання, що ініціює каскад реакцій: зниження рівня макроергічних сполук, порушення ферментативної кінетики,

The study of pathophysiological mechanisms of ischemic injury in tissues and organs under normo- and hypothermic storage is among the topical tasks in current physiology. The main reason of organ and tissue ischemia is a partial or complete interruption of blood supply, initiating a cascade of such responses as a decrease in the level of macroergic compounds, disorder of enzyme kinetics, accumulation of decay

¹ Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків, Україна;

² Харківський національний університет ім. В.Н. Каразіна, м. Харків, Україна;

³ Харківський національний медичний університет, м. Харків, Україна.

¹ Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine;

² V.N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, Ukraine;

³ Kharkiv National Medical University, 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 17.10.2019

Прийнята до друку 19.10.2021

Received 17, October, 2019

Accepted 19, October, 2021

© 2021 I.A. Rula, 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.

накопичення продуктів розпаду, утворення активних форм кисню [13, 29, 34, 35]. Для зазначених вище патологічних процесів характерним є відкриття мітохондріальних пор, яке опосередковує некроз клітин під час ранньої реперфузії, а також може спричиняти запуск мітохондріального механізму апоптозу [10, 11, 15, 16, 23, 36]. У сучасній літературі обговорюються можливості попередження пошкоджень в ішемізованих органах і тканинах при оптимальних часових та температурних параметрах перфузії, а також шляхом введення до складу перфузійних середовищ різних речовин [4, 8, 18, 26, 30].

Відомо, що під час ішемічних ушкоджень інтенсивність перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) збільшується, внаслідок чого концентрація активних продуктів тиобарбітурової кислоти (ТБК-активні продукти) зростає. Чутливість органів (головний мозок, серце, легені, нирки, скелетні м'язи) до концентрації ТБК-активних продуктів визначається їх стійкістю до гіпоксії [1–3]. Чутливість репродуктивних тканин (зокрема, оваріальної) до ішемії залишається маловивченою. Впровадження методу трансплантації оваріальної тканини в клінічну практику зумовлює підвищення інтересу до вивчення її стійкості після ішемічного впливу. Відновлення репродуктивної функції визначається ступенем ішемічних пошкоджень у тканині, які відбуваються впродовж часу її вилучення, зберігання та трансплантації. Для уникнення наслідків ішемії у тканині до складу інкубаційних середовищ додатково вводять речовини з антиоксидантними властивостями (вітамін Е, аскорбінова кислота, манітол, верапоміл) [12, 19, 20, 21, 25, 28]. Показано, що введення манітолу до складу реперфузійних середовищ зменшує зону некрозу в таких органах, як головний мозок [7, 17, 27], серце [24], нирки [9] та скелетні м'язи [29]. Реперфузія ішемізованої тканини яєчника 20%-м розчином манітолу [33] зменшувала ступінь ішемічного ураження і сприяла відновленню її функції.

У зв'язку з цим метою нашого дослідження було вивчення взаємозв'язку між ендокринною функцією та концентрацією активних продуктів тиобарбітурової кислоти у трансплантатах яєчників залежно від часу інкубації в умовах нормо- та гіпотермічного зберігання.

Матеріали і методи

Об'єктом дослідження була оваріальна тканина 3-місячних щурів лінії Вістар (300 г; $n = 138$), яких утримували в стандартних умовах віварію Інституту проблем кріобіології та кріомедицини

products, reactive oxygen species formation [8, 26, 31, 32]. The opening of mitochondrial pores, which mediates the cell necrosis during early reperfusion and may trigger the mitochondrial pathway of apoptosis, is typical for the mentioned above pathological processes [5, 6, 10, 11, 20, 36]. The current published reports show the possible ways to prevent ischemic injuries in organs and tissues at the optimal time and temperature perfusion parameters, as well as via supplementing the perfusion media with different substances [2, 12, 14, 23, 27].

It is known that during ischemic injuries, the intensity of lipid peroxidation (LPO) rises, as a result of which the concentration of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) increases. The sensitivity of organs (brain, heart, lungs, kidneys, skeletal muscles) to TBARS concentration is determined by their resistance to hypoxia [4, 34, 35], whereas the one of reproductive tissues (ovarian, in particular) to ischemia has still remained poorly understood. The introduction of ovarian tissue transplantation in clinical practice stipulates an increased interest in studying its resistance after ischemic exposure. Restoration of reproductive function is determined by the degree of ischemic injury in tissue, occurring during its removal, storage and transplantation. In order to avoid the consequences of ischemia, the substances with antioxidant properties (vitamin E, ascorbic acid, mannitol, verapamil) are additionally introduced into incubation media [7, 15, 17, 18, 22, 25]. The mannitol supplement into reperfusion media was shown to reduce the necrosis area in such organs as the brain [33, 11, 24], heart [21], kidneys [3] and skeletal muscles [26]. The reperfusion of ischemia-affected ovarian tissue with 20% mannitol solution [30] decreased the level of ischemic injury and restored its function.

In this context, the aim of this study was to investigate the relationship between the endocrine function and thiobarbituric acid reactive substances concentration in ovarian grafts depending on incubation time under normo- and hypothermic storage.

Materials and methods

The research object was the ovarian tissue of 3-month-old Wistar rats (300 g; $n = 138$), housed under standard conditions in animal facility of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine (IPCC of NAS of Ukraine). The experiments were carried out in accordance with the Law of Ukraine 'On the Protection of Animals Against Cruelty' (№ 3447-IV of February 21, 2006) agreed with the provisions of the 'European Convention for the Protection



національної академії наук України (ІПКіК НАН України). Експерименти проводили відповідно до Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№3447-IV від 21.02.2006) з дотриманням вимог комітету з біоетики ІПКіК НАН України (Протокол №4 від 26.11.13), узгоджених із положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986).

Для отримання фрагментів статевозрілої оваріальної тканини яєчники подрібнювали ножицями для мікрохірургії (0,5–1 мм³) і поміщали в стерильне живильне середовище. На цьому етапі інкубацію фрагментів яєчників проводили при 4 і 37°C протягом 2, 4, 6, 24, 48, 72 і 120 годин у різних за складом розчинах (ммоль/л): I – фосфатно-сольовий буфер (ФСБ): NaCl – 130, KCl – 20, фосфатний буфер – 20, pH 7,4; II – манітоловмісний розчин (МВР): манітол – 250, NaCl – 10, KCl – 20, фосфатний буфер – 20, pH 7,4.

Концентрацію активних продуктів тіобарбітурової кислоти (ТБК-активні продукти) у гомогенаті тканини визначали за реакцією між малоновим діальдегідом та тіобарбітуровою кислотою, яка в умовах високої температури та кислого середовища (pH 3,0) утворює триметиновий комплекс рожевого кольору. Величину поглинання забарвленого розчину вимірювали на спектрофотометрі «СФ-46» («ЛОМО», Росія) при $\lambda = 532$ нм. Результати виражали в мкмоль/мг тканини. Концентрацію ТБК-активних продуктів у гомогенаті оваріальної тканини визначали одразу після інкубації.

Оцінка функції оваріальної тканини, підданій нормо- та гіпотермічному зберіганню у розчинах I або II, була доцільною лише у випадках, коли рівень збереження нормальних фолікулів у її структурі становив не менше 50%.

Функцію оваріальної тканини після нормо- та гіпотермічного зберігання вивчали методом гетеротопічної трансплантації під капсулу лівої нирки щурів одночасно з двосторонньою овариєктомією. Для проведення експериментальної роботи тварин було розділено на групи: 1 – контроль (інтактні тварини); 2 – тварини з овариєктомією; 3 – тварини з трансплантацією свіжовиділеної оваріальної тканини; 4 – тварини з трансплантацією оваріальної тканини після 2-годинної інкубації при 37°C (а) в розчинах із ФСБ – (4а (I)) та МВР (4а (II)) або після 24-годинної інкубації при 4°C (в) – (4в (I)) та (4в (II)) відповідно; 5 – тварини з трансплантацією оваріальної тканини після 4-годинної інкубації при 37°C (а) у розчи-

of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes' (Strasbourg, 1986). The performance of experiments was approved by the Bioethics Committee of the IPCC of NAS of Ukraine (Record №4 of November 26, 2013).

To obtain the fragments of mature ovarian tissue, the ovaries were cut with microsurgical scissors (0.5–1 mm³) and placed into sterile nutrient medium. At this stage, the ovarian fragments were incubated at 4 and 37°C for 2, 4, 6, 24, 48, 72 and 120 hrs in the solutions with different composition (mmol/l): the solution I was the phosphate-buffered saline (PBS), consisted of 130 NaCl, 20 KCl, 20 phosphate buffer, pH 7.4; the solution II, mannitol-containing solution (MCS), comprised 250 mannitol, 10 NaCl, 20 KCl, 20 phosphate buffer, pH 7.4.

The TBARS concentration in tissue homogenate was determined by the reaction between malonic dialdehyde and thiobarbituric acid, which under high temperature and acid medium (pH 3.0) produced a pink trimethine complex. The absorption coefficient of stained solution was measured with spectrophotometer SF-46 (LOMO, Russia) at $\lambda = 532$ nm. The results were expressed in $\mu\text{mol/mg}$ of tissue. The TBARS concentration in ovarian tissue homogenate was determined immediately after incubation.

Only in cases when the level of normal follicle preservation within ovarian tissue structure was not less than 50%, it was expedient to assess the function of the ovarian tissue, subjected to normo- and hypothermic storage in the solutions I or II.

The function of ovarian tissue after normo- and hypothermic storage was studied using the heterotopic transplantation under the left kidney capsule of rats simultaneously with bilateral ovariectomy. To perform experiments, the animals were divided into the following groups: the group 1 was the control (intact animals); the group 2 comprised the ovariectomized animals; in the group 3 were those with transplanted fresh ovarian tissue; the group 4 consisted of animals with transplanted ovarian tissue after 2-hour incubation at 37°C (a) in the solutions with PBS and MCS – (4a (I)) and (4a (II)), respectively, or after 24-hour incubation at 4°C (b) – (4b (I)) and (4b (II)), respectively; in the group 5 were the animals with transplanted ovarian tissue after 4-hour incubation at 37°C (a) in the solutions with PBS and MCS – (5a (I)) and – (5a (II)), correspondingly, or at 4°C for 48 hrs (b) – 5b (I) and 5b (II) for PBS and MCS, respectively.

Endocrine function of ovarian tissue grafts was analyzed to day 30 after transplantation. Animals were sacrificed by decapitation.

Estradiol and progesterone levels in blood plasma of recipient animals were determined with chemiluminescent enzyme-linked immunosorbent



нах із ФСБ – (5а (I)) та МВР – (5а (II)) або при 4°C впродовж 48 годин (в) із ФСБ – (5в (I)) та МВР – (5в (II)) відповідно.

Аналіз ендокринної функції трансплантатів оваріальної тканини здійснювали на 30-ту добу після трансплантації. Тварин виводили з експерименту методом декапітації.

Концентрацію естрадіолу та прогестерону в плазмі крові тварин-реципієнтів визначали методом хемілюмінесцентного імуоферментного аналізу з використанням стандартних тест-наборів «ST AIA-PACK hsE2 G» та «ST AIA-PACK PRO» («Tosoh Corporation», Японія) згідно з інструкцією, а також за допомогою імуоферментного аналізатора «Tosoh AIA 1200» («Tosoh Corporation», Японія).

Трансплантати для гістологічного дослідження вилучали разом із ниркою та фіксували у розчині 10%-го формаліну. З кожного зразка робили серійні зрізи товщиною 10 мкм, які забарвлювали гематоксином та еозином [5, 6, 14]. Гістологічний аналіз препаратів здійснювали за допомогою мікроскопа з вбудованою камерою «Axio Observer Z1» («Carl Zeiss», Німеччина) з об'єктивами «Plan Fluor» (×20, ×40) і пакета прикладних програм для обробки зображення «Axio-Vision Release 4.7.2» («Carl Zeiss»). Стадії розвитку фолікулів ідентифікували відповідно до класифікації A.P.R. Rodrigues [32].

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програм «Excel» («Microsoft», США) та «Statistica» («StatSoft», США). Залежно від розподілу даних для порівняння вибірок використовували параметричний t-критерій Стьюдента або непараметричний U-критерій Манна-Вітні. Дані представляли у вигляді $M \pm m$ ($p < 0,05$).

Результати та обговорення

На рис. 1 представлено зміну морфологічної структури оваріальної тканини залежно від часу ішемії при 37°C у ФСБ (розчин I). Видно, що в нормі фолікули мають сферичний ооцит із однорідною цитоплазмою (рис. 1, А). Зовні ооцит оточений глікопротеїновою оболонкою – *Zona Pellucida* (ZP), яка має однакову товщину і гомогенність по всьому периметру клітини (рис. 1, А). До ZP щільно прилягають клітини гранульози, які контактують між собою та внутрішньою стороною їх базальної мембрани. З зовнішньої сторони базальної мембрани знаходяться тека-клітини.

Після 2-годинної інкубації фрагментів оваріальної тканини при 37°C у розчині I відбуваються незначні зміни морфологічної структури фо-

assay using the standard test kits 'ST AIA-PACK hsE2 G' and 'ST AIA-PACK PRO' (Tosoh Corporation, Japan) according to the instructions, and Tosoh AIA 1200 enzyme immunoassay analyzer (Tosoh Corporation, Japan).

Grafts for histological examination were removed together with the kidney and fixed in a 10% formalin solution. Serial sections with 10 μm thickness were made from each sample, then stained with hematoxylin and eosin [9, 16, 33]. Histological preparations were studied using Axio Observer Z1 microscope (Carl Zeiss, Germany) with Plan Fluor ×20 and 40 lenses, using the Axio-Vision Release 4.7.2 image processing software (Carl Zeiss). Stages of follicle development were identified according to the Rodrigues classification [29].

The results were statistically processed using the Excel (Microsoft, USA) and Statistica (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

Fig. 1 shows the change in ovarian tissue morphology depending on time of ischemia at 37°C in PBS (solution I). It reveals that normally the follicles have a spherical oocyte with a homogeneous cytoplasm (Fig. 1A). Externally, the oocyte is surrounded by a glycoprotein layer: *Zona Pellucida* (ZP), which has the same thickness and homogeneity around the entire perimeter of the cell (Fig. 1A). Granulosa cells, being in contact with each other and internal side of their basement membrane, are tightly adjacent to ZP. There are the theca cells outside the basement membrane.

Follicle morphology was slightly changed (Fig. 1B) and granulosa cells were somewhat compressed after 2-hour incubation of ovarian tissue fragments at 37°C in the solution I. Herewith, the granulosa cells were in a close contact with the oocyte of spherical shape and with slightly granular cytoplasm. The structure of theca cells remained unchanged, the contact between them was preserved and they were tightly adjacent to the basement membrane. Prolongation of ischemia time up to 4 hrs at 37°C in the solution I (Fig. 1C) disrupted the contacts of granulosa cells between themselves and oocyte, and accumulated fluid between granulosa cells. Herewith there were no visible changes in theca cell layers. After 6-hour incubation of ovarian tissue fragments at 37°C in the solution I, the fluid content between all the structural tissue elements increased (Fig. 1D). In this case the oocyte was further compressed and its contour was deformed, and the cell-to-cell con-



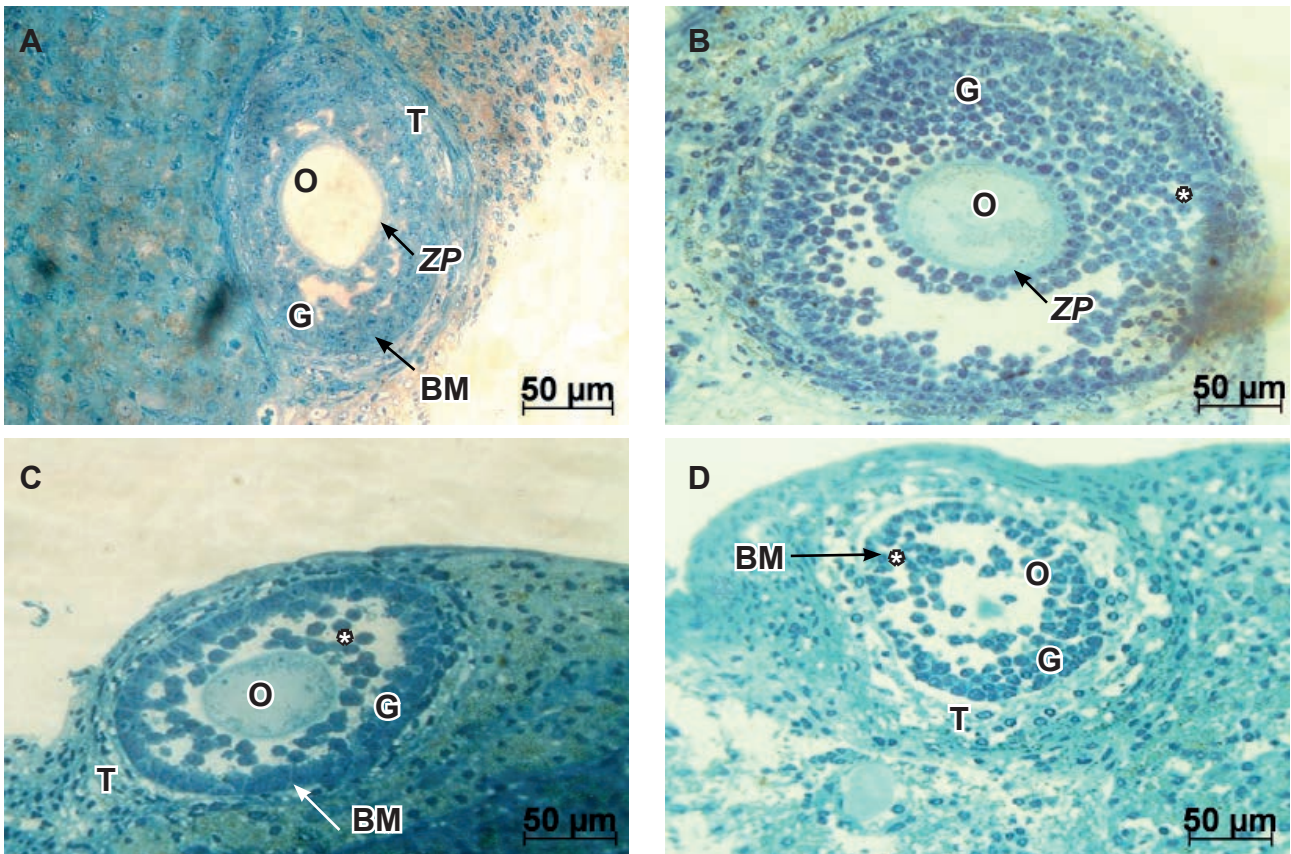


Рис. 1. Гістопрепарати фрагментів статевозрілої оваріальної тканини після інкубації в розчині I при 37°C: **A** – свіжовиділена тканина; **B** – після 2 годин інкубації; **C** – після 4 годин інкубації; **D** – після 6 годин інкубації. O – ооцит, ZP – Zona Pellucida, G – гранульозні клітини, BM – базальна мембрана, T – тека-клітини, * – акумуляція рідини. Забарвлення толуїдиновим синім, n = 7.

Fig. 1. Histology of mature ovarian tissue fragments after incubation in the solution I at 37°C: **A** – fresh tissue; **B** – after 2-hour incubation; **C** – after 4-hour incubation; **D** – after 6-hour incubation. O – oocyte, ZP – Zona Pellucida, G – granulosa cells, BM – basement membrane, T – theca cells, * – fluid accumulation. Staining with toluidine blue, n = 7.

лікулів (рис. 1, B) та незначне стиснення клітин гранульози. При цьому останні зберігають щільний контакт із ооцитом, який має сферичну форму та незначно гранульовану цитоплазму. Структура тека-клітин залишається незмінною, вони зберігають контакт між собою і щільно прилягають до базальної мембрани. Подовження часу ішемії до 4 годин при 37°C у розчині I (рис. 1, C) викликає порушення контактів клітин гранульози між собою та ооцитом, а також акумуляцію рідини між клітинами гранульози. При цьому шари клітин теки залишаються без видимих змін. Після 6-годинної інкубації фрагментів оваріальної тканини при 37°C у розчині I вміст рідини між усіма структурними елементами тканини збільшується (рис. 1, D). У цьому випадку спостерігаються подальше стиснення ооциту та деформація його контуру, а також порушення міжклітинних контактів між усіма структурними елементами фолікула.

Інкубація фрагментів статевозрілої оваріальної тканини при 4°C у розчині I викликала нез-

tacts among the entire structural follicular elements were disrupted as well.

Incubation of mature ovarian tissue fragments at 4°C in the solution I slightly transformed the follicle structure after 48-hour hypothermic storage (Fig. 2).

A 24-hour incubation in the solution I at 4°C displayed no change in ovarian tissue morphology and it was close to the physiological norm (Fig. 2A). The oocyte, surrounded by ZP of uniform thickness, maintained a close contact with granulosa cells. In this case, there were observed the tight contacts between granulosa cells and the basement membrane, as well as between the basement membrane and theca cells. A slight compression of granulosa cells occurred. The prolongation of incubation time up to 48 hrs at this temperature distorted the oocyte nucleus contour, decreased ZP thickness (Fig. 2B), slightly compressed granulosa cells and formed a space with fluid between them. To the 72nd hour of incubation at 4°C in the solution I, no ZP was present, a blurred oocyte contour and disorder in



начну трансформацію структури фолікулів після 48 годин гіпотермічного зберігання (рис. 2).

Видно, що після 24-годинної інкубації в розчині I при 4°C морфологічна структура оваріальної тканини залишалася близькою до фізіологічної норми (рис. 2, А). Ооцит, оточений рівномірною за товщиною ZP, зберігав щільний контакт із клітинами гранульози. В цьому випадку спостерігаються щільні контакти між клітинами гранульози і базальною мембраною, а також між базальною мембраною та тека-клітинами. Відбувається незначне стиснення клітин гранульози. Збільшення часу інкубації до 48 годин за цієї температури викликало деформацію контуру ядра ооциту, зменшення товщини ZP (рис. 2, В), незначне стиснення клітин гранульози та формування простору з рідиною між ними. На 72-ту годину інкубації при 4°C у розчині I ZP була відсутня, виявлялися розмитий контур ооциту та порушення всіх міжклітинних контактів структури тканини (рис. 2, С).

Морфологічні зміни в структурі фолікула під час зберігання оваріальної тканини в розчині II представлено на рис. 3 та 4. Після 2-годинної інкубації в розчині II при 37°C фолікули містили сферичний ооцит із великим ексцентричним ядром, оточеним помірно гранулярною цитоплазмою (рис. 3, А). Зовні ооцит мав рівномірну ZP, міжклітинні контакти зберігалися в усій

the whole cell-to-cell contacts of tissue structure were revealed (Fig. 2C).

Figs. 3 and 4 illustrate morphological changes in follicular structure during storage of ovarian tissue in the solution II. After 2-hour incubation in the solution II at 37°C, the follicles contained a spherical oocyte with a large eccentric nucleus surrounded by moderately granular cytoplasm (Fig. 3A). Externally, the oocyte had a uniform ZP, the cell-to-cell contacts were preserved in the entire structure of the follicle (Fig. 3A). A change of rounded contour of oocyte to a concave one occurred to the 4th hour of incubation at 37°C in the solution II (Fig. 3B). Herewith the ZP was of uniform thickness throughout the oocyte contour. It should be noted that the contacts between granulosa and theca cells, and basement membrane were preserved. When the incubation time was prolonged up to 6 hrs at 37°C in the solution II, the transformation of follicle structure continued.

Histological analysis slides showed the deformation of oocyte contour, a coarse-grained cytoplasm, thinning of ZP and loss of its contour (Fig. 3C). Herewith the granulosa cells were separated from oocyte. Granulosa and theca cells were compressed, the fluid between them was accumulated, resulting in granulosa cells separation and detachment from the basement membrane (Fig. 3C).

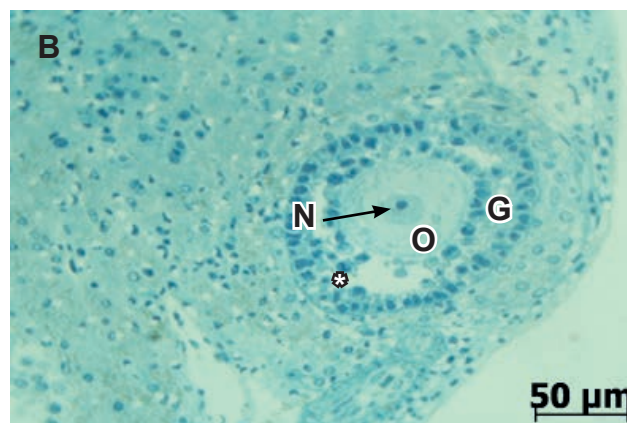
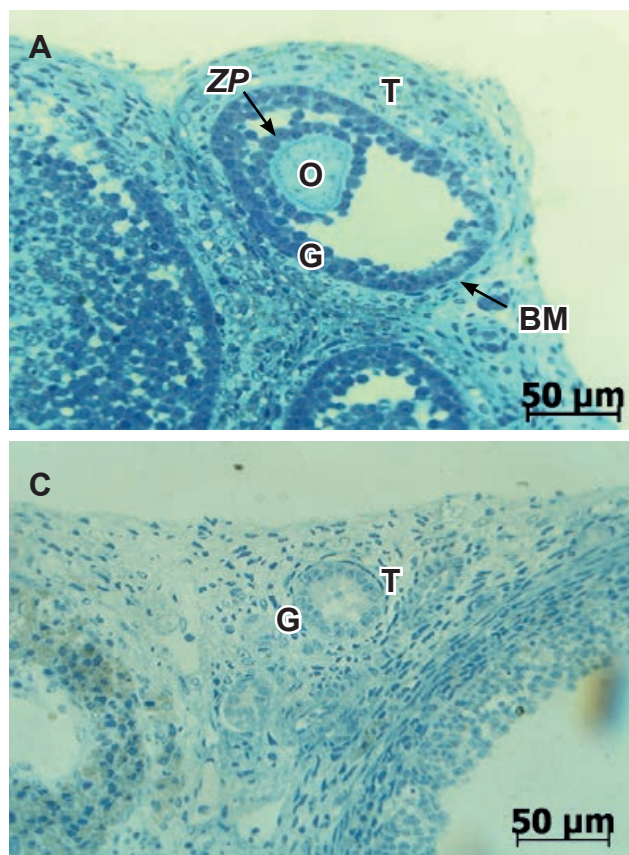


Рис. 2. Гістопрепарати фрагментів статевозрілої оваріальної тканини після інкубації в розчині I при 4°C: **А** – після 24 годин інкубації; **В** – після 48 годин інкубації; **С** – після 72 годин інкубації. О – ооцит, N – ядро, ZP – Zona Pellucida, G – гранульозні клітини, BM – базальна мембрана, Т – тека-клітини, * – акумуляція рідини. Забарвлення толуїдиновим синім, n = 7.

Fig. 2. Histology of mature ovarian tissue fragments after incubation in the solution I at 4°C: **A** – after 24-hour incubation; **B** – after 48-hour incubation; **C** – after 72-hour incubation. O – oocyte, N – nucleus, ZP – Zona Pellucida, G – granulosa cells, BM – basement membrane, T – theca cells, * – fluid accumulation. Staining with toluidine blue, n = 7.



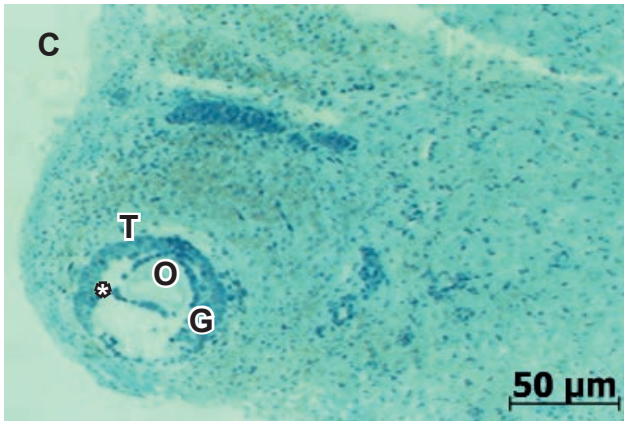
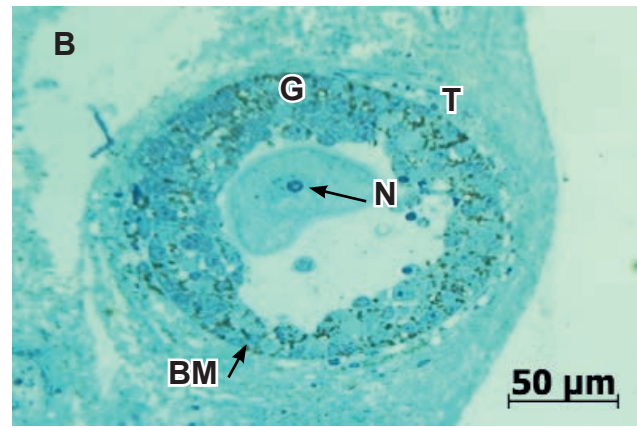
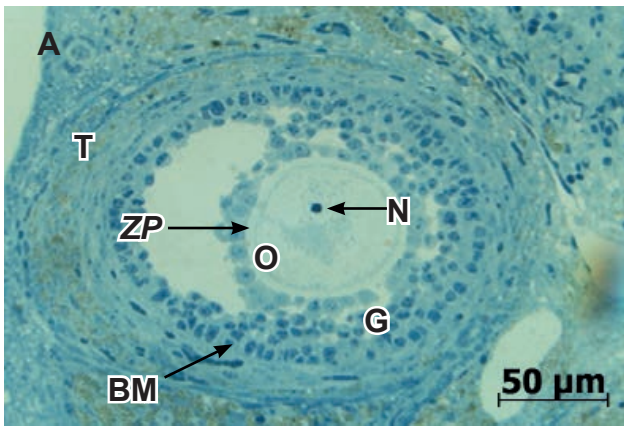


Рис. 3. Гістопрепарати фрагментів статевозрілої оваріальної тканини після інкубації в розчині II при 37°C: **A** – свіжовиділена тканина; **B** – після 2 годин інкубації; **C** – після 4 годин інкубації; **D** – після 6 годин інкубації. О – ооцит, N – ядро, ZP – Zona Pellucida, G – гранульозні клітини, BM – базальна мембрана, T – тека-клітини. Забарвлення толуїдиновим синім, n = 7.

Fig. 3. Histology of mature ovarian tissue fragments after incubation in the solution II at 37°C: **A** – fresh tissue; **B** – after 2-hour incubation; **C** – after 4-hour incubation; **D** – after 6-hour incubation. O – oocyte, N – nucleus, ZP – Zona Pellucida, G – granulosa cells, BM – basement membrane, T – theca cells. Staining with toluidine blue, n = 7.

структурі фолікула (рис. 3, A). Зміна округлого контуру ооциту на увігнутий відбувалася на 4-ту годину інкубації при 37°C у розчині II (рис. 3, B). При цьому ZP мала рівномірну товщину по всьому контуру ооциту. Слід зазначити, що контакти між клітинами гранульози, теки та базальною мембраною зберігалися. За умов збільшення часу інкубації до 6 годин при 37°C у розчині II трансформація структури фолікула продовжувалася.

Гістологічний аналіз препаратів показав, що контур ооциту деформується, має грубозернисту цитоплазму, ZP стоншується та втрачає свій контур (рис. 3, C). При цьому клітини гранульози відокремлюються від ооциту. Відбувається стиснення клітин гранульози та теки, акумулюється рідина між ними, внаслідок чого клітини гранульози роз'єднуються та відокремлюються від базальної мембрани (рис. 3, C).

Зниження температури інкубації до 4°C викликало аналогічну модифікацію морфологічної структури фолікула в розчині II залежно від часу експозиції (рис. 4).

Після 24 годин інкубації тканини в розчині II відбувалися незначне стиснення ооциту та деформація його контуру, але при цьому зберігалися щільні контакти між ооцитом та клітинами гранульози (рис. 4, A). Слід зазначити, що

When the incubation temperature was reduced down to 4°C, a similar modification of follicle morphology in the solution II depending on exposure time occurred (Fig. 4).

After 24-hour tissue incubation in the solution II, the oocyte was slightly compressed and its contour was distorted, but the tight contacts between oocyte and granulosa cells were preserved (Fig. 4A). Notably, that despite the oocyte compression, all somatic cells within the follicle structure were connected to one another. Prolongation of exposure time up to 48 hrs in the solution II resulted in further deformation of rounded contour of oocyte to a concave one (Fig. 4B). In this case, no space filled with substances of protein origin close to ZP was formed, conversely, the contact between oocyte and granulosa cells was preserved. The granulosa and theca cells were linked to each other and to the basement membrane. The results of study of follicle morphology after a 72-hour hypothermic storage showed a distorted contour and coarse-grained cytoplasm in oocyte (Fig. 4C). Granulosa cells were compressed and separated from the oocyte. Granulosa cells were in contact with each other and the basement membrane, to which the theca cells were tightly adjacent (Fig. 4C).

Comparison of morphological changes in follicle structure under normo- and hypothermic storage



попри стиснення ооциту всі соматичні клітини в структурі фолікула були поєднані між собою. Пролонгування часу експозиції до 48 годин у розчині II призвело до подальшої деформації округлого контуру ооциту на увігнутий (рис. 4, В). У цьому випадку близько до ZP простір із речовин білкового походження не формувався, а, навпаки, зберігався контакт між ооцитом і клітинами гранульози. Клітини гранульози та теки були поєднані між собою та базальною мембраною. Результати дослідження морфологічної структури фолікула після 72-годинного гіпотермічного зберігання показали, що ооцит має деформований контур і грубозернисту цитоплазму (рис. 4, С). Клітини гранульози стиснені та відокремлені від ооциту. Клітини гранульози контактують між собою та базальною мембраною, до якої щільно прилягають клітини теки (рис. 4, С).

Порівняння морфологічних змін структури фолікула при нормо- та гіпотермічному зберіганні виявило, що характер трансформації структурних елементів фолікулів визначається, в першу чергу, складом розчину інкубації.

Результати кількісного аналізу збереження фолікулів у структурі оваріальної тканини за умов ішемії залежно від часу, температури і складу середовища інкубації представлено на рис. 5. Кількість морфологічно нормальних фолікулів у фрагментах тканини яєчника залишалася високою (80–90%) в усіх досліджуваних середовищах після 2-годинної нормотермії (37°C) і 2–24-годинної гіпотермії при 4°C. Збільшення часу інкубації до 4 годин при 37°C і до 48 годин при 4°C значуще знижувало кількість нормальних фолікулів до 45–65%. Критичним часом інкубації для фрагментів оваріальної тканини вважається 6 годин (при 37°C) і 72 години (при 4°C), за цих умов рівень збереження фолікулів становив 30–35%. Слід зазначити, що, попри різницю в трансформації морфологічної структури фолікула залежно від композиційного складу розчину, процент нормальних фолікулів у структурі фрагмента тканини залежить від часових і температурних показників моделювання ішемії та не залежить від складу середовища інкубації.

Ішемічне пошкодження клітин і тканин характеризується активацією анаеробного шляху метаболізму, зниженням вмісту макроергічних сполук, порушенням ферментативної кінетики, внаслідок чого накопичуються ТБК-активні продукти. У наступній серії експериментів нами було проведено аналіз вмісту ТБК-активних продуктів у гомогенаті оваріальної тканини після ішемічного впливу в тих експерименталь-

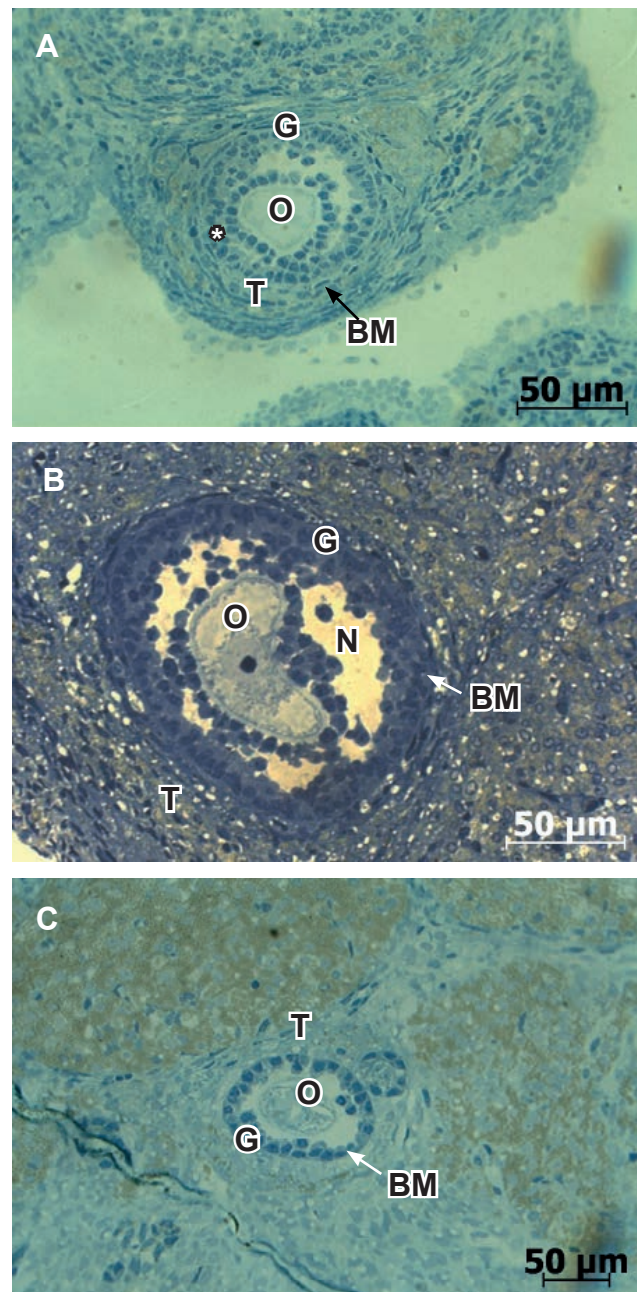


Рис. 4. Гістопрепарати фрагментів статевозрілої оваріальної тканини після інкубації в розчині II при 4°C: **A** – після 24 годин інкубації; **B** – після 48 годин інкубації; **C** – після 72 годин інкубації. О – ооцит, N – ядро, G – гранульозні клітини, BM – базальна мембрана, Т – тека-клітини. Забарвлення толуїдиновим синім, $n = 7$.

Fig. 4. Histology of mature ovarian tissue fragments after incubation in the solution II at 4°C: **A** – after 24-hour incubation; **B** – after 48-hour incubation; **C** – after 72-hour incubation. O – oocyte, N – nucleus, G – granulosa cells, BM – basement membrane, T – theca cells. Staining with toluidine blue, $n = 7$.

revealed the nature of transformation of follicular structural elements to be primarily determined by the incubation solution composition.

Fig. 5 presents the results of quantitative analysis of follicle preservation within the ovarian tis-



них точках, в яких рівень збереження фолікулів був понад 30% (рис. 6). Концентрація ТБК-активних продуктів зростала відносно контролю в 3–4 і 6–8 разів через 4 і 6 годин інкубації при 37°C відповідно (рис. 6, А). За цієї температури вміст ТБК-активних продуктів був однаковим у всіх досліджуваних середовищах. Під час гіпотермічного зберігання (4°C) було виявлено залежність інтенсивності процесу утворення ТБК-активних продуктів від складу середовища. В цьому випадку відмінності значення відзначено на тривалих термінах ішемічного впливу (рис. 6, В). Так, після 48 годин гіпотермічного зберігання тканини у розчині II концентрація ТБК-активних продуктів становила $(0,13 \pm 0,05)$ нмоль/мг, що в 2,5 раза нижче, ніж у розчині I $(0,31 \pm 0,06)$ нмоль/мг. Аналогічна залежність зберігалася й за умов збільшення часу інкубації до 120 годин.

Взаємозв'язок між ступенем досліджених вище ішемічних ушкоджень і відновленням ендокринної функції оваріальної тканини вивчали методом гетеротопічної трансплантації, яка була проведена після 2- і 4-годинної інкубації при 37°C і 24- і 48-годинної інкубації при 4°C. У цих випадках, незважаючи на збільшення концентрації ТБК-активних продуктів, зберігалася понад 50% фолікулів з нормальною морфологічною будовою.

Фолікулярний профіль трансплантатів оваріальної тканини на 30-ту добу спостереження усіх досліджуваних груп представлено в таблиці. Після нормотермії (37°C) упродовж 2 та 4 годин кількість фолікулів у трансплантаті визначалася часом зберігання та не залежала від складу середовища інкубації. Так, трансплантати свіжовиділеної оваріальної тканини (група 3) та після 2-годинної ішемії в розчинах I (група 4а(I)) та II (група 4а(II)) були представлені фолікулами різного ступеня зрілості, а також жовтими тілами (таблиця). Слід зазначити, що площа фіброзу трансплантатів ішемізованої тканини становила близько $(10,2 \pm 1,9)\%$ тільки в групі 4а(I). В усіх експериментальних групах трансплантація оваріальної тканини після 4-годинної ішемії призводила до повного її склерозування на 30-ту добу спостереження.

Після інкубації фрагментів оваріальної тканини за умов гіпотермії (4°C) фолікулярний профіль трансплантатів (30-та доба спостереження) визначався часом гіпотермії і складом середовища інкубації (таблиця). Кількість різних за ступенем зрілості фолікулів та жовтих тіл у трансплантатах свіжовиділеної оваріальної тканини (група 3) та після 24-годинної інкубації

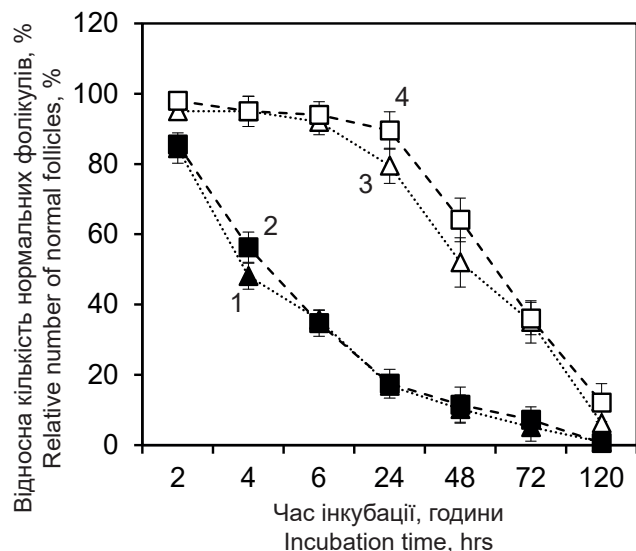


Рис. 5. Рівень збереженості нормальних фолікулів у структурі оваріальної тканини після 2–120-годинного ішемічного впливу при 37 і 4°C, 1 – розчин I (37°C); 2 – розчин II (37°C); 3 – розчин I (4°C); 4 – розчин II (4°C), $p < 0,05$, $n = 8$.

Fig. 5. Level of normal follicle preservation within ovarian tissue structure after 2–120-hour ischemic exposure at 37 and 4°C, 1 – solution I (37°C); 2 – solution II (37°C); 3 – solution I (4°C); 4 – solution II (4°C), $p < 0.05$, $n = 8$.

sue structure under ischemia depending on time, temperature and incubation medium composition. The number of morphologically normal follicles in ovarian tissue fragments remained high (80–90%) in all the studied media after 2-hour normothermia (37°C) and 2–24-hour hypothermia at 4°C. Prolonging the incubation time up to 4 hrs at 37°C and up to 48 hrs at 4°C significantly reduced the number of normal follicles down to 45–65%. The incubation time of 6 hrs (at 37°C) and 72 hrs (at 4°C) for ovarian tissue fragments is considered as critical, and under these conditions the level of follicle preservation was 30–35%. It should be noted that, despite the difference in transformation of follicle morphology depending on solution composition, the percentage of normal follicles within the tissue fragment structure was determined by time and temperature indices of ischemia simulation and did not depend on incubation medium composition.

Ischemic injury of cells and tissues is characterized by activation of anaerobic metabolic pathway, a decreased content of macroergic compounds, impaired enzyme kinetics, resulting in TBARS accumulation. In next series of experiments, we analyzed the TBARS content in ovarian tissue homogenate after ischemic exposure at those experimental points where the level of follicle preservation was higher than 30% (Fig. 6). The TBARS concentra-



в усіх досліджуваних розчинах були порівняні між собою. Трансплантація оваріальної тканини після 48-годинної інкубації призводила до повного її склерозування на 30-ту добу спостереження у групах 5а(I) і 5в(I). Фолікули та жовті тіла виявилися в трансплантатах групи 5в(II). Слід зазначити, що площа фіброзу трансплантатів цієї групи становила близько $(30,6 \pm 3,3)\%$.

Показано, що у тварин-реципієнтів рівень естрадіолу і прогестерону після трансплантації тканини, ішемізованої протягом 2 годин при 37°C , співпадав з рівнем тих самих гормонів після трансплантації свіжовиділеної тканини (рис. 7). Так, концентрація естрадіолу в плазмі крові становила $(22,9 \pm 3,2)$ пг/мл у шурів групи 4а(I), $(27,5 \pm 3,3)$ пг/мл – у групі 4а(II), що значуще не відрізнялося від рівня цих гормонів після трансплантації свіжовиділеної тканини яєчника $(28,1 \pm 3,6)$ пг/мл (група 3) (рис. 7А). Збільшення часу ішемії тканини до 4 годин при 37°C (групи 5а (I) і 5а (II)) призводило до зниження ендокринної функції ішемізованої оваріальної тканини після її трансплантації. Так, концентрація естрадіолу в плазмі крові шурів-реципієнтів становила $(9,1 \pm 2,1)$ та $(11,9 \pm 2,31)$ пг/мл (групи 5а(I) і 5а(II) відповідно) порівняно з $(7,1 \pm 1,5)$ пг/мл у оваріоектомованих тварин; прогестерону – $(3,4 \pm 1,2)$ та $(4,8 \pm 0,8)$ нг/мл (групи 5а(I) і 5а(II) відповідно) порівняно з $(3,1 \pm 0,9)$ нг/мл у оваріоектомованих тварин (рис. 7, В).

Відмінності стероїдогенної функції трансплантатів у різних за складом середовищах інкубації були виявлені після трансплантації тканини, ішемізованої при 4°C протягом 24 годин у групах 4в(I) та 4в(II) (рис. 8). Використання розчину II для гіпотермічного зберігання статевозрілої оваріальної тканини протягом 24 годин сприяло відновленню її стероїдогенної функції в межах фізіологічної норми (естрадіолу $(23,4 \pm 3,4)$ проти $(30,1 \pm 3,1)$ пг/мл та прогестерону $(17,5 \pm 3,0)$ проти $(25,8 \pm 3,1)$ нг/мл, групи 4в(II) та I відповідно) (рис. 8). Інкубація фрагментів оваріальної тканини при 4°C упродовж 24 годин у розчині I значуще знижувала ендокринну

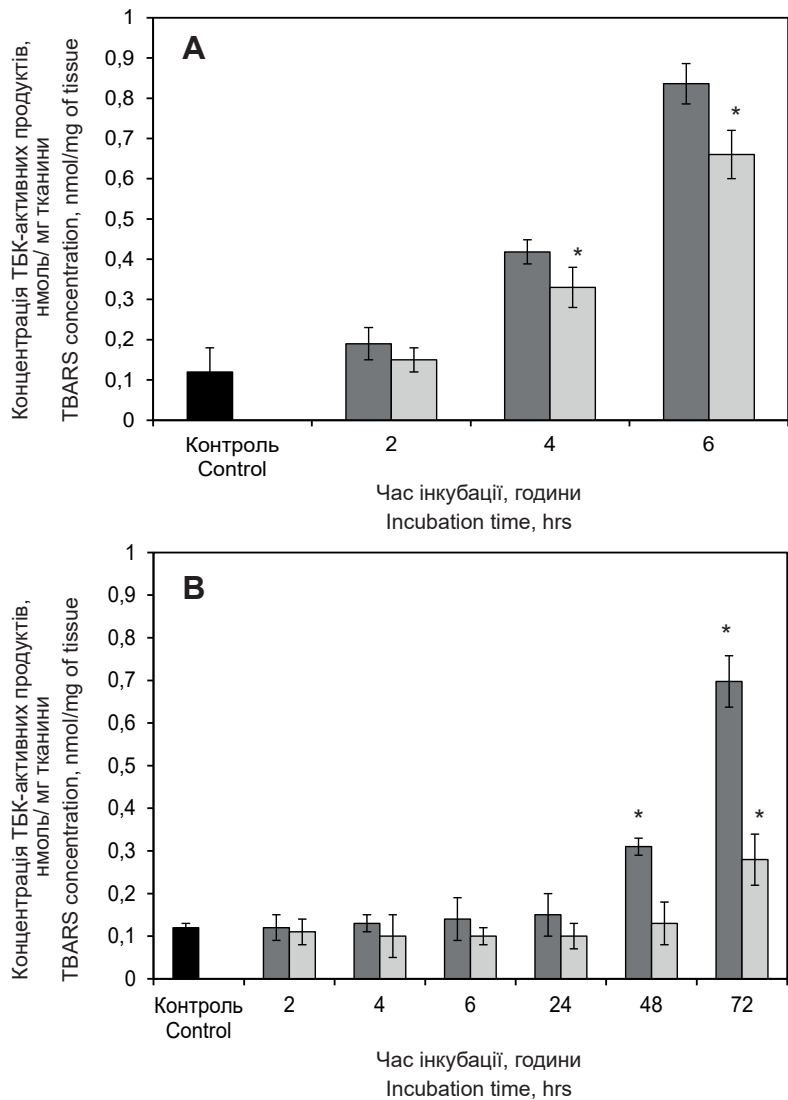


Рис. 6. Концентрація ТБК-активних продуктів у фрагментах оваріальної тканини після інкубації при 37°C (А) і 4°C (В) у розчинах I (■) та II (□), різниця значуща відносно інтактних тварин (*), $p < 0,05$, $n = 9$.

Fig. 6. TBARS concentration in ovarian tissue fragments after incubation at 37°C (A) and 4°C (B) in the solutions I (■) and II (□), difference is significant relative to the intact animals (*), $p < 0.05$, $n = 9$.

tion increased relative to the control by 3–4 and 6–8 times after 4 and 6 hrs of incubation at 37°C , respectively (Fig. 6A). At this temperature, the TBARS content was the same in all the studied media. Hypothermic storage (4°C) revealed the dependence of TBARS formation intensity on the medium composition. In this case, the differences in values were observed at long periods of ischemic exposure (Fig. 6B). For example, after 48-hour hypothermic storage of tissue in the solution II, the TBARS concentration was (0.13 ± 0.05) nmol/mg, that was in 2.5 times lower than in the solution I (0.31 ± 0.06) nmol/mg. A similar dependence was kept when extending the incubation time up to 120 hrs.



Гістологічний аналіз трансплантатів оваріальної тканини, які були інкубовані при 37°C (упродовж 2 та 4 годин) та при 4°C (упродовж 24 та 48 годин) (30-та доба спостереження, $n = 6$)
 Histological analysis of ovarian tissue grafts incubated at 37°C (for 2 and 4 hrs) and 4°C (for 24 and 48 hrs) (day 30 of observation, $n = 6$)

Морфометричні показники Morphometric indices	Групи Groups								
	3	4a(I)	4a(II)	4b(I)	4b(II)	5a(I)	5a(II)	5b(I)	5b(II)
Кількість антральних фолікулів на гістологічний зріз Number of antral follicles per histological section	3,1 ± 0,3	2,6 ± 0,2	3,4 ± 0,3	1,2 ± 0,1*	3,5 ± 0,3	0*	0*	0*	1,4 ± 0,1*
Кількість преантральних фолікулів на гістологічний зріз Number of preantral follicles per histological section	2,3 ± 0,3	1,8 ± 0,2	2,2 ± 0,2	1,6 ± 0,1*	2,3 ± 0,2	0*	0*	0*	0*
Кількість жовтих тіл на гістологічний зріз Number of corpora lutea per histological section	3,1 ± 0,3	2,6 ± 0,2	3,7 ± 0,4	2,5 ± 0,3	3,4 ± 0,2	0*	0*	0*	1,2 ± 0,1*
Площа фіброзу тканини від загальної площі трансплантату, % Area of tissue fibrosis of total graft area, %	0*	10,2 ± 1,9*	0	20,1 ± 2,4*	10,7 ± 1,1*	100*	80,2 ± 7,7*	100*	30,6 ± 3,3*

Примітка: * – відмінності значущі порівняно з контролем, $p < 0,05$.

Note: * – differences are significant if compared with the control, $p < 0,05$.

функцію її трансплантатів порівняно зі свіжовиділеними фрагментами і фізіологічною нормою. Так, рівень статевих гормонів відповідав наступним значенням: естрадіол ($18,2 \pm 2,1$) пг/мл у тварин групи 4в(I) ($28,1 \pm 3,6$) пг/мл у щурів

The relationship between the degree of the above studied ischemic injuries and the restoration of ovarian tissue endocrine function was investigated using heterotopic transplantation, implemented after 2- and 4-hour incubation at 37°C and after the ones

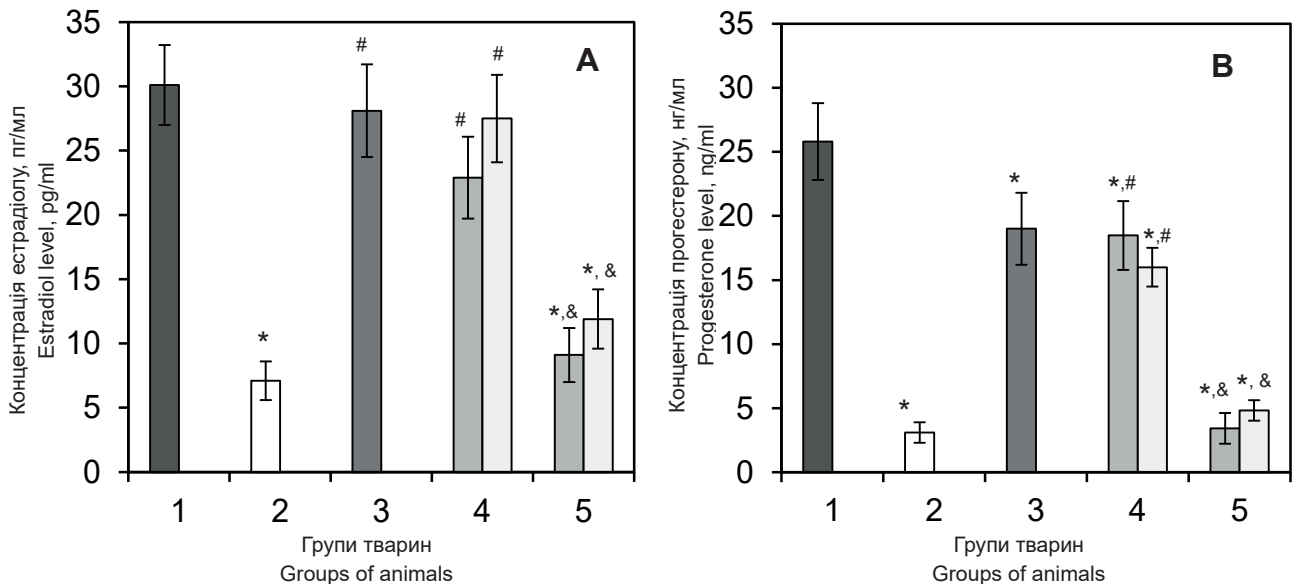


Рис. 7. Концентрація естрадіолу (А) та прогестерону (В) в плазмі тварин: інтактних (1); з оваріоектомією (2); з трансплантацією свіжовиділеної тканини (3) та трансплантацією оваріальної тканини після інкубації при 37°C упродовж 2-х годин (4) і 4-х годин (5) у розчинах I (■), II (▒), різниця значуща відносно інтактних тварин (*), тварин після оваріоектомії (#) та після трансплантації свіжовиділеної тканини (&), $p < 0,05$, $n = 7$.

Fig. 7. Estradiol (A) and progesterone (B) levels in plasma of animals: intact (1); ovariectomized (2); with transplanted fresh tissue (3) and ovarian tissue after incubation at 4°C for 24 (4) and 48 hrs (5) in the solutions I (■), II (▒), the difference is significant relative to the intact animals (*), ovariectomized ones (#) and those transplanted with fresh tissue (&), $p < 0,05$, $n = 7$.



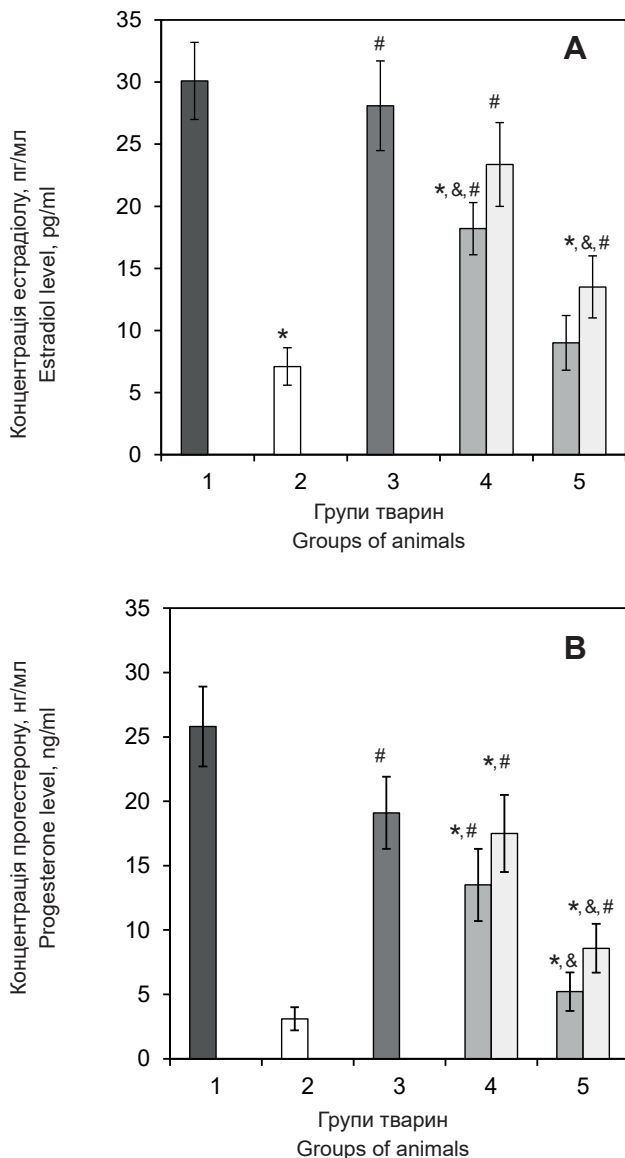


Рис. 8. Концентрація естрадіолу (А) та прогестерону (В) в плазмі тварин: інтактних (1); з оваріоектомією (2); з трансплантацією свіжовиділеної тканини (3) та трансплантацією оваріальної тканини після інкубації при 37°C упродовж 2-х годин (4) і 4-х годин (5) у розчинах I (■), II (■), різниця значуща відносно інтактних тварин (*), тварин після оваріоектомії (#) та після трансплантації свіжовиділеної тканини (&), $p < 0,05$, $n = 7$.

Fig. 8. Estradiol (A) and progesterone (B) levels in plasma of animals: intact (1); ovariectomized (2); with transplanted fresh tissue (3) and ovarian tissue after incubation at 4°C for 24 (4) and 48 hrs (5) in the solutions I (■), II (■), the difference is significant relative to the intact animals (*), ovariectomized ones (#) and those transplanted with fresh tissue (&), $p < 0.05$, $n = 7$.

групи 3); прогестерон ($13,5 \pm 2,8$) нг/мл у тварин групи 4в (I) ($19,1 \pm 2,8$) нг/мл у щурів групи 3).

Збільшення часу інкубації до 48 годин при 4°C сприяло частковому збереженню функції оваріальної тканини після трансплантації тільки у випадку використання розчину II (група 5в (II)).

of 24 and 48 hours at 4°C. Above 50% of follicles with normal morphology were preserved in this cases, despite an increased TBARS concentration.

A follicular profile of ovarian tissue grafts to day 30 of observation of all the studied groups is shown in the Table. After normothermia (37°C) for 2 and 4 hrs, the number of follicles in graft was determined by the storage time and did not depend on the incubation medium composition. The grafts of fresh ovarian tissue (group 3) and after 2-hour ischemia in the solutions I (group 4a (I)) and II (group 4a (II)) were represented by follicles of different maturity rate, as well as the *corpora lutea* (Table). Notably, that the fibrosis area of tissue grafts subjected to ischemia was about (10.2 ± 1.9)% in group 4a (I) only. In all the experimental groups, the ovarian tissue transplantation after 4-hour ischemia resulted in its complete sclerosis to day 30 of observation.

After incubation of ovarian tissue fragments under hypothermia (4°C), a follicular profile of grafts (day 30 of observation) was determined by hypothermia time and incubation medium composition (Table). The number of follicles with different maturity rate and *corpora lutea* in fresh ovarian tissue grafts (group 3) and after 24-hour incubation in all the studied solutions were compared with each other. Ovarian tissue transplantation after 48-hour incubation resulted in its complete sclerosis to day 30 of observation in groups 5a (I) and 5b (I). Follicles and *corpora lutea* were found in group 5b (II) grafts. Of note that the fibrosis area of grafts in this group was about (30.6 ± 3.3)%.

After transplanting the tissue, subjected to ischemia for 2 hrs at 37°C, the recipient animals demonstrated the estradiol and progesterone levels to coincide with those after fresh tissue transplantation (Fig. 7). For example, the estradiol level in blood plasma in rats of group 4a (I) and 4a (II) was (22.9 ± 3.2) and (27.5 ± 3.3) pg/ml, respectively, that did not significantly differ from the level of these hormones after fresh ovarian tissue transplantation (28.1 ± 3.6) pg/ml (group 3)(Fig. 7A). Prolongation of tissue ischemia time up to 4 hrs at 37°C (groups 5a (I) and 5a (II)) entailed a decrease in endocrine function of ischemia-affected ovarian tissue after its transplantation. For example, the estradiol level in blood plasma in recipient rats was (9.1 ± 2.1) and (11.9 ± 2.31) pg/ml (groups 5a (I) and 5a (II), respectively) vs. (7.1 ± 1.5) pg/ml in ovariectomized animals; the progesterone one made (3.4 ± 1.2) and (4.8 ± 0.8) ng/ml (groups 5a (I) and 5a (II), correspondingly) as compared with (3.1 ± 0.9) ng/ml in ovariectomized animals (Fig. 7B).

Differences in steroidogenic function of grafts in the incubation media with different composition

Концентрація статевих гормонів у тварин-реципієнтів цієї групи була значуще нижче, ніж у тварин груп 1 та 3, але значуще вище відносно групи 2 (оваріоектомовані тварини). Так, у тварин-реципієнтів після трансплантації тканини, інкубованої у розчині II при 4°C протягом 48 годин, концентрація естрадіолу становила (13,5 ± 2,5) пг/мл ((7,1 ± 1,5) пг/мл у оваріоектомованих щурів), прогестерону – (8,6 ± 1,9) нг/мл ((3,1 ± 0,9) нг/мл у оваріоектомованих щурів). Після трансплантації фрагментів тканини, інкубованої у розчині I при 4°C протягом 48 годин, ендокринна функція не відновлювалася. Концентрація статевих гормонів у тварин-реципієнтів відповідала такій у оваріоектомованих (рис. 8).

Таким чином, основною причиною незворотного ішемічного пошкодження оваріальної тканини є накопичення ТБК-активних продуктів, яке призводить до повного пригнічення ендокринної функції за умов її реваскуляризації. Так, повне відновлення гормональної функції у оваріоектомованих тварин-реципієнтів відзначено за умов трансплантації фрагментів яєчника після 2-годинної ішемії при 37°C і 24-годинної при 4°C (див. рис. 7, 8). Рівень збереження морфологічної цілісності фолікулів і концентрація ТБК-активних продуктів залишалися у межах контрольних значень.

Подовження часу інкубації до 4 годин при 37°C збільшувало кількість пошкоджених фолікулів (див. рис. 5), а також підвищувало концентрацію ТБК-активних продуктів у 3–4 рази (див. рис. 6). Можна припустити, що у даному випадку діє мітохондріальний механізм апоптозу, який викликає морфологічні і біохімічні зміни у тканині, внаслідок чого знижується пул нормально функціонуючих фолікулів після відновлення кровопостачання.

Зниження температури до 4°C і збільшення часу інкубації до 48 годин призводили до пошкодження структури у 50% фолікулів (див. рис. 5). Слід зазначити, що під час інкубації тканини у розчині II концентрація ТБК-активних продуктів була в 2,5–3 рази нижче, ніж за умов використання розчину I (див. рис. 6). Зниження концентрації ТБК-активних продуктів під час 48-годинної інкубації тканини у розчині II при 4°C співпадало зі значущим підвищенням концентрації естрадіолу і прогестерону у тварин-реципієнтів.

Отже, використання розчину II знижує ішемічні ушкодження оваріальної тканини. Це можна пояснити як осмотичними властивостями манітолу, так і його антиоксидантною дією. В деяких дослідженнях доведено протективну дію манітолу [22, 24, 29]. Зокрема, R.P. Paszynski

were found after transplanting the tissue exposed to ischemia at 4°C for 24 hrs in groups 4b (I) and 4b (II) (Fig. 8). Using the solution II for mature ovarian tissue hypothermic storage within 24 hrs promoted to restore its steroidogenic function within the physiological norm ((23.4 ± 3.4) pg/ml of estradiol vs. (30.1 ± 3.1) pg/ml and (17.5 ± 3.0) ng/ml of progesterone vs. (25.8 ± 3.1) ng/ml in groups 4b (II) and 1, respectively) (Fig. 8). Incubation of ovarian tissue fragments at 4°C for 24 hrs in the solution I significantly reduced the endocrine function of its grafts if compared with fresh fragments and physiological norm. For example, the level of sex hormones corresponded to the following values: (18.2 ± 2.1) and (28.1 ± 3.6) pg/ml of estradiol in animals of group 4b (I) and group 3, respectively; (13.5 ± 2.8) and (19.1 ± 2.8) ng/ml of progesterone in animals of group 4b (I) and group 3, correspondingly

Prolonging the incubation time up to 48 hrs at 4°C promoted a partial preservation of ovarian tissue function after transplantation only in case of using the solution II (group 5b (II)). The concentration of sex hormones in recipient animals from this group was significantly lower than in animals of groups 1 and 3, but significantly higher relative to the group 2 (ovariectomized animals). For example, in recipient animals after transplanting the tissue incubated in the solution II at 4°C for 48 hrs, the estradiol level was (13.5 ± 2.5) pg/ml ((7.1 ± 1.5) pg/ml in ovariectomized rats), the progesterone one made (8.6 ± 1.9) ng/ml ((3.1 ± 0.9) ng/ml in ovariectomized rats). After transplantation of tissue fragments incubated in the solution I at 4°C for 48 hrs, an endocrine function was not restored. The concentration of sex hormones in recipient animals corresponded to that in ovariectomized ones (Fig. 8).

Thus, the accumulation of TBARS, resulting in a complete suppression of endocrine function under its revascularization, is the main cause of irreversible ischemic injury of ovarian tissue. So, a complete restoration of hormonal function in ovariectomized recipient animals was observed during ovarian fragment transplantation after 2-hour ischemia at 37°C and 24-hour at 4°C (see Figs. 7, 8). The level of preservation of follicular morphological integrity and TBARS concentration remained within the control values.

Prolonging the incubation time up to 4 hrs at 37°C augmented the number of injured follicles (see Fig. 5), and increased the TBARS concentration by 3–4 times as well (see Fig. 6). It may be assumed here the action of mitochondrial pathway of apoptosis, which induces morphological and biochemical changes in tissue, resulting in a decreased



та співавт. [31] експериментально продемонстрували, що введення манітолу посилює мозковий кровообіг і знижує артеріальний тиск у тканині після ішемічного впливу. J. Suzuki та співавт. [35] за допомогою хемілюмінесцентного спектроаналізу довели, що манітол зв'язується з гідроксил-радикалом і знижує концентрацію ТБК-активних продуктів в умовах експериментальної ішемії мозку.

Згідно з нашими експериментальними результатами антиоксидантна дія манітолу відзначається тільки при гіпотермічному зберіганні (4°C) (див. рис. 6, В), а нормотермічне зберігання (37°C) нівелює цей ефект (див. рис. 6, А), що, ймовірно, можна пояснити дефіцитом кисню. За цієї температури кінетика реакцій, яка пов'язана з порушенням клітинного метаболізму, набагато вища, ніж при 4°C. Робота активних транспортних систем при 37°C і зміна іонної проникності мембрани (з одного боку, посилення процесів розпаду макроергічних сполук, з іншого – накопичення продуктів деградації) посилюють реакцію вільнорадикального окиснення і порушують про- і антиоксидантний баланс. Внаслідок описаних процесів утворення активних форм кисню наскільки інтенсивне, що антиоксидантної дії манітолу недостатньо. Вірогідно, що зниження температури до 4°C уповільнює ці процеси, тому манітол як основний компонент середовища інкубації пригнічує накопичення ТБК-активних продуктів.

Отже, в описаних умовах поєднується протективна дія гіпотермії й манітолу, що співпадає з результатами Н. Karibe та співавт. [18].

Для експериментального використання МВР у клінічній практиці необхідне подальше вивчення ендокринної функції оваріальної тканини, яка зберігалась у гіпотермічних умовах більш тривалий час (60, 90 діб) після трансплантації.

Висновки

1. Критичне зниження до 30–35% нормальних фолікулів у структурі оваріальної тканини встановлено після 6 годин нормотермії та 72 годин гіпотермії. Морфологічна структура фолікулів у межах контрольних значень зберігалась після 2-годинної інкубації (37°C) і 2–24-годинної інкубації (4°C) в усіх досліджуваних середовищах

2. Антиоксидантні властивості манітолу посилювали протективну дію гіпотермії (48 годин, 4°C), яка проявлялася низькою концентрацією ТБК-активних продуктів. При цьому відзначалося значуще підвищення концентрації статевих гормонів у тварин-реципієнтів відносно оваріо-ектомованих.

pool of normally functioning follicles after blood supply restoration.

Temperature decrease down to 4°C and extending the incubation time up to 48 hrs entailed the structure injury in 50% of follicles (see Fig. 5). Notably, that during tissue incubation in the solution II, the TBARS concentration was 2.5–3 times lower than using the solution I (see Fig. 6). A decreased TBARS concentration during tissue incubation within 48 hrs in the solution II at 4°C coincided with a significant increase in estradiol and progesterone levels in recipient animals.

Thus, the application of solution II reduced ischemic injuries of ovarian tissue. This can be explained by both osmotic properties of mannitol and its antioxidant action. Some studies have proven a protective effect of mannitol [19, 21, 26]. In particular, R.P. Paczynski *et al.* [28] experimentally demonstrated the mannitol introduction to enhance cerebral blood flow and reduce blood pressure in tissue after ischemic exposure. J. Suzuki *et al.* [32] using chemiluminescence spectral analysis proved the mannitol binding to hydroxyl radical and reduction of TBARS concentration under experimental cerebral ischemia.

According to our findings, an antioxidant effect of mannitol was observed under hypothermic storage (4°C) only (see Fig. 6B), whereas a normothermic storage (37°C) levelled this effect (see Fig. 6A), that could be probably explained by oxygen deficient. At this temperature, the kinetics of responses associated with impaired cell metabolism was much higher than at 4°C. The function of active transport systems at 37°C and changes in membrane ion permeability (enhancement of macroergic compound decay on the one hand, and accumulation of degradation products on the other hand) strengthened the free radical oxidation and disrupted the pro- and antioxidant balance. As a result of the described processes, the formation of reactive oxygen species was so intense, that the antioxidant action of mannitol occurred to be insufficient. Temperature decrease down to 4°C was likely to slow down these processes, and so the mannitol as the main component of the incubation medium inhibited the accumulation of TBARS.

Thus, under the described conditions, a protective effect of hypothermia and mannitol was combined, that coincided with the results reported by H. Karibe *et al.* [12].

For experimental implementation of MCS into clinical practice, the study of endocrine function of ovarian tissue, stored under hypothermic conditions for a longer time (60, 90 days) after transplantation should be continued.



3. Концентрація ТБК-активних продуктів у трансплантатах оваріальної тканини при нормо- та гіпотермічному зберіганні є основним показником незворотних ушкоджень. У тварин усіх експериментальних груп встановлено взаємозв'язок між концентрацією ТБК-активних продуктів і ендокринною функцією ішемізованих трансплантатів оваріальної тканини.

Література

1. Биленко МВ. Ишемические и реперфузионные повреждения органов. Москва: Медицина; 1989. 368 с.
2. Владимиров ЮА. Свободные радикалы в биологических системах. Соросовский образовательный журнал. 2000; 6 (12): 13–19.
3. Владимиров ЮА, Оленев ИИ, Сулова ТБ, Потапенко АЯ. Механизмы перекисного окисления липидов и его действие на биологические мембраны. В: Итоги науки и техники (ВИНИТИ) АН СССР. Сер. Биофизика. Москва: Медицина, 1975. Т. 5. с. 56–117.
4. Киروشка ВВ, Бородай ЕА, Трутаева ИА, и др. Функция трансплантатов оваріальной ткани после гипотермического хранения: значение состава среды инкубации. Проблемы кріобіології і кріомедицини. 2019; 29(1):19–27.
5. Коржевский ДЭ, Гиляров АВ. Основы гистологической техники. СанктПетербург: СпецЛит, 2010. 95 с.
6. Улумбеков ЭГ, Челышев ЮА. Гистология, эмбриология, цитология: 3-е изд. Москва: ГЭОТАР-Медиа; 2012. 480 с.
7. 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.
8. Alvarez P, Tapia L, Mardones LA, et al. Cellular mechanisms against ischemia reperfusion injury induced by the use of anesthetic pharmacological agents. Chem Biol Interact. 2014; 218: 89–98.
9. Bégin AM, Monfette ML, Boudrias-Dalle É, et al. Effect of mannitol on acute kidney injury induced by cisplatin. Support Care Cancer. 2021; 29(4): 2083–91.
10. Boengler K, Hilfiker-Kleiner D, Heusch G, Schulz R: Inhibition of permeability transition pore opening by mitochondrial STAT3 and its role in myocardial ischemia/reperfusion. Basic Res Cardiol. 2010; 105: 771–785.
11. Cai LL, Xu HT, Wang QL, et al. EP4 activation ameliorates liver ischemia/reperfusion injury via ERK1/2 GSK3β dependent MPTP inhibition. Int J Mol Med. 2020; 45(6): 1825–37.
12. Das DK, Maulik N. Antioxidant effectiveness in ischemia reperfusion tissue injury. Methods Enzymol. 1994; 233: 601–10.
13. Dorweiler B, Pruefer D, Andradi TB, et al. Ischemia-reperfusion injury. Eur J Trauma Emerg Surg. 2007; 33(6): 600–12.
14. Eyden B, Radford J, Shalet SM, et al. Ultrastructural preservation of ovarian cortical tissue cryopreserved in dimethylsulfoxide for subsequent transplantation into young female cancer patients. Ultrastructural Pathology. 2004; 28: 239–45.

Conclusions

1. A critical decrease of normal follicles within the ovarian tissue structure down to 30–35% was found after 6-hour normothermia and 72-hour hypothermia. Follicle morphology was preserved within the control values after 2-hour incubation (37°C) and 2–24-hour incubation (4°C) in all the studied media.

2. Antioxidant properties of mannitol enhanced a protective effect of hypothermia (48 hrs, 4°C), manifested by low concentrations of TBARS. Herewith, a significant increase in sex hormone concentration in recipient animals relative to the ovariectomized ones was observed.

3. TBARS concentration in ovarian tissue grafts under normo- and hypothermic storage is the main index of irreversible damage. The relationship between TBARS concentration and endocrine function of ischemia-affected ovarian tissue grafts was found in animals from all experimental groups.

References

1. 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.
2. Alvarez P, Tapia L, Mardones LA, et al. Cellular mechanisms against ischemia reperfusion injury induced by the use of anesthetic pharmacological agents. Chem Biol Interact. 2014; 218 :89–98.
3. Bégin AM, Monfette ML, Boudrias-Dalle É, et al. Effect of mannitol on acute kidney injury induced by cisplatin. Support Care Cancer. 2021; 29(4): 2083–91.
4. Bilenko MV. [Ischemic and reperfused injury of organs]. Moscow: Medicine; 1989. 368 p. Russian
5. Boengler K, Hilfiker-Kleiner D, Heusch G and Schulz R: Inhibition of permeability transition pore opening by mitochondrial STAT3 and its role in myocardial ischemia/reperfusion. Basic Res Cardiol. 2010; 105: 771–85.
6. Cai LL, Xu HT, Wang QL, et al. EP4 activation ameliorates liver ischemia/reperfusion injury via ERK1/2 GSK3β dependent MPTP inhibition. Int J Mol Med. 2020; 45(6): 1825–37.
7. Das DK, Maulik N. Antioxidant effectiveness in ischemia reperfusion tissue injury. Methods Enzymol. 1994; 233: 601–10.
8. Dorweiler B, Pruefer D, Andradi TB, et al. Ischemia-reperfusion injury. Eur J Trauma Emerg Surg. 2007; 33(6): 600–12.
9. Eyden B, Radford J, Shalet SM, et al. Ultrastructural preservation of ovarian cortical tissue cryopreserved in dimethylsulfoxide for subsequent transplantation into young female cancer patients. Ultrastructural Pathology. 2004; 28: 239–45.
10. Fu H, Xu H, Chen H, et al. Inhibition of glycogen synthase kinase 3 ameliorates liver ischemia. Reperfusion Injury via an Energy-dependent Mitochondrial Mechanism. J Hepatol. 2014; 61(4):816–24.
11. Halestrap AP: What is the mitochondrial permeability transition pore? J Mol Cell Cardiol. 2009; 46: 821–31.



15. Fu H, Xu H, Chen H, et al. Inhibition of glycogen synthase kinase 3 ameliorates liver ischemia. Reperfusion injury via an energy-dependent mitochondrial mechanism. *J Hepatol*. 2014; 61(4): 816–24.
16. Halestrap AP: What is the mitochondrial permeability transition pore? *J Mol Cell Cardiol*. 2009; 46: 821–31.
17. Huang X, Yang L, Ye J, He S, Wang B. Equipolar doses of hypertonic agents (saline or mannitol) in the treatment of intracranial hypertension after severe traumatic brain injury. *Medicine (Baltimore)* [Internet]. 2020 Sep 18 [cited March 02 2021]; 99(38): e22004. Available from: https://journals.lww.com/md-journal/Fulltext/2020/09180/Equipolar_doses_of_hypertonic_agents_saline_or.15.aspx
18. 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.
19. Kiroshka V, Trutaieva I, Bondarenko T. Efficiency of mannitol-supplemented medium during adding / removing ovarian tissue with penetrating cryoprotective agents. *Cell Tissue Bank*. 2018; 19(1):123–32.
20. Kurt O, Yazici CM, Erboga M, et al. Mannitol has a protective effect on testicular torsion: An experimental rat model. *J Pediatr Urol*. 2016; 12(3): 167.e1–8.
21. Lee SH, Kang HY, Kim JH, Park DH. Mannitol augments the effects of systemical stem cell transplantation without increasing cell migration in a stroke animal model. *Tissue Eng Regen Med*. 2020; 17(5): 695–704.
22. Luvisotto TL, Auer RN, Sutherland GR. The effect of mannitol on experimental cerebral ischemia, revisited. *Neurosurgery*. 1996; 38(1): 131–8.
23. Maeno E, Ishizaki Y, Kanaseki T, et al. Normotonic cell shrinkage because of disordered volume regulation is an early prerequisite to apoptosis. *Proc Natl Acad Sci*. 2000; 97(17): 9487–92.
24. 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.
25. Mallick IH, Yang W, Winslet MC, Seifalian AM. Ischemia-reperfusion injury of the intestine and protective strategies against injury. *Dig Dis Sci*. 2004; 49(9): 1359–77.
26. McCarthy JV, Cotter TG. Cell shrinkage and apoptosis: a role for potassium and sodium ion efflux. *Cell Death Differ*. 1997; 4(8): 756–70.
27. Nakajima R, Nakamura T, Miyakawa H, Kudo Y. Effects of mannitol on ischemia-induced degeneration in rat hippocampus. *J Pharmacol Sci*. 2004; 95(3): 341–8.
28. Nugent D, Newton H, Gallivan L, Gosden RG. Protective effect of vitamin E on ischemia-reperfusion injury in ovarian grafts. *J Reprod Fertil*. 1998; 114: 341–6.
29. Oredsson S, Plate G, Qvarfordt P. The effect of mannitol on reperfusion injury and postischemic compartment pressure in skeletal muscle. *Eur J Vasc Surg*. 1994; 8: 326–31.
30. Ozturk H, Ozturk H, Terzi EH, et al. Protective effects of rosmarinic acid against renal ischaemia/reperfusion injury in rats. *J Pak Med Assoc*. 2014; 64(3): 260–5.
31. 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.
32. Rodrigues APR, Amorim CA, Costa SH, et al. Cryopreservation of caprine ovarian tissue using dimethylsulphoxide and propanediol. *Anim Reprod Sci*. 2004; 84(1-2): 211–27.
33. Sagsoz N, Kisa U, Apan A. Ischaemia-reperfusion injury of rat ovary and the effect of vitamin C, mannitol and verapamil. *J Investig Med*. 2004; 52(5): 299–309.
34. Songsasen N, Fickes A, Pukazhenthil BS, Wildt DE. Follicular morphology, oocyte diameter and localisation of fibroblast growth factors in the domestic dog ovary. *Reprod Domest Anim*. 2009; 44 (2): 65–70.
12. Huang X, Yang L, Ye J, He S, Wang B. Equipolar doses of hypertonic agents (saline or mannitol) in the treatment of intracranial hypertension after severe traumatic brain injury. *Medicine (Baltimore)* [Internet]. 2020 Sep 18 [cited March 02 2021]; 99(38): e22004. Available from: https://journals.lww.com/md-journal/Fulltext/2020/09180/Equipolar_doses_of_hypertonic_agents_saline_or.15.aspx
13. 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.
14. Kiroshka VV, Borodai KO, Trutaieva IA, et al. Function of ovarian tissue grafts after hypothermic storage: importance of incubation medium composition. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2019; 29(1):19–27.
15. Kiroshka V, Trutaieva I, Bondarenko T. Efficiency of mannitol-supplemented medium during adding / removing ovarian tissue with penetrating cryoprotective agents. *Cell Tissue Bank*. 2018; 19(1):123–32.
16. Korzhhevskiy DE, Gilyarov AV. [Basics of histological technique]. St.Petersburg: SpetsLit, 2010. 95 p. Russian
17. Kurt O, Yazici CM, Erboga M, et al. Mannitol has a protective effect on testicular torsion: An experimental rat model. *J Pediatr Urol*. 2016; 12(3):167.e1–8.
18. Lee SH, Kang HY, Kim JH, Park DH. Mannitol augments the effects of systemical stem cell transplantation without increasing cell migration in a stroke animal model. *Tissue Eng Regen Med*. 2020; 17(5): 695–704.
19. Luvisotto TL, Auer RN, Sutherland GR. The effect of mannitol on experimental cerebral ischemia, revisited. *Neurosurgery*. 1996; 38(1): 131–8.
20. Maeno E, Ishizaki Y, Kanaseki T, et al. Normotonic cell shrinkage because of disordered volume regulation is an early prerequisite to apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; 97(17): 9487–92.
21. 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.
22. Mallick IH, Yang W, Winslet MC, Seifalian AM. Ischemia-reperfusion injury of the intestine and protective strategies against injury. *Dig Dis Sci*. 2004; 49(9): 1359–77.
23. McCarthy JV, Cotter TG. Cell shrinkage and apoptosis: a role for potassium and sodium ion efflux. *Cell Death Differ*. 1997; 4(8): 756–70.
24. Nakajima R, Nakamura T, Miyakawa H, Kudo Y. Effects of mannitol on ischemia-induced degeneration in rat hippocampus. *J Pharmacol Sci*. 2004; 95(3): 341–8.
25. Nugent D, Newton H, Gallivan L, Gosden RG. Protective effect of vitamin E on ischemia-reperfusion injury in ovarian grafts. *J Reprod Fertil*. 1998; 114: 341–46.
26. Oredsson S, Plate G, Qvarfordt P. The effect of mannitol on reperfusion injury and postischemic compartment pressure in skeletal muscle. *Eur J Vasc Surg*. 1994; 8: 326–31.
27. Ozturk H, Ozturk H, Terzi EH, et al. Protective effects of rosmarinic acid against renal ischaemia/reperfusion injury in rats. *J Pak Med Assoc*. 2014; 64(3):260–5.
28. 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.
29. Rodrigues APR, Amorim CA, Costa SH, et al. Cryopreservation of caprine ovarian tissue using dimethylsulphoxide and propanediol. *Anim Reprod Sci*. 2004; 84(1-2): 211–27.
30. Sagsoz N, Kisa U, Apan A. Ischaemia-reperfusion injury of rat ovary and the effect of vitamin C, mannitol and verapamil. *J Investig Med*. 2004; 52(5):299–309.
31. Songsasen N, Fickes A, Pukazhenthil BS, Wildt DE. Follicular morphology, oocyte diameter and localisation of fibroblast growth factors in the domestic dog ovary. *Reprod Domest Anim*. 2009; 44 (2):65–70.



35. Suzuki J, Imaizumi S, Kayama T, Yoshimoto T. Chemiluminescence in hypoxic brain the second report: cerebral protective effect of mannitol, vitamin E and glucocorticoid. *Stroke*. 1985; 16(4): 695–700.
36. Zhu J, Rebecchi MJ, Glass PS, et al. Cardioprotection of the aged rat heart by GSK-3beta inhibitor is attenuated: Age-related changes in mitochondrial permeability transition pore modulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011; 300: H922–H930.
32. Suzuki J, Imaizumi S, Kayama T, Yoshimoto T. Chemiluminescence in hypoxic brain the second report: cerebral protective effect of mannitol, vitamin E and glucocorticoid. *Stroke*. 1985; 16(4): 695–700.
33. Ulumbekov EG, Chelyshev YuA. [Histology, embryology, cytology]: 3rd ed. Moscow: GEOTAR-Media; 2012. 480 p. Russian.
34. Vladimirov YA. [Free radicals in biological systems]. *Soros Ed J*. 2000; 6(12): 13–9. Russian
35. Vladimirov YA, Olenev II, Suslov TB, Potapenko Ya. [The mechanisms of lipid peroxidation and its effect on biological membranes]. In: [Biophysics. Results of science and technology (VINITI) of the USSR.] Moscow: Meditsina 1975; Vol. 5, p. 56–117. Russian.
36. Zhu J, Rebecchi MJ, Glass PS, et al. Cardioprotection of the aged rat heart by GSK-3beta inhibitor is attenuated: Age-related changes in mitochondrial permeability transition pore modulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011; 300: H922–H930.

