

Залежність ендокринної функції ішемізованих трансплантатів оваріальної тканини від інтенсивності процесів перекисного окиснення ліпідів

В.В. Кірошка, Ю.О. Божкова, І.А. Трутаєва, А.А. Гавас¹

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

¹Харківський національний університет ім. В.Н.Каразіна, м. Харків; e-mail: vkiroshka@gmail.com

Досліджували кореляційну залежність між ендокринною функцією, морфологією та об'ємними змінами в структурі оваріальної тканини, а також інтенсивністю процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) при різних температурних і часових показниках моделювання ішемії. Показано, що морфологічні трансформації є зворотними після 2-годинної ішемії при 37°C і 24-годинної при 4°C. У цьому разі при відновленні кровотоку в умовах гетеротопічної трансплантації достовірно підвищувалася концентрація статевих гормонів у тварин-реципієнтів щодо кастрованих. Збільшення часу ішемії до 4 год при 37°C та до 48 год при 4°C призводило до незворотних морфологічних трансформацій та недостатності стероїдогенної функції, окрім інкубації тканини (4°C, 48 год) у манітольмістному розчині (МВР), де рівень накопичення продуктів тіобарбітурової кислоти (ТБК) був в 2,5-3 рази нижче, що корелювало з вірогідним підвищенням концентрації естрадіолу і прогестерону у тварин-реципієнтів. Таким чином, було продемонстровано поєднаний ефект протективної дії гіпотермії і манітолу в умовах ішемії.

Ключові слова: оваріальна тканина; ішемічні пошкодження; ендокринна функція; об'єм ооцитів.

ВСТУП

Пошкодження органів і тканин при ішемії-реперфузії залишається однією з основних проблем сучасної медицини. Це зумовлено розширенням оперативних втручань, які вимагають тимчасового припинення кровотоку, а також широким впровадженням в клінічну практику методу трансплантації для відновлення функції органів і тканин. Дослідженнями останніх років встановлено, що ступінь окисно-відновних процесів є одним із основних факторів, який визначає зворотність ішемічних ушкоджень. Відомо, що класичним прикладом цих процесів є перекисне окиснення ліпідів (ПОЛ), інтенсивність якого прямо залежить від чутливості органів (головний мозок, серце, легені, нирки, скелетні м'язи) до гіпоксії [1-3]. Для репродуктивних тканин, зокрема для оваріальної, питання толерантності до ішемії залишаються ма-

ловивченими. Нині широке впровадження методу трансплантації оваріальної тканини в клінічну практику підвищило інтерес до таких досліджень. Ефективність відновлення репродуктивної функції буде визначатися ступенем ішемічних пошкоджень у тканині, який відбувається впродовж часу забору, зберігання та трансплантації. Для їх уникнення до складу інкубаційних середовищ додатково вводять речовини з антиоксидантними властивостями (вітамін Е, аскорбінова кислота, манітол, верапоміл) [4-6]. Додавання манітолу при реперфузії таких органів як головний мозок [7], серце [8], скелетні м'язи [9] призводило до зниження інтенсивності ПОЛ і зменшення зони некрозу в ішемізованих органах. Sagsöz і співавт. [10] на моделі перекруту яєчника *in vivo* показали, що введення в нижню порожнисту вену 20%-го розчину манітолу попереджує ішемічні ураження і сприяє відновленню функції. Однак кореля-

© В.В. Кірошка, Ю.О. Божкова, І.А. Трутаєва, А.А. Гавас

ція між ендокринною функцією і інтенсивністю процесів вільнорадикального окиснення в яєчниках залежно від температурних і часових показників ішемії не встановлена.

Мета нашої роботи - дослідити взаємозв'язок стероїдогенної функції оваріальної тканини і інтенсивності процесів ПОЛ при різних умовах моделювання ішемії.

МЕТОДИКА

Експерименти проведені відповідно до «Загальних принципів експериментів на тваринах» V Національного конгресу з біоетики (Київ, 2013) і до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986). Об'єктом дослідження були фрагменти (0,5–1 мм³) оваріальної тканини 3 місячних щурів лінії Вістар, які знаходилися в стандартних умовах віварію ІПКіК НАН України.

Ішемію моделювали інкубацією фрагментів яєчників при 4 і 37°C. Час ішемічного впливу становив 2, 4, 6, 24, 48, 72 і 120 год. Інкубацію проводили у різних за складом середовищах (ммоль/л): фосфатно-сольовий буфер (ФСБ) – NaCl - 130, KCl - 20, фосфатного буфера - 20, рН 7,4; середовище Дульбекко (ДМЕМ - подвійна модифікація середови-

ща Ігла), рН 7,4; маннітоловмістний розчин (МВР) –маннітол - 250, NaCl - 10, KCl - 20, фосфатного буфера - 20, рН 7,4. Для морфологічних досліджень фіксували фрагменти оваріальної тканини в 2 %-му розчині глутарового альдегіду на 150 ммоль/л фосфатному буфері для виготовлення напівтонких зрізів за стандартною методикою [11]. Кожен третій зріз забарвлювали толуїдиновим синім. Визначали загальний об'єм фолікулів та ооцитів за допомогою комп'ютерної програми для аналізу зображення (Axio Vision 4.7, Carl Zeiss, Німеччина і Photoshop, Adobe Systems, США).

Фолікули вимірювали від зовнішнього шару теки (якщо він наявний) або від зовнішнього шару клітин гранульози (коли клітини теки відсутні). Ооцити вимірювались без зони пелюцида [12]. Співвідношення об'єму ооцита до об'єму фолікула було представлено у вигляді ступеневої залежності.

Деструктивні зміни фолікулів (рис. 1) були оцінені за класифікацією [13]: нормальні – цілісний ооцит з круглим ядром і ядерцем, оточений добре організованими гранульозними клітинами і цілісною базальною мембраною; дегенеративний тип 1 - зменшений в об'ємі ооцит з пікнотичним ядром, добре організовані клітини гранульози і дегенеративний тип 2 - ооцит стиснутий, клітини

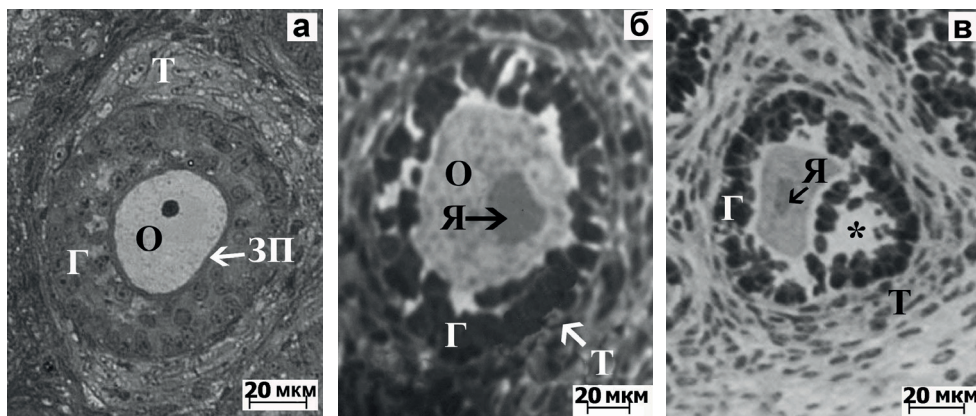


Рис. 1. Гістопрепарат оваріальної тканини після фарбування толуїдиновим синім: а – нормальний фолікул; б – дегенеративний тип 1; в – дегенеративний тип 2; О – ооцит, Г – гранульозні клітини, Я – ядро, ЗП – зона пелюцида, Т – клітини теки, * акумуляція рідини

гранулози дезорганізовані і набряклі.

Інтенсивність вільно-радикальних процесів (ПОЛ) у гомогенаті тканини визначали за реакцією між малоновим діальдегідом (похідні) і тіобарбітуровою кислотою (ТБК), яка в умовах високої температури та кислого середовища (рН 3,0) утворює триметиновий комплекс рожевого кольору. Величину поглинання забарвленого розчину вимірювали на СФ-46 при λ дорівнює 532 нм. Визначення концентрації білка проводили по методу Лоурі [14, 15].

Функцію оваріальної тканини після впливу ішемії вивчали методом трансплантації під капсулу лівої нирки щурів. Для проведення експериментальної роботи тварини були розділені на наступні групи: група К1 – контрольна (інтактні тварини), група К2 – тварини з оваріоектомією, група 1 – тварини з трансплантатами свіжовиділеної оваріальної тканини, група 2 – тварини з трансплантатами оваріальної тканини після інкубації у розчині ФСБ, група 3 – після інкубації у розчині ДМЕМ, група 4 – після інкубації у МВР. Трансплантацію оваріальної тканини в усіх групах здійснювали одночасно з двобічною овариоектомією під капсулу лівої нирки. Операції

тваринам проводили в стерильних умовах під комбінованим наркозом (0,1 мг кетаміну, 0,25 мг ксилазину на 100 г маси тварини). На 30-ту добу після трансплантації проводили евтаназію тварин ефірним наркозом.

Концентрацію естрадіолу і прогестерону в плазмі крові тварин-реципієнтів визначали набором ST AIA-PACK hsE2 и ST AIA-PACK PROG методом хемілюмінесцентного аналізу.

Використовували багатофакторний дисперсійний аналіз і критерій t-Стьюдента в пакеті програми «Excel» («Microsoft», США). Результати представлені у вигляді $M \pm m$ ($P < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Морфологічне збереження фолікулів у структурі оваріальної тканини при ішемії залежно від часу, температури і складу середовища інкубації представлено на рис.2. Видно, що кількість морфологічно нормальних фолікулів у фрагментах тканини яєчника залишалася високою (80 – 90%) у всіх досліджуваних середовищах при ішемії протягом 2 год при 37°C і 2–24 год при 4°C. Збільшення часу інкубації до 4 год при 37°C і до 48 год

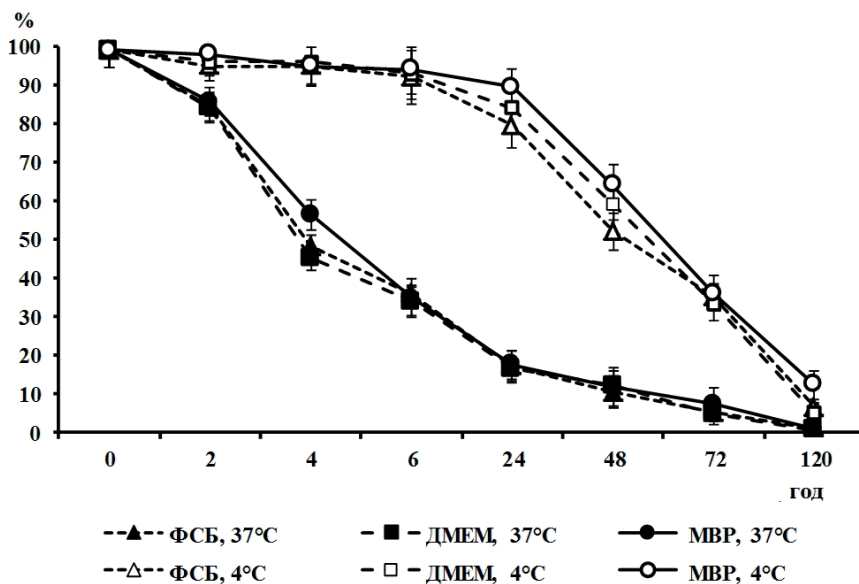


Рис. 2 Рівень збереження фолікулів у структурі оваріальної тканини протягом 2-120 год при 37°C і 4°C

при 4°C вірогідно знижувало кількість нормальних фолікулів до 45-65%. Критичним часом інкубації для фрагментів оваріальної тканини є 6 год при 37°C і 72 год при 4°C, де рівень збереження фолікулів становив 30-35%. При цьому ступінь їх пошкодження структури визначався часовими і температурними показниками моделювання ішемії і не залежав від складу середовища інкубації.

Ішемічне пошкодження клітин і тканин характеризується запуском анаеробного шляху метаболізму, зниженням вмісту макроергічних сполук, порушенням ферментативної кінетики, внаслідок чого накопичуються продукти ПОЛ. В наступній серії експериментів нами було проведено аналіз

вмісту ТБК-активних продуктів в гомогенаті оваріальної тканини після ішемічного впливу (рис.3) в тих експериментальних точках, де рівень збереження фолікулів понад 30%. Як видно, концентрація ТБК-активних продуктів зростала щодо контролю в 3-4 і 6-8 разів через 4 і 6 год інкубації при 37°C, відповідно (див. рис. 3, а). При цій температурі вміст ТБК-активних продуктів був однаковим в досліджуваних середовищах. Зниження температури інкубації до 4°C виявило залежність інтенсивності процесу утворення продуктів ПОЛ від складу середовища. В цьому випадку наразі відмінності значення були відзначені на тривалих термінах ішемічного впливу (див. рис.3, б). Так, після 48 год інкубації тка-

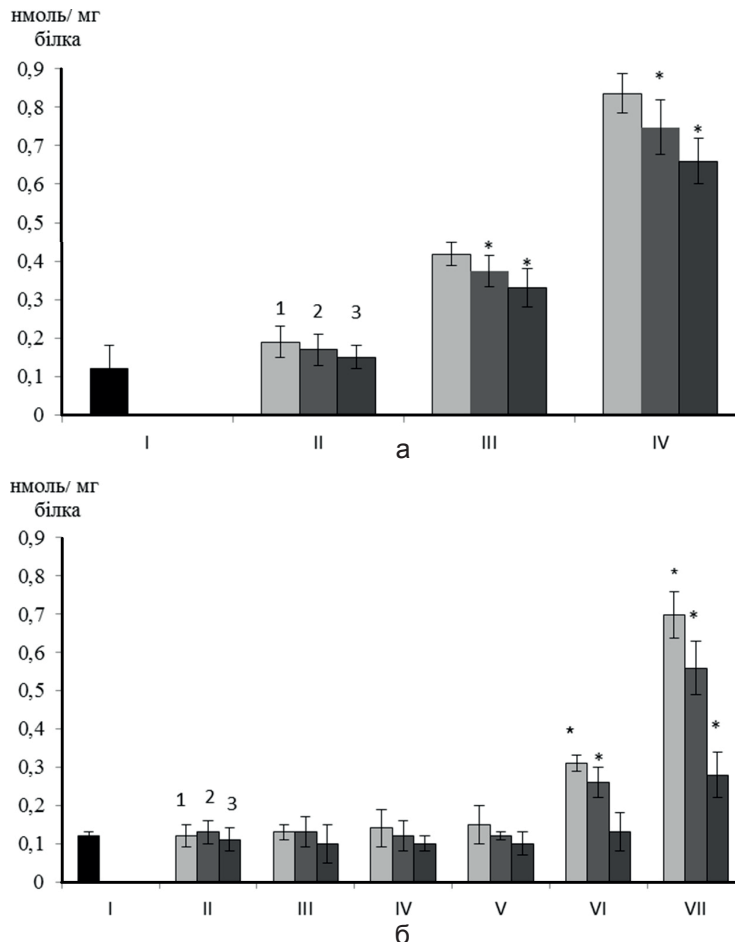


Рис. 3. Концентрація ТБК-активних продуктів у фрагментах оваріальної тканини після інкубації при 37°C (а) і при 4°C (б) у розчині ФСБ (1), ДМЕМ (2) або МВР (3) протягом 2 год (II), 4 год (III), 6 год (IV), 24 год (V), 48 год (VI), 72 год (VII), I – інтактні тварини. * P < 0,05 відносно значень інтактних тварин

нини концентрація ТБК-активних продуктів становила $0,13 \pm 0,05$ нмоль/мг у МВР, що в 2,5 рази нижче таких показників при використанні ФСБ і ДМЕМ ($0,31 \pm 0,06$ нмоль/мг і $0,26 \pm 0,04$ нмоль/мг, відповідно). Аналогічна залежність зберігалася і при збільшенні часу інкубації до 72 год.

Відомо, що в умовах гіпоксії крім енергетичного виснаження клітини та накопичення метаболітів, знижується активність роботи транспортних систем, деполаризація клітинної мембрани і перерозподіл електролітів між клітиною і позаклітинною рідиною. Порушення іонного гомеостазу клітини є одним із ранніх проявів ішемічних ушкоджень, основним показником якого є зміна об'єму клітини внаслідок виникнення дисбалан-

су осмотично активних сполук. Оскільки структурною одиницею оваріальної тканини є фолікул, що складається з декількох типів клітин (ооцита, клітин гранульози і теки), з різним розміром залежно від стадії розвитку, ми провели аналіз динаміки змін об'єму ооцитів щодо такого фолікула за ішемічним впливом (рис.4).

Зміни об'єму клітин у фрагментах тканини яєчника були проаналізовані на ранніх термінах ішемічного впливу, а саме, після інкубації при 37°C протягом 2 і 4 год і при 4°C протягом 24, 48 год. Як впливає з графіка (див. рис 4, а), протягом перших 2-х годин інкубації при 37°C об'єм ооцитів в примордіальних фолікулах залишався на початковому рівні у всіх досліджуваних середо-

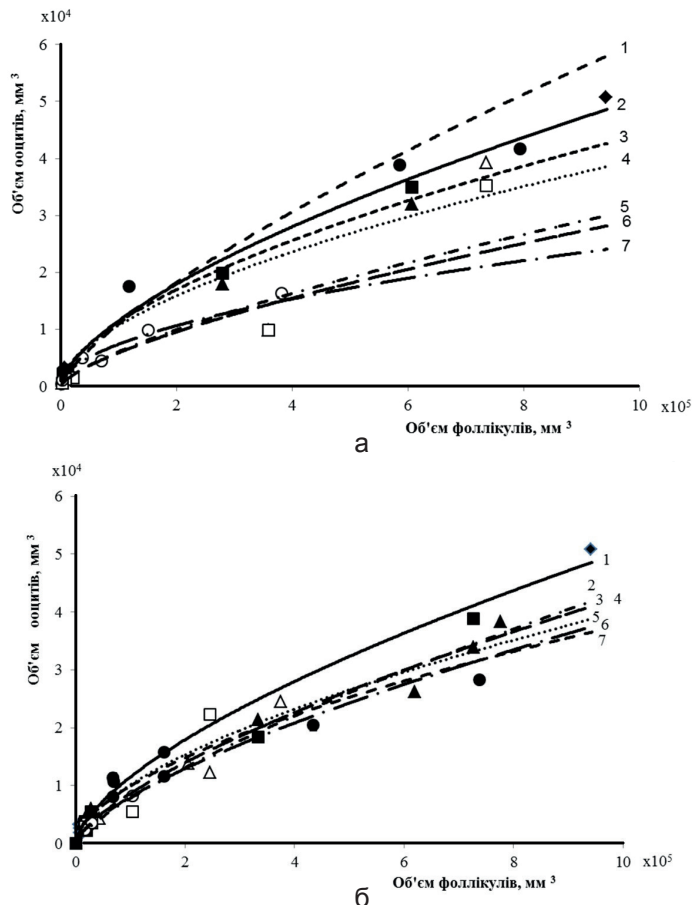


Рис. 4. Зміни об'ємів ооцитів щодо об'єму фолікулів в процесі ішемічного впливу: а – при 37°C впродовж 2 год ішемії (1, 3, 4) та 4 год (5, 6, 7), де 2 – контроль; 1,7 – МВР, 3,6 – ДМЕМ; 4,5 –ФСБ; б – при 4°C , впродовж 24 год ішемії (3, 5, 7) та 48 год (2, 4, 6), де 1 — контроль; 2,5 –ФСБ; 3,4 – ДМЕМ; 6,7 – МВР

вищах, тоді як в преантральних і антральних фолікулах визначався їх складом. Так, об'єм ооцитів зменшувався на 15-20% при використанні ФСБ і ДМЕМ, а також збільшувався на 20% при інкубації в МВР. Збільшення часу інкубації до 4 год при 37°C призводило до стиснення клітин на 40-50 % щодо контролю у всіх досліджуваних середовищах. Зниження температури інкубації до 4°C нівелювало зазначені вище відмінності залежно від часу і складу середовища експозиції. Об'єм ооцитів відносно об'єму фолікулів зменшувався в

середньому на 15-20% порівняно з контролем як після 24, так і 48 год інкубації при 4°C.

Кореляцію 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 при 4°C. У цих випадках разом з змінами об'єму і збільшенням концентрації ТБК-активних продуктів спостерігалось збереження більше ніж 50% морфологічно нормальних

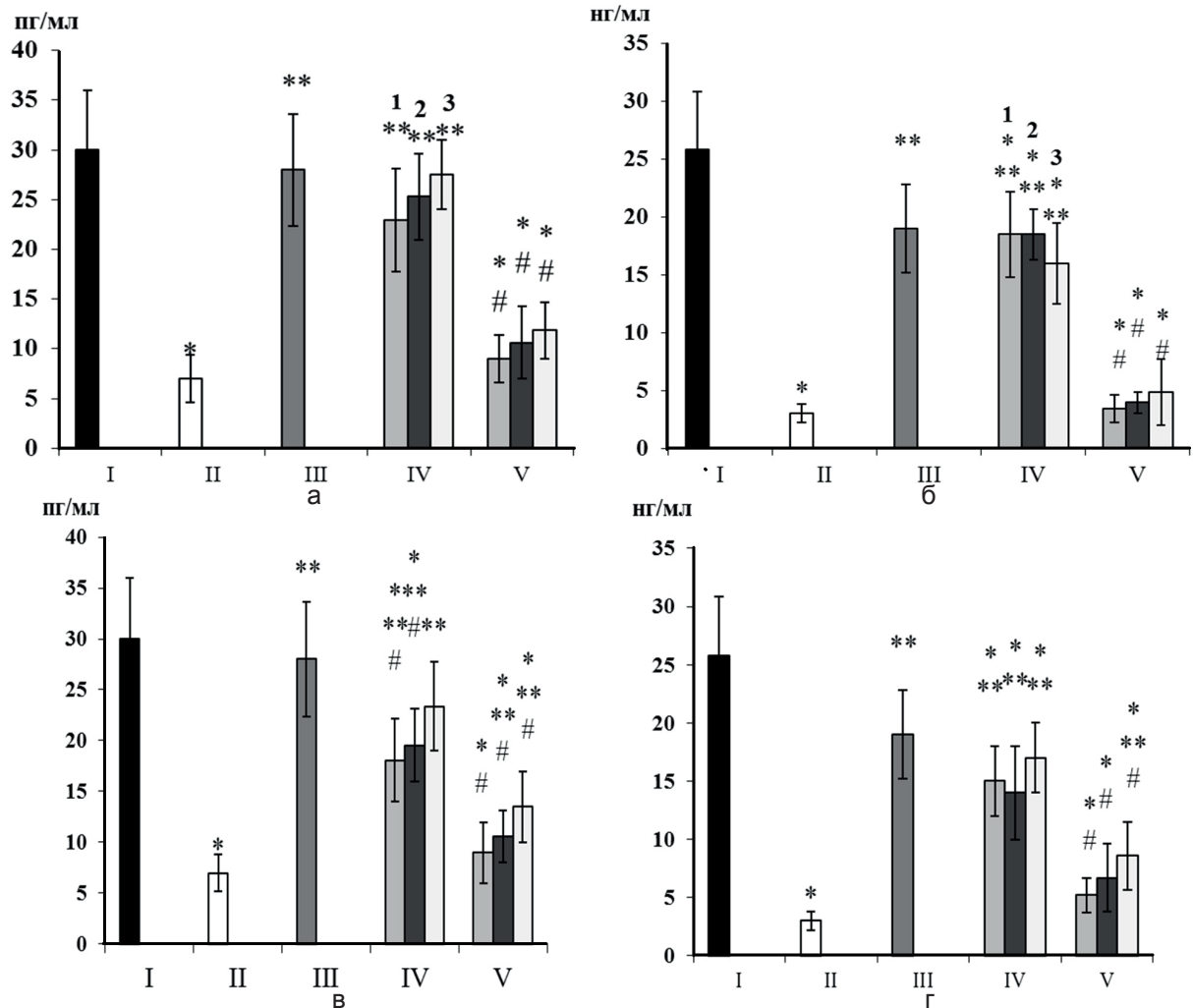


Рис. 5. Концентрація естрадіолу (а, в) та прогестерону (б, г) у тварин, де I – інтактні тварини; II – тварини з оваріоектомією; III – тварини з трансплантацією свіжовиділеної тканини; та з трансплантацією оваріальної тканини після інкубації в розчинах ФСБ (1), ДМЕМ (2) та МВР (3) при 37°C (а, б) протягом 2-х год (IV) і 4-х год (V) та при 4°C (в, г) протягом 24 год (IV) і 48 год (V). * P < 0,05 відносно значень інтактних тварин, ** P < 0,05 відносно значень тварин після оваріоектомії, # P < 0,05 відносно значень тварин після трансплантації свіжовиділеної тканини

фолікулів. У тварин-реципієнтів вміст естрадіолу і прогестерону після трансплантації тканини, ішемізованої протягом 2 год при 37°C і 24 год при 4°C, збігався з таким при трансплантації свіжовиділеної тканини (рис 5, а-г). Збільшення часу ішемії тканини до 4 год при 37°C призводило до зниження її ендокринної функції після трансплантації. Так, концентрація статевих гормонів в плазмі крові тварин-реципієнтів у цих групах була в межах значень кастрованих щурів (див. рис. 5 а, б). Відмінності стероїдогенної функції трансплантатів залежно від складу середовища інкубації були виявлені після трансплантації тканини, ішемізованої при 4°C протягом 48 год. В цьому разі експозиція тканини в МВР призводила до часткового збереження її функції, тоді як використання ДМЕМ і ФСБ викликало зниження концентрації статевих гормонів у тварин цієї групи до рівня кастрованих (див. рис. 5 в, г). Після трансплантації тканини, інкубованої в МВР при 4°C протягом 48 год, у тварин-реципієнтів концентрація естрадіолу була $13,5 \pm 3,5$ пг/мл (щодо $7,0 \pm 1,8$ пг/мл у кастрованих) і рівень прогестерону $8,6 \pm 2,9$ нг/мл (щодо $3,0 \pm 0,8$ нг/мл у кастрованих).

Результати однозначно вказують на те, що основним критерієм незворотного ішемічного пошкодження оваріальної тканини є накопичення ТБК-активних продуктів, яке призводить до відсутності ендокринної функції при її реваскуляризації. Так, повноцінне відновлення гормональної функції (див. рис.5) у кастрованих тварин-реципієнтів відзначено при трансплантації фрагментів яєчника після 2-годинної ішемії при 37 °C і 24-годинної 4°C. Показники рівня збереження морфологічної цілісності фолікулів і концентрації ТБК-активних продуктів залишалися в межах контрольних значень, тоді як зміни об'єму ооцитів і фолікулів визначалися температурою і складом середовища інкубації. Експозиція тканини у всіх досліджуваних середовищах при 4 °C і в ФСБ і ДМЕМ при 37 °C викликала стиснення клітин на 15-20%, а

використання МВР при 37 °C призводило до набухання ооцитів (див. рис.4). Різна осмотична відповідь клітин, вочевидь, пов'язана з різноспрямованим рухом молекул води і електролітів (Na^+ , K^+ , Cl^- , H^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} тощо) з позаклітинної рідини в цитоплазму в електролітному (ДМЕМ і ФСБ) і неелектролітному (МВР) середовищі. Відповідно до думки авторів [16-18] в електролітних ізотонічних середовищах зменшення клітинного об'єму відбувається наслідок поєданого виходу внутрішньоклітинних K^+ і Cl^- . Збільшення об'єму клітин в гіпотонічних неелектролітних середовищах [19, 20] пов'язано з блокуванням виходу Cl^- такими органічними молекулами, як вільні амінокислоти, багатоміспирти і метиламіни, з одного боку, а також пасивним рухом молекул води всередину клітини у напрямку електрохімічного градієнта, з іншого. Слід зазначити, що описані вище механізми регуляції об'єму в ізо- і гіпотонічних середовищах є адаптивними і спрямовані не на підтримку «абсолютного» об'єму клітини, а виступають як «амортизатори» при набуханні і стисненні [21, 22]. Зіставляючи результати, представлені на рис. 1-4, можна сказати, що зміни об'єму клітин при 2-годинній ішемії (37°C) і 24-годинній (4°C) мають зворотний характер, оскільки в цих групах ендокринна функція тканини збігається з контрольними значеннями.

Збільшення часу інкубації до 4 год при 37°C викликало зменшення об'єму клітин на 40-50% у всіх досліджуваних середовищах (див. рис.4, а). При цьому кількість пошкоджених фолікулів зростала (див. рис. 2), а також підвищувалась концентрація ТБК-активних продуктів у 3-4 рази (див. .3, а). Можна припустити, що у разі стиснення клітин ініціюється мітохондріальний механізм апоптозу, який призводить до морфологічних і біохімічних змін у тканині, внаслідок чого знижується пул нормально функціонуючих фолікулів після відновлення кровопостачання. Маєно і співавтор. [23] було показано, що зменшення об'єму клітин від 30 до 70%,

супроводжується збільшенням щільності цитоплазми, утворенням везикул на поверхні плазматичної мембрани, а також активацією внутрішньоклітинних каспаз і ендонуклеаз, і як наслідок, запускається апоптоз.

При зниженні температури до 4°C і збільшенні часу експозиції до 48 год зменшується об'єм ооцитів і фолікулів на 15-20% (див. рис. 4, б), що, ймовірно, зумовлено пригніченням активності роботи транспортних систем і уповільненням дифузійних процесів в цих умовах. Незначні зміни об'єму супроводжувалися пошкодженням структури у 50% фолікулів (див. рис. 2). Слід зазначити, що при інкубації тканини в МВР рівень накопичення ТБК-активних продуктів був в 2,5-3 рази нижче, ніж при використанні ФСБ і ДМЕМ (див. рис. 3, б). Зниження інтенсивності процесів ПОЛ при інкубації тканини в МВР (48 год, 4°C) корелювало з достовірним підвищенням концентрації естрадіолу і прогестерону у тварин-реципієнтів.

Отже, використання МВР знижує ішемічні ушкодження оваріальної тканини. Це можна пояснити як осмотичними властивостями манітолу, так і його антиоксидантною дією. У низці праць [8, 9, 24] була показана протективна дія манітолу. Paczynski і співавт. [25] експериментально продемонстрували, що багаторазове його введення в постішемічному періоді призводить до зменшення кількості води в паренхімі мозку і зниженню внутрішньотканинного тиску. Також введення манітолу посилює мозковий кровообіг і знижує артеріальний тиск в тканині після ішемічного впливу, проте, при цьому синаптична передача нервових імпульсів не відновлюється [7]. Magovern і співавт. [8], встановили, що реперфузія серця гіперосмолярними розчинами манітолу покращує діастолічну функцію шлуночка порівняно з використанням стандартних кристалоїдних розчинів. Висловлено припущення, що протективний ефект манітолу визначається не тільки його гіперосмолярними властивостями, а й антиоксидантними характеристиками.

Suzuki і співавт. [26] хемілюмінесцентним спектроаналізом довели зв'язування манітолу з гідроксил радикалом і пригнічення процесів ПОЛ в умовах експериментальної ішемії мозку.

Згідно з нашими експериментальними результатами антиоксидантна дія манітолу відзначається тільки при 4°C (див. рис.3, б). Підвищення температури до 37°C нівелювало цей ефект (див. рис.3, а), що, ймовірно можна пояснити дефіцитом кисню. При цій температурі кінетика реакцій пов'язана з порушенням клітинного метаболізму набагато вище, ніж при 4°C. Робота активних транспортних систем при 37°C і зміна іонної проникності мембрани, з одного боку, посилення процесів розпаду макроергічних сполук і накопичення продуктів деградації, з іншого, призводить до активації реакцій вільнорадикального окиснення і порушення про- і антиоксидантного балансу. В результаті зазначених вище процесів швидкість утворення активних форм кисню настільки велика, що дії манітолу, як антиоксиданту недостатньо.

Зниження температури до 4°C призводить до уповільнення процесів клітинного метаболізму, інактивації енергозалежних транспортних систем що в наших результатах підтверджується ідентичною осмотичною відповіддю клітин при інкубації в ізо- і гіпотонічних середовищах (див. рис.4, б). Використання манітолу, як основного компонента середовища інкубації призводило до пригнічення процесів ПОЛ. Аналогічний ефект протективної дії гіпотермії і манітолу в умовах гіпоксії продемонструвати Karibe і співавт. [27], які показали, що гіпотермія в поєднанні із застосуванням манітолу не тільки зменшує зону некрозу головного мозку при ішемії, але і знижує нейрофункціональний дефіцит.

ВИСНОВКИ

1. Зміни об'єму структурних компонентів оваріальної тканини при ішемії впродовж 2

год, 37°C і 24 год, 4°C були зворотними. Гетеротопічна трансплантація цих фрагментів показала відновлення ендокринної функції.

2. Антиоксидантні властивості манітолу посилювали протективну дію гіпотермії (48 год, 4°C), що проявлялося в низьких концентраціях ТБК-активних продуктів. При цьому відзначалося вірогідне підвищення концентрації статевих гормонів у тварин-реципієнтів щодо кастрованих.

3. Концентрація ТБК-активних продуктів у фрагментах оваріальної тканини при ішемії є основним показником, що характеризує незворотні ушкодження. У всіх експериментальних групах зафіксована кореляція між інтенсивністю процесів ПОЛ і ендокринною функцією ішемізованих фрагментів оваріальної тканини.

В.В. Кироска, Ю.О. Божкова, І.А. Трутаєва, А.А. Гавас

ЗАВИСИМОСТЬ ЭНДОКРИННОЙ ФУНКЦИИ ИШЕМИНИЗИРОВАННЫХ ТРАНСПЛАНТАТОВ ОВАРИАЛЬНОЙ ТКАНИ ОТ ИНТЕНСИВНОСТИ ПРОЦЕССОВ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ

Исследовали корреляционную зависимость между эндокринной функцией, морфологией и объемными изменениями в структуре овариальной ткани, а также интенсивностью процессов перекисного окисления липидов при различных температурных и временных параметрах моделирования ишемии. Показано, что морфологические трансформации являются обратимыми после 2-часовой ишемии при 37°C и 24-часовой при 4°C. В этом случае при восстановлении кровотока в условиях гетеротопической трансплантации достоверно повышались концентрации половых гормонов у животных-реципиентов относительно кастрированных. Увеличение времени ишемии до 4 ч при 37°C и до 48 ч при 4°C приводило к необратимым морфологическим трансформациям и недостаточности стероидогенной функции, кроме инкубации ткани (4°C, 48 ч) в маннитолсодержащем растворе (МСР), где уровень накопления продуктов тиобарбитуровой кислоты (ТБК) был в 2,5-3 раза ниже, что коррелировало с достоверным повышением концентрации эстрадиола и прогестерона у животных-реципиентов. Таким образом, было продемонстрировано сочетанный эффект протективного действия гипотермии и маннитола в условиях ишемии.

Ключевые слова: овариальная ткань; ишемические повреждения; эндокринная функция; объем ооцитов.

V.V. Kiroshka, Yu.O. Bozhkova, I.A. Trutaieva, A.A. Gawas¹

DEPENDENCE OF THE ENDOCRINE FUNCTION OF OVARIAN TISSUE TRANSPLANT AFTER ISCHEMIA ON THE INTENSITY OF LIPID PEROXIDATION

The correlation between endocrine function, morphology and volume changes in the structure of ovarian tissue, as well as intensity of lipid peroxidation at different temperature and time parameters after ischemia modeling were investigated. It was shown that the morphological transformations after 2 hours of ischemia at 37°C and 24 at 4°C are reversible. In this case, a significant increase in the concentration of sex hormones in animals-recipients relative to the castrated animals after heterotopic transplantation was observed. An increase in time of ischemia up to 4 hours at 37°C and 48 hours at 4°C led to morphological transformation and irreversible failure of endocrine function. This was not observed when the tissue was incubated (4°C, 48 hours) in a mannitol-containing solution, where the level of products of the thiobarbituric acid accumulation was 2.5-3 times lower, and correlated with a significant increase in the estradiol and progesterone concentrations in recipient animals. Thus, the combined protective effect of hypothermia and mannitol at the ischemia conditions was demonstrated.

Keywords: ovarian tissue; ischemic damage; endocrine function; the volume of oocytes.

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine, Kharkiv;

¹V.N. Karazin Kharkiv National University

REFERENCES

1. Vladimirov YA. Free radicals in biological systems. *Soros Ed J.* 2000; 6(12): 13–19. [Russian].
2. Vladimirov YA, Olenov II, Suslov TB, Potapenko Ya. 1975. The mechanisms of lipid peroxidation and its effect on biological membranes. In: Vladimirov YA, Roshchupkin DI, Potapenko AI, Deyev AI. *Biophysics. Results of science and technology (VINITI) of the USSR.* Moscow: *Meditina*, 5, 56–117. [Russian].
3. Bilenko MV, 1989. Ischemic and reperfused injury of organs. Moscow: *Medicine*, 368 p. [Russian].
4. Das DK, Maulik N. Antioxidant effectiveness in ischemiareperfusion tissue injury. *Methods Enzymol.* 1994; 233: 601–10.
5. Mallick I H, Yang W, Winslet MC, Seifalian AM. Ischemia-reperfusion injury of the intestine and protective strategies against injury. *Digestive Diseases and Sciences.* 2004; 49(9): 1359–77.
6. 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.
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. Magovern GJ, Belling SF, Casale AS, Bulkley BH, Gardner TJ. The mechanism of mannitol in reducing ischemic injury: hyperosmolarity or hydroxyl scavenger. *Circulation.* 1984; 70: 191–95.
 9. Oredsson S, Plate G, Qvarfordt P. The effect of mannitol on reperfusion injury and postischaemic compartment pressure in skeletal muscle. *Eur J Vasc Surg.* 1994; 8: 326–31.
 10. 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.
 11. Eyden B, Radford J, Shalet SM, Thomas N, Brison DR, Lieberman BA. Ultrastructural preservation of ovarian cortical tissue cryopreserved in dimethylsulfoxide for subsequent transplantation into young female cancer patients. *Ultrastructural Pathology.* 2004; 28: 239–45.
 12. Songsasen N, Fickes A, Pukazhenth 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.
 13. Gougeon A. Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results. *Hum Reprod* 1986; 1(2): 81–87.
 14. Vladimirov YA, Archakov AI, 1972. Lipid peroxidation in biological membranes. Moscow: Nauka, 252 p. [in Russian].
 15. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193(1): 265–75.
 16. Lang F, Uhlemann AC, Lepple-Wienhues A, Szabo I, Siemen D, Nilius B, Gulbins E. Cell volume regulatory mechanisms in apoptotic cell death. *Herz.* 1999; 24(3): 232–35.
 17. Lang F, Busch GL, Ritter M, Volkl H, Waldegger S, Gulbins E, Haussinger D. Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiological Reviews.* 1998 Jan; 78(1): 247–306.
 18. McCarthy JV, Cotter TG. Cell shrinkage and apoptosis: a role for potassium and sodium ion efflux. *Cell Death Differ.* 1997; 4(8): 756–70.
 19. Kirk K. Swelling-activated organic osmolyte channels. *J Membrane Biol.* 1997; 158: 1–16.
 20. Banderali U, Roy G. Activation of K and Cl⁻ channels in MDCK cell during volume regulation in hypotonic media. *J Membrane Biol.* 1992; 126: 219–34.
 21. Gomez-Angelats M, Bortner CD, Cidlowski JA. Cell volume regulation in immune cell apoptosis. *Cell Tissue Res.* 2000; 301: 33–42.
 22. Lang F, Ritter M, Gamper N, Huber S, Fillon S, Tanneur V, Lepple-Wienhues A, Szabo I, Gulbins E. Cell volume in the regulation of cell proliferation and apoptotic cell death. *Cell Physiol Biochem.* 2000; 10: 417–28.
 23. Maeno E, Ishizaki Y, Kanaseki T, Hazama A, Okada Y. Normotonic cell shrinkage because of disordered volume regulation is an early prerequisite to apoptosis. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 2000; 97(17): 9487–92.
 24. Luvisotto TL, Auer RN, Sutherland GR. The effect of mannitol on experimental cerebral ischemia, revisited. *Neurosurgery.* 1996 Jan; 38(1):131–8.
 25. Paczynski RP, He YY, Diringner MN, Hsu CY. Multiple-dose mannitol reduces brain water content in a rat model of cortical infarction. *Stroke.* 1997 Jul; 28(7):1437–43.
 26. 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.
 27. Karibe H, Zarow GJ, Weinstein PR. Use of mild intraschismic hypothermia versus mannitol to reduce infarct size after temporary middle cerebral artery occlusion in rats. *J Neurosurg.* 1995; 83:93–98.

Матеріал надійшов до редакції 15.16.2016