

Ю.О. Божкова, В.В. Кірошка, А.А. Гавас, В.А. Бондаренко

Динаміка структурних змін оваріальної тканини при ішемії

Ін-т проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків; E-mail: tischenko.kh@gmail.com, vvkiroshka@mail.ru

Досліджували кореляційну залежність фолікулогенезу та ендокринну функцію оваріальної тканини від ступеня її структурних пошкоджень і об'ємних змін ооцитів при ішемії. Показано, що морфологічні трансформації структурних компонентів оваріальної тканини є оборотними після 2-годинної ішемії при 37 °С. У цьому разі при відновленні кровотоку в умовах гетеротопічної трансплантації вміст естрадіолу був $25,9 \pm 5,18$ нг/мл, а прогестерону – $18,48 \pm 3,69$ нг/мл, що достовірно вище відносно значень у кастрованих тварин-реципієнтів. Введення ембріональної телячої сироватки в середовище інкубації викликало зменшення об'єму ооцитів зростаючих фолікулів на 5–7 % в умовах ішемії та зниження концентрації естрадіолу до $17,75 \pm 3,55$ нг/мл, а прогестерону – до $10,52 \pm 2,1$ нг/мл на 30-ту добу після трансплантації яєчника. Збільшення часу ішемії до 4 год призводило до незворотних морфологічних трансформацій, зменшення об'єму ооцитів на 40 % і утворення склерозованої тканини після трансплантації ішемізованих фрагментів яєчників.

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

ВСТУП

Вивчення патофізіологічних механізмів ішемічних ушкоджень тканин і органів – одне з актуальних завдань сучасної фізіології. Основною причиною ішемії органів і тканин є порушення або повне припинення кровопостачання, яке ініціює каскад реакцій: зниження вмісту макроергічних сполук, порушення ферментативної кінетики, накопичення продуктів розпаду, утворення активних форм кисню, посилення процесу перекисного окиснення ліпідів [1–3]. Для зазначених вище патологічних процесів характерним є запуск мітохондріального механізму клітинної загибелі, який може завершуватися як істинним апоптозом клітини, так і некробіозом [4, 5]. У сучасній літературі обговорюються [6–9] можливості попередження пошкоджень в ішемізованих органах і тканинах через визначення оптимальних часових і температурних параметрів перфузії, а також введенням до

складу перфузійних середовищ різних речовин з антиоксидантними властивостями. Одним з найбільш широко використовуваних компонентів перфузійних середовищ є альбумін, який характеризується як антиоксидантними властивостями, так і здатністю змінювати парацелюлярну ендотеліальну проникність [10]. Однак у літературі існують суперечливі дані щодо його дії залежно від температури і складу перфузійних середовищ. Показано [11], що введення альбуміну або ембріональної телячої сироватки (ЕТС) у середовище інкубації підвищує збереження кератиноцитів в умовах гіпоксії при 4 і 25 °С, тоді як при 37 °С – визначається складом середовища інкубації. Так, введення цих компонентів до складу розчину UW (від англ. University of Wisconsin solution) негативно впливає на збереження ендотеліоцитів при нормотермічному зберіганні, тоді як додавання до розчину НТК (від англ. histidine-tryptophan-ketoglutarate) запобігає

© Ю.О. Божкова, В.В. Кірошка, А.А. Гавас, В.А. Бондаренко

пошкодженню мітохондрій і призводить до повної регенерації клітин у культурі [12]. До теперішнього часу на різних експериментальних моделях (головний мозок, печінка, серце, нирки, м'язи) встановлені максимальні часові терміни оборотності ішемії залежно від температури і складу перфузійних середовищ [13].

Дослідження толерантності яєчників до ішемії, критичний час, а також вплив різних фізико-хімічних факторів на структурно-функціональні пошкодження оваріальної тканини є актуальним завданням у сучасній репродуктивній фізіології [14]. Це зумовлено тим, що трансплантація тканини яєчників є однією з основних стратегій збереження репродуктивної та стероїдогенної функції у жінок після курсів хіміо- та радіотерапії [15]. Однак для широкого впровадження цієї технології в клінічну практику потрібне збереження достатнього пулу життєздатних фолікулів [16, 17]. Наразі залишаються відкритими питання про корелятивну залежність ступеня структурних пошкоджень тканини яєчника, їх оборотність і відновлення ендокринної функції умов моделювання ішемії.

Мета нашої роботи – дослідити динаміку морфологічних трансформацій оваріальної тканини, фолікулогенез та ендокринну функцію залежно від часу ішемії та складу середовища інкубації.

МЕТОДИКА

Об'єктом дослідження були фрагменти оваріальної тканини 3-місячних щурів лінії Вістар, які знаходилися в стандартних умовах віварію ІПКіК НАН України. Утримання та використання лабораторних тварин відповідало положенням «Європейської конвенції захисту хребетних тварин», які використовуються з експериментальною та іншою науковою метою» (Страсбург, 1986 р.) і загальноприйнятим Національним нормам біоетики.

Ішемію моделювали інкубацією фрагментів яєчників при +37 °С у фосфатно-со-

льовому буфері (ФСБ; моль/л): 130 – NaCl, 20 – KCl, 20 – фосфатного буфера при pH 7,4 – (розчин 1), а також у фосфатно-сольовому буфері з додаванням 10 % ЕТС (розчин 2). Час ішемічного впливу становив 2, 4 і 6 год. Після цього для морфологічних досліджень здійснювали фіксацію оваріальної тканини в 2%-му розчині глутарового альдегіду на 150 ммоль/л фосфатному буфері і виготовлення напівтонких зрізів за стандартною методикою [18]. Кожен третій зріз забарвлювали толуїдиновим синім. Здійснювали морфологічний аналіз гістологічних зрізів, а також визначення загального об'єму фолікулів та ооцитів за допомогою комп'ютерної програми (Fovea Pro®, Reindeer Graphics, Asheville NC, США, and Photoshop®, Adobe Systems, Inc. San Jose, CA, США). Фолікули виміряли від зовнішнього шару теки (якщо він наявний) або від зовнішнього шару клітин гранульози (коли клітини теки відсутні), а ооцити – без зони пелюцида [19]. Співвідношення об'єму ооцита до об'єму фолікула було представлено у вигляді лінійної залежності.

Функцію оваріальної тканини після ішемічного впливу вивчали методом трансплантації під капсулу лівої нирки щурів. Для проведення експериментальної роботи тваринам трансплантували оваріальну тканину: I група – контрольна (свіжовиділена оваріальна тканина), II група – після інкубації в розчині 1, III група – після інкубації в розчині 2. Трансплантацію оваріальної тканини в усіх групах здійснювали одночасно з двобічною оваріоектомією. Операції тваринам проводили в стерильних умовах під комбінованим наркозом (0,1 мг кетаміну, 0,25 мг ксилазину на 100 г маси). Гетеротопічну трансплантацію здійснювалась під капсулу лівої нирки.

На 30-ту добу після трансплантації проводили евтаназію тварин за допомогою ефірного наркозу. Для морфологічних досліджень нирки з трансплантатом фіксували у 10%-му розчині формаліну протягом 48 год [18]. З кожного зразка робили серійні зрізи всього трансплантата товщиною 10 мкм. Кожен

третій зріз фарбували гематоксилін-еозином. Аналіз гістологічних зрізів здійснювали, вивчаючи тільки фолікули з видимим ядром ооцита для виключення повторного рахунку одного і того самого фолікула.

Ідентифікацію стадії розвитку фолікулів проводили згідно з класифікацією: первинний – ооцит оточений поодиноким шаром кубічних клітин гранульози; преантральний – ооцит оточений більш ніж двома шарами гранульозних клітин, розташованих на базальній мембрані, навколо якої знаходяться поодинокі тека-клітини; антральний – ооцит збільшений в об'ємі, оточений кількома шарами гранульозних клітин, формується порожнина, яка містить фолікулярну рідину. На гістологічних зрізах визначали відсоток площі фіброзу тканини відносно загальної площі трансплантата.

Дослідження гістологічних препаратів здійснювали за допомогою світлового мікроскопа при збільшеннях у 10, 20 і 40 разів. Мікрофото зйомку проводили за допомогою мікроскопа Carl Zeiss Axio Observer Z1 і пакета прикладних програм для обробки зображення.

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

Отримані результати статистично обробляли за допомогою програми Statgraphics v2.1. Відмінності вважали достовірними при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

На рис. 1 представлено зміни морфологічної структури оваріальної тканини залежно від часу ішемії у ФСБ (розчин 1) та з додаванням 10 % ЕТС (розчин 2). Видно (див. рис. 1, а), що в нормі фолікули мають сферичний ооцит з великим ексцентричним ядром, оточеним однорідною цитоплазмою. Ооцит оточений білковою оболонкою (зона пелюцида), що має

однакову товщину і гомогенність по всьому периметру клітини. До зони пелюцида щільно прилягають клітини гранульози, які контактують між собою і з базальною мембраною. Зовні базальної мембрани знаходяться клітини теки.

При інкубації фрагментів оваріальної тканини протягом 2 год при 37 °С спостерігаються незначні зміни морфологічної структури фолікулів як у розчині 1, так і в розчині 2 (див. рис. 1, б, в). Спостерігається стиснення клітин гранульози та акумуляція між ними, а також біля базальної мембрани. При цьому гранульозні клітини зберігають щільний контакт з ооцитом, який має сферичну форму та незначно гранульовану цитоплазму. Ядро ооцита залишається гомогенним і має чітко виражену мембрану. Зміни структури клітин теки та інтерстиціальних клітин не спостерігається.

При збільшенні часу ішемії до 4 год відзначається акумуляція рідини між усіма структурними елементами оваріальної тканини, тобто відбувається стиснення клітин і втрата контакту як між клітинами гранульози, так і клітинами теки (рис. 2, а, б). Однак контакт між клітинами гранульози і ооцитом все ще існує. Спостерігається грануляція в цитоплазмі ооцита та початкові етапи його стиснення, що проявляється у зміні його форми та утворенні *перивітелінового простору* між ооцитом і білковою оболонкою. Це характерно для виходу з цитоплазми осмотично активних речовин. При цьому зберігається типова структура ядра і гомогенна по всій окружності ооцита зона пелюцида.

Після 6 год інкубації фрагментів оваріальної тканини збільшується вміст рідини між усіма структурними елементами тканини (див. рис. 2, в, г). Спостерігається подальше стиснення ооцита і збільшення *перивітелінового простору*. Ядро ооцита втрачає свою округлу форму і гомогенність. Всередині ядра відзначаються скупчення хроматину у вигляді окремих грудочок. Слід зазначити, що зона пелюцида не має чітких меж, тоді як мембрана ооцита і базальна мембрана фолікулів зберігають контури.

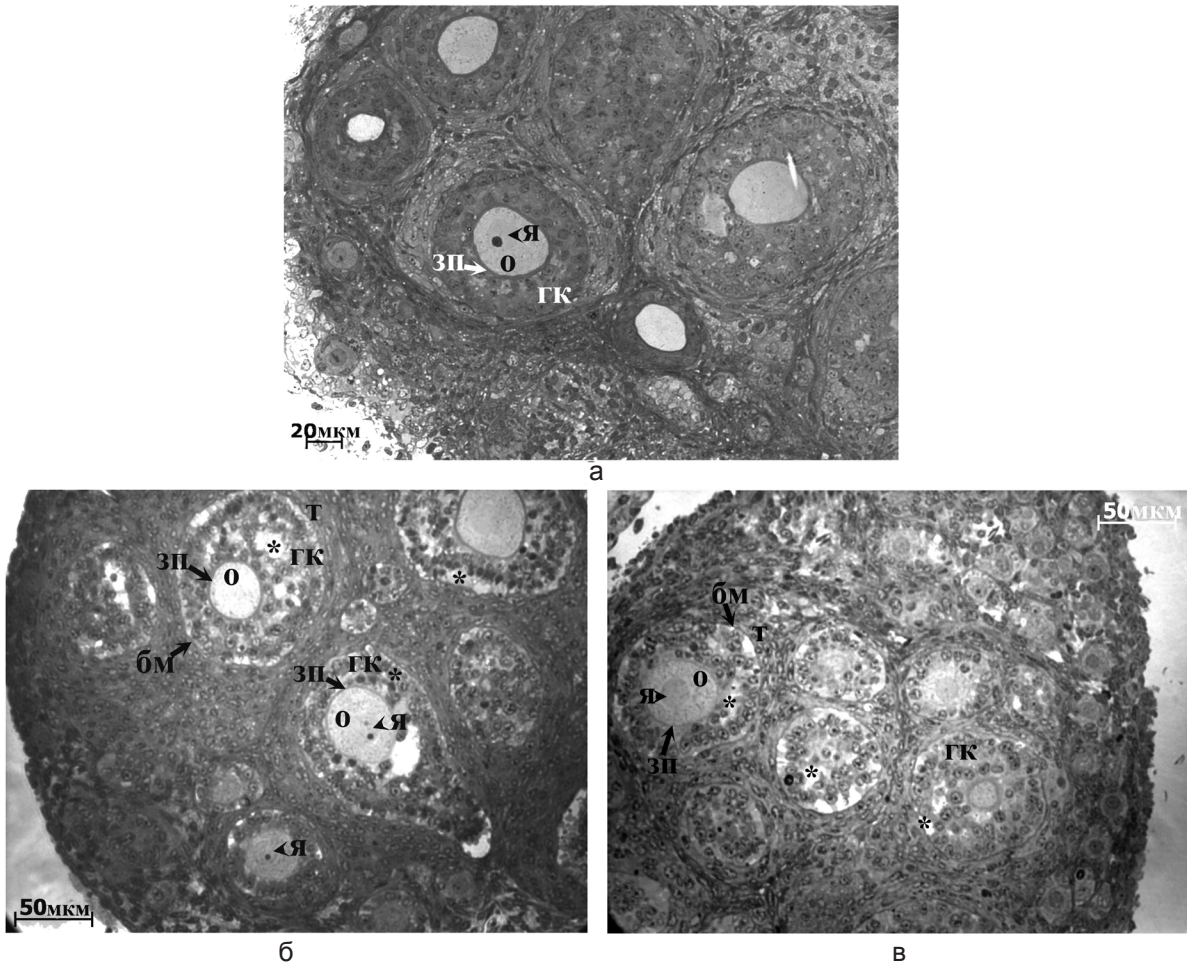


Рис. 1. Гістопрепарати фрагментів оваріальної тканини: а – свіжовиділена, б, в – після 2 год інкубації в розчині 1 і 2 відповідно: о – ооцит, я – ядро, ЗП – зона пелюцида, ГК – гранульозні клітини, БМ – базальна мембрана, Т – тека-клітини, * – акумуляція рідини, + – перивітеліновий простір

Порівнюючи часову динаміку морфологічних трансформацій оваріальної тканини (див. рис. 1, 2) слід вказати на відсутність якісних структурних відмінностей залежно від складу середовища інкубації.

Відомо, що в умовах гіпоксії відбувається енергетичне виснаження клітин, накопичення метаболітів, а також порушення іонного гомеостазу за рахунок зниження активності роботи транспортної системи, деполяризації клітинної мембрани і перерозподілу електrolітів між клітинною і позаклітинною рідиною [20]. Основним фізіологічним процесом, що відображає виникнення дисбалансу

осмотично активних сполук у клітині, є зміна її об'єму. Оскільки структурною одиницею оваріальної тканини є фолікул, ми вважали за доцільне провести аналіз об'ємних змін ооцитів відносно загального об'єму фолікула (рис. 3). Протягом перших 2 год інкубації при 37 °С об'єм ооцитів у розчині 1 достовірно не відрізнявся від контролю. Використання розчину 2 призводило до зменшення об'єму ооцитів антральних фолікулів, тоді як об'єм ооцитів примордіальних і первинних фолікулів залишався на рівні контролю (див. рис. 3). Збільшення часу гіпоксії до 4 і 6 год нівелювало зазначені вище об'ємні відмін-

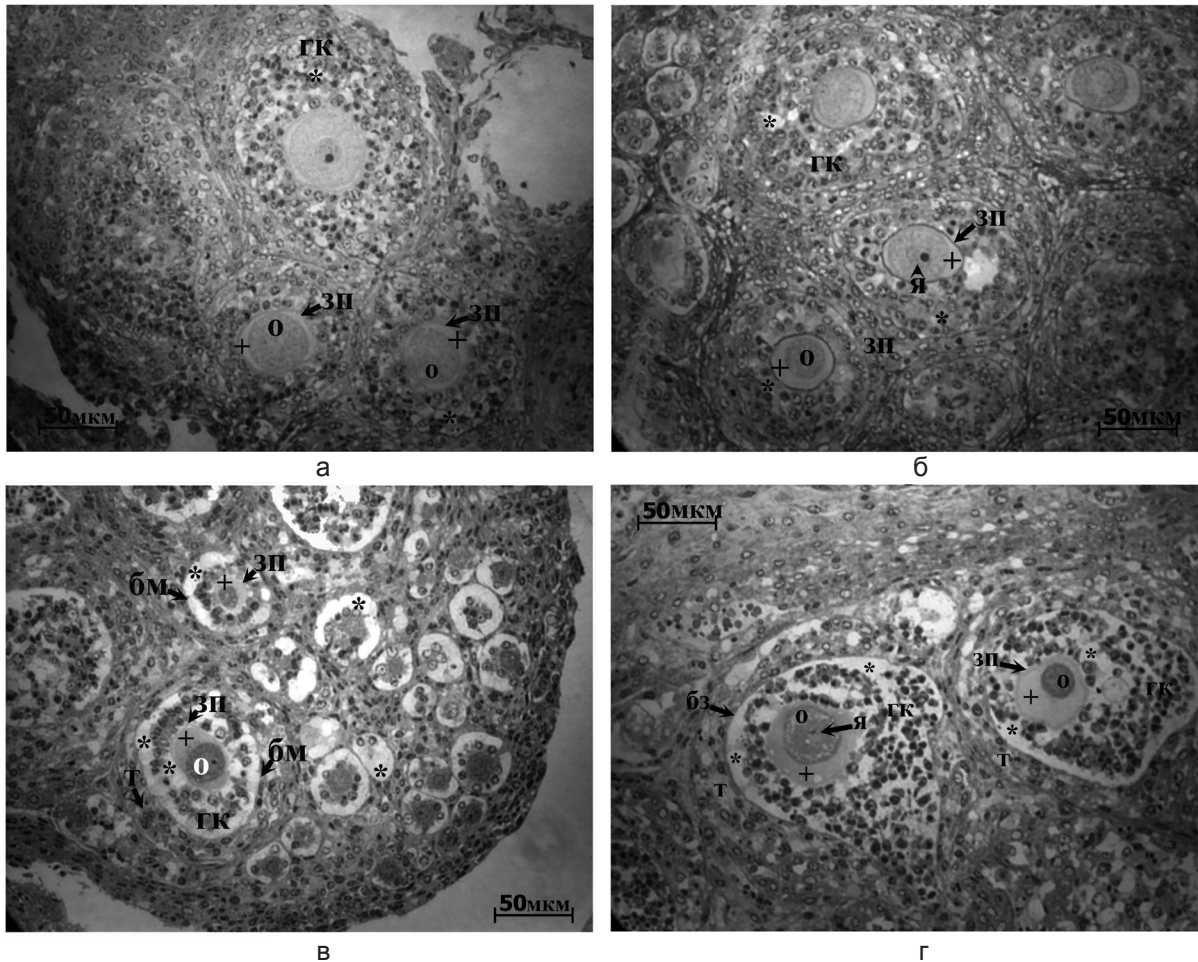


Рис. 2. Гістопрепарати фрагментів оваріальної тканини: після 4 год інкубації в розчині 1 (а) і 2 (б), після 6 год інкубації в розчині 1 (в) і 2 (г): о – ооцит, я – ядро, ЗП – зона пелюцида, ГК – гранульозні клітини, БМ – базальна мембрана, Т – тека-клітини, * – акумуляція рідини, + – перивітеліновий простір

ності ооцитів, що були зумовлені наявністю ЕТС у середовищі інкубації. При цьому відзначалося зменшення об'єму ооцитів в 2 і 2,8 рази через 4 і 6 год, відповідно (див. рис. 3).

Можливість оборотності зазначених вище ішемічних ушкоджень, а також здатність відновлення ендокринної та репродуктивної функції було досліджено методом гетеротопічної трансплантації кастрованим тваринам-реципієнтам. Трансплантацію фрагментів оваріальної тканини здійснювали у разі збереження структурної цілісності ядра ооцита не залежно від об'єму клітин (див. рис. 1, 2), тобто після 2 і 4 год ішемії. Показано (таблиця), що фолікулярний профіль трансплантатів

свіжовиділеної оваріальної тканини (I група) і після 2-годинної ішемії в розчині 1 (II група) і розчині 2 (III група) був подібним і представлений преантральними і антральними фолікулами, а також жовтими тілами (див. таблицю). Слід зазначити, що площа фіброзу трансплантатів ішемізованої тканини становила 30 і 66 % в II і III групах відповідно. Трансплантація оваріальної тканини після 4-годинної ішемії призводила до повного її склерозування на 30-ту добу спостереження.

У цей термін концентрація естрадіолу і прогестерону у тварин I і II групи була у межах фізіологічної норми, тоді як у тварин III групи ці показники знижилися ($P < 0,05$; рис. 4).

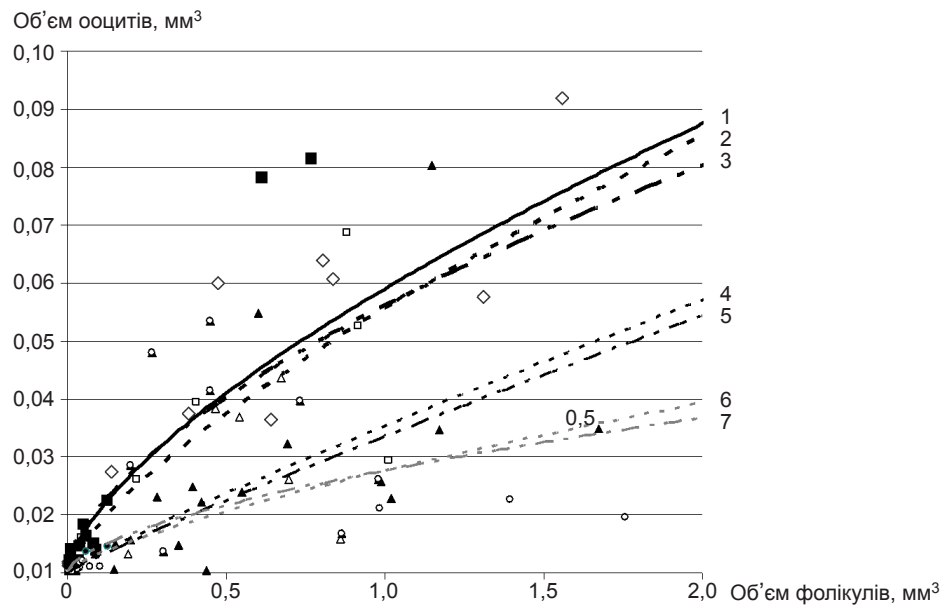


Рис. 3. Об'єм ооцитів і фолікулів у фрагментах оваріальної тканини: \diamond – свіжовиділеної, \square – після 2 год в розчині 1, \blacksquare – після 2 год у розчині 2, Δ – після 4 год у розчині 1, \blacktriangle – після 4 год у розчині 2, \circ – після 6 год в розчині 1, \bullet – після 6 год в розчині 2; лінійна залежність об'єму ооцитів від об'єму фолікулів у фрагментах: 1 – свіжовиділених, 2 – після 2 год у розчині 1, 3 – після 2 год у розчині 2, 4 – після 4 год у розчині 1, 5 – після 4 год у розчині 2, 6 – після 6 год у розчині 1, 7 – після 6 год у розчині 2

Трансплантація фрагментів яєчника після 4 год ішемії призводила до зниження вмісту статевих гормонів у тварин II і III груп до рівня кастрованих тварин.

Експериментальні результати, отримані в нашій роботі, однозначно вказують на те, що фолікулогенез і синтез статевих гормонів

у фрагментах оваріальної тканини в умовах гетеротопічної трансплантації є відображенням оборотності структурних трансформацій і об'ємних змін тканини яєчника, зумовлених дією ішемії. Розвиток фолікулярних структур (див. таблицю) і гормональна функція у кастрованих тварин-реципієнтів (див. рис.

Гістологічний аналіз трансплантатів оваріальної тканини на 30-ту добу

Морфометричні показники	Свіжовиділена оваріальна тканина	Фосфатно-сольовий буфер		Фосфатно-сольовий буфер, 10% ембріональної телячої сироватки	
		після 2 год ішемії	після 4 год ішемії	після 2 год ішемії	після 4 год ішемії

Кількість фолікулів на гістологічний зріз					
антральних	4±3	4±2	0	2±1	0
преантральних	3±1	5±3	0	2±1	0
Кількість жовтих тіл на гістологічний зріз	5±2	4±1	0	4±3	0
Площа фіброзу тканини від загальної площі трансплантата, %	0	30±20	100	66±40	100

4) відзначені тільки після трансплантації фрагментів оваріальної тканини у разі 2-годинної ішемії на фоні збереження об'ємних характеристик і морфологічної цілісності ооцитів. Збільшення часу ішемії до 4 год викликало зменшення об'єму ооцитів на 40 % (див. рис. 3), що згодом супроводжувалося склерозуванням тканини після трансплантації і відсутністю стероїдогенної функції у тварин-реципієнтів. Отже, можна припустити, що об'ємні зміни оваріальної тканини після 4-годинної ішемії в розчинах 1 і 2 (див. рис. 3) є незворотними. Цей факт, вірогідно, пов'язаний з порушенням іонного гомеостазу клітини в умовах ішемії, яке призводить до дисбалансу осмотичного тиску та викликає зміну об'єму клітин [21–23]. Порушенням іонної проникності клітин при збереженні

цілісності плазматичної мембрани, а саме втрата клітиною іонів K^+ і Cl^- , призводить до зменшення клітинного об'єму від 30 до 70 % в ізотонічних умовах для різних типів клітин, що є основним критерієм ранньої стадії апоптозу [24–27]. Як видно з наших результатів (див. рис. 2), достовірне збереження об'єму ооцитів щодо контролю відзначено тільки у разі 2-годинної інкубації в розчині 1. Це, ймовірно, і визначило збереження стероїдогенної функції ішемізованої тканини на рівні свіжовиділеної. Очевидно, в цих експериментальних умовах адаптивні механізми регуляції об'єму залишаються ефективними і виступають як «амортизатори» при набуханні і при стисненні клітин [28].

Додавання ЕТС до середовища інкубації не призводило до якісних відмінностей у

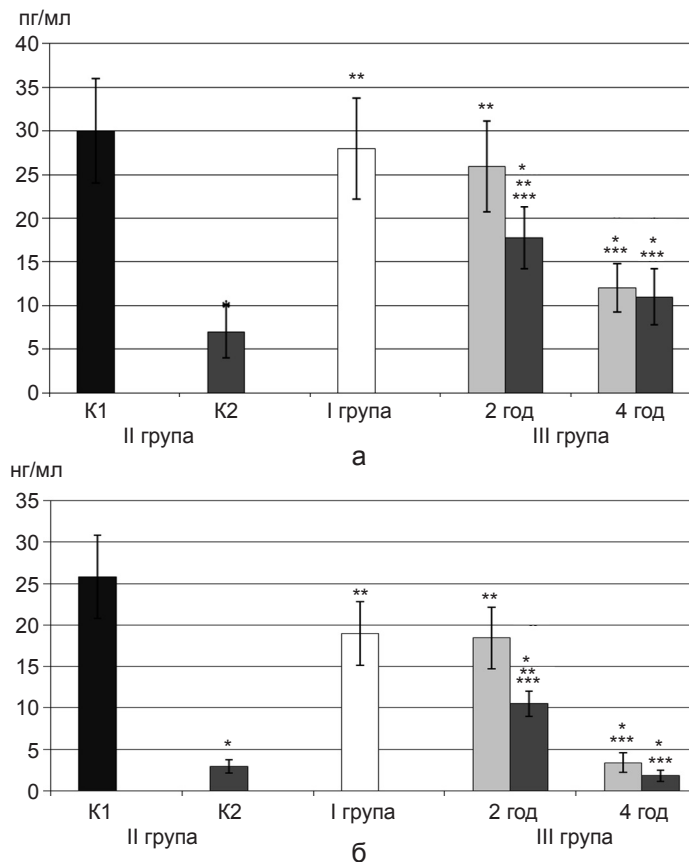


Рис. 4. Вміст естрадіолу (а) і прогестерону (б) у тварин після трансплантації оваріальної тканини: K1 – інтактні тварини, K2 – тварини після оваріоектомії. * $P < 0,05$ порівняно зі значеннями K1, ** $P < 0,05$ порівняно зі значеннями K2, *** $P < 0,05$ порівняно з показниками I групи

морфологічних трансформаціях оваріальної тканини (див. рис. 1, 2), тоді як об'єм ооцитів преантральних і антральних фолікулів зменшувався відносно контролю (рис. 3). Ці зміни об'єму ооцитів, ймовірно, запускають механізм апоптозу, який при відновленні кровопостачання тканини викликає зменшення пулу життєздатних фолікулів, збільшення площі фіброзу і зниження ендокринної функції трансплантата (див. таблицю, рис. 4).

Зіставляючи результати морфологічної трансформації і об'ємних змін фолікулів оваріальної тканини, а також фолікулярного профілю і гормональної функції трансплантатів можна дійти висновку, що об'ємні зміни ооцитів при збереженні їх форми, структури ядра і плазматичної мембрани в ішемізованій тканині яєчника є одним з основних факторів, яких визначатиме повноцінність її функції після відновлення кровопостачання. Згідно з сучасними уявленнями зменшення об'єму клітин в ізотонічних умовах передує морфологічним і біохімічним змінам, пов'язаним з апоптозом клітини в умовах ішемії [29, 30]. У праці Maeno і співавт. [25] припускається, що зменшення об'єму клітин, що зумовлене зниженням концентрації K^+ і Cl^- , супроводжується збільшенням щільності цитоплазми, утворенням везикул на поверхні плазматичної мембрани, а також активацією внутрішньоклітинних каспаз і ендонуклеаз.

Cidłowski і співавт. [31, 32] показали, що після гіпертонічного стиснення лімфоцитів їх об'єм не відновлюється в фізіологічних умовах, а запускається мітохондріальний механізм апоптозу через активацію внутрішньоклітинних каспаз і цитохрому С. Активні каспази викликають протеоліз ядерних і цитоплазматичних білків, а також активують ендонуклеази. В результаті це призводить до фрагментації ядра клітини і цитоплазми, утворення апоптотичних тілець. Аналогічні дані були отримані на нейронах [33], а також на кардіоміоцитах [34]. Втрата K^+ ооцитом і клітинами гранульози спричинює запуск каскаду апоптотичних подій, що включають

активацію каспаз і ендонуклеаз [35, 36].

Отже, можна припустити, що зменшення об'єму ооцитів в умовах ішемії, ймовірно, також пов'язане з ініціацією механізму апоптозу, що призводить до зниження пулу життєздатних фолікулів після відновлення кровопостачання при гетеротопічній трансплантації.

Об'ємні зміни ооцитів, в свою чергу, визначаються складом середовища інкубації і тривалістю ішемічного впливу. У такій постановці експерименту максимальна оборотність ішемічного ушкодження була відзначена після 2-годинної інкубації оваріальної тканини в розчинах, що були досліджені. Причому, введення 10%-ї ЕТС викликало об'ємні зміни ооцитів зростаючих фолікулів, а також достовірне зниження стероїдогенної функції тканини після її трансплантації щодо контрольних значень.

Таким чином, можна сказати, що збереження об'ємних характеристик ооцитів в умовах ішемії відносно контролю, незважаючи на акумуляцію рідини між структурними елементами оваріальної тканини, є основним параметром, який забезпечує збереження фолікулярного пулу, динаміку фолікулогенезу та ендокринну функцію фрагментів ішемізованої тканини після відновлення кровотоку за допомогою трансплантації.

**Ю.О. Божкова, В.В. Кирошка, А.А. Гавас,
В.А. Бондаренко**

ДИНАМИКА СТРУКТУРНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ОВАРИАЛЬНОЙ ТКАНИ ПРИ ИШЕМИИ

Исследовали корреляционную зависимость фолликулогенеза и эндокринной функции овариальной ткани от степени ее структурных повреждений и объемных изменений ооцитов при ишемии. Показано, что морфологические трансформации структурных компонентов овариальной ткани являются обратимыми после 2-часовой ишемии при 37 °С. В этом случае при восстановлении кровотока в условиях гетеротопической трансплантации содержание эстрадиола у животных было $25,9 \pm 5,18$ пг/мл, а прогестерона – $18,48 \pm 3,69$ нг/мл, что достоверно выше значений кастрированных животных-реципиен-

тов. Введение эмбриональной телячьей сыворотки в среду инкубации вызывало уменьшение объема ооцитов растущих фолликулов на 5–7 % в условиях ишемии и снижение концентрации эстрадиола до $17,75 \pm 3,55$ пг/мл, а прогестерона – до $10,52 \pm 2,1$ нг/мл на 30-е сутки после трансплантации яичников. Увеличение времени ишемии до 4 ч приводило к необратимым морфологическим трансформациям, уменьшению объема ооцитов на 40 % и образованию склерозированной ткани после трансплантации ишемизированных фрагментов яичников.

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

Yu.O Bozhkova , V.V Kiroshka , A.A. Havas , V.A. Bondarenko

DYNAMICS OF STRUCTURAL CHANGE OF OVARIAN TISSUE UNDER ISCHEMIA

In this work it was investigated the dependence of the correlation of folliculogenesis and endocrine function of ovarian tissue on the degree of structural damage and oocyte volume changes during ischemia. It was shown that after 2 hours of ischemia at 37 °C the morphological transformation of the structural components of the ovarian tissue were reversible. In case of restoration of blood flow conditions by heterotopic transplantation estradiol level of animals was $25,9 \pm 5,18$ pg/ml, progesterone - $18,48 \pm 3,69$ ng/ml, significantly higher than the castrated animals-recipients. Supplement of the incubation medium by the fetal bovine serum lead to decreasing by 5-7 % in the volume of oocytes of growing follicles during in ischemia and reduced steroidogenic function of ovarian tissue after perfusion. Increased time of the ischemia up to 4 hours was founded in irreversible morphological transformation, reduce the volume of oocytes by 40 % and the formation of sclerosed tissue after transplantation of the ischemic fragments of ovarian tissue.

Key words: ovarian tissue, ischemic damage, endocrine function, the volume of oocyte.

Institute for Problem of Cryobiology and Criomedicine of NAS of Ukraine, Kharkiv

REFERENCES

1. Grace PA. Ischemia-reperfusion injury. *Brit J Surg.* 1994;81:631-41.
2. Dorweiler B, Preefer D, Andrasi TB, Maksan SM, Schmiedt W, Neufang A, et al. Ischemia-Reperfusion Injury. *Eur J Trauma Emerg Surg.* 2007;33(6):600-12.
3. Kerrigan CL, Stotland MA. Ischemia reperfusion injury: a review. *Microsurgery.* 1993;14:165-75.
4. Piper HM, Meuter K, Schafer C. Cellular mechanisms of ischemia-reperfusion injury. *Ann Thorac Surg.* 2003;75:644-8.
5. Fu H, Xu H, Chen H, Li Y, Li W, Zhu Q, et al. Inhibition of Glycogen Synthase Kinase 3 Ameliorates Liver Ischemia/Reperfusion Injury via an Energy-dependent Mitochondrial Mechanism. *J Hepatol.* 2014 May;23:358-4.
6. Ozturk H, Ozturk H, Terzi EH, Ozgen U, Duran A, Uygun I. Protective effects of rosmarinic acid against renal ischaemia/reperfusion injury in rats. *J Pak Med Assoc.* 2014 Mar;64(3):260-5.
7. Alvarez P, Tapia L, Mardones LA, Pedemonte JC, Farias JG, Castillo RL. Cellular mechanisms against ischemia reperfusion injury induced by the use of anesthetic pharmacological agents. *Chem Biol Interact.* 2014 May 13;218:89-98.
8. Reilly PM, Schiller HJ, Bulkley GB. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *Amer J Surg.* 1991;161:488-504.
9. Mallick IH, 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.
10. Watts JA, Maiorano PC. Trace amounts of albumin protect against ischemia and reperfusion injury in isolated rat hearts. *J Mol Cell Cardiol.* 1999; 31:1653-62.
11. Lee EJ, Lee S-A, Kim J. The effect of human serum albumin on the extended storage of human oral keratinocyte viability under mild hypothermia. *Cryobiol.* 2005; 50:103–11.
12. Puehler T, Gleich O, Schopka S, Rupprecht L, S. Hirt, Schmid C, et al. Impact of normothermic perfusion and protein supplementation on human endothelial cell function during organ preservation. *Ann Thorac Surg.* 2010;89:512-21.
13. Guiberta EE, Petrenkob AY, Balabana CL, Somovb AY, Rodriguez JV, Fullerc BJ. Organ preservation: current concepts and new strategies for the next decade. *Transfus Med Hemother.* 2011;38:125-42.
14. Bedaiwy MA, Shahin AY, Falcone T. Reproductive organ transplantation: advances and controversies. *Fertil Steril.* 2008;90(6):2031-55.
15. Blatt J. Pregnancy outcome in long-term survivors of childhood cancer. *Med Pediatr Oncol.* 1999;33(1):29-33.
16. Donnez J, Jadoul P, Langendonck A, Eyck A, Dolmans M. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation in cancer patients. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2010;24:87-100.
17. Boiso I, Veiga A, Tresserra F, Grases P, Barri PN, Dexeus S. Ovarian tissue freezing, a promising method for fertility preservation. *Ref Gynecol Obstet.* 2001;8:448-52.
18. Lilli R. Патогистологическая техника и практическая гистохимия. М.: Mir, 1969. 645 p
19. 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.
20. Maxwell SJ, Lip GYH. Reperfusion injury: a review of the pathophysiology, clinical manifestations and therapeutic options. *Int J Cardiol.* 1997;58:95-117.

21. Jennings RB, Schaper J, Hill ML, Steenbergen C, Reimer KA. Effect of reperfusion late in the phase of reversible ischemic injury. changes in cell volume, electrolytes, metabolites, and infrastructure. *Circ Res.* 1985;56:262-78.
22. McCarthy J.V., Cotter T.G. Cell shrinkage and apoptosis: a role for potassium and sodium ion efflux. *Cell Death and Different.* 1997;4:756-70.
23. Redondo J, Pacheco ME, Manso AM, Salaiques M, Marin J. Cell volume and ionic transport systems after cold preservation of coronary endothelial cells. *Ann Thorac Surg.* 2001;71:1290-5.
24. Lang F, Ritter M, Gamper N, Huber S, Fillon S, Tanneur V, et al. Cell volume in the regulation of cell proliferation and apoptotic cell death. *Cell Physiol Biochem.* 2000;10:417-28.
25. 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.
26. Okada Y, Maeno E, Shimizu T, Dezaki K, Wang J, Morishima S. Receptor-mediated control of regulatory volume decrease (RVD) and apoptotic volume decrease (AVD). *J Physiol.* 2001;532(1):3-16.
27. Yu SP, Choi DW. Ions, cell volume, and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;97(17):9360-2.
28. Lang F. Mechanisms and significance of cell volume regulation. *J Am Coll Nutr.* 2007 Oct;26(5):613-623.
29. Lang F, Uhlemann AC, Lepple-Wienhues A, Szabo I, Siemen D, Nilius B, et al. Cell volume regulatory mechanisms in apoptotic cell death. *Herz.* 1999;24(3):232-5.
30. Wyllie AH. Apoptosis: cell death in tissue. *Reg J Path.* 1987;153(3):313-6.
31. Bortner CD, Cidlowski JA. Caspase independent/dependent regulation of K⁺, cell shrinkage, and mitochondrial membrane potential during lymphocyte apoptosis. *J Biol Chem.* 1999;274:21953-62.
32. Gomez-Angelats M, Bortner CD, Cidlowski JA. Cell volume regulation in immune cell apoptosis. *Cell Tissue Res.* 2000;301:33-42.
33. Xiao AY, Wei L, Xia S, Rothman S, Yu SP. Ionic mechanism of ouabain-induced concurrent apoptosis and necrosis in individual cultured cortical neurons. *J Neurosci.* 2002;22(4):1350-62.
34. Ekhterae D, Platoshyn O, Zhang S, Remillard CV, Yuan JX-J. Apoptosis repressor with caspase domain inhibits cardiomyocyte apoptosis by reducing K currents. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2003;284:1405-10.
35. Lionetto MG, Giordano ME, Calisi A, Caricato R, Hoffmann E, Schettino T. Role of BK channels in the apoptotic volume decrease in native eel intestinal cells. *Cell Physiol Biochem.* 2010;25(6):733-44.
36. Perez GI, Maravei DV, Trbovich AM, Cidlowski JA, Tilly JL, Hughes FM. Identification of potassium-dependent and -independent components of the apoptotic machinery in mouse ovarian germ cells and granulosa cells. – *Biol Reprod.* 2000;63:1358-69.

Ин-т проблем криобіології і кріомедицини НАН України, Харків
E-mail: tischenko.kh@gmail.com, vvkiroshka@mail.ru

Матеріал надійшов до редакції 24.03.2014