

УДК 615.361.014.41:618.11-008.6

© Колектив авторів, 2011.

МЕТОДИКА ІМПЛАНТАЦІЇ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ ФОЛКУЛЯРНИХ КЛІТИН ТА ФРАГМЕНТІВ ЯЄЧНИКА ЛЮДИНИ ПРИ ЛІКУВАННІ ОВАРІАЛЬНОЇ ГІПОФУНКЦІЇ

Л. Г. Дьоміна, О. С. Прокопюк, В. Є. Чадаєв, Н. Н. Чуб, І. В. Добрунова

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (директор – академик НАН України А. М. Гольцев), м. Харків.

METHOD OF IMPLANTATION CRYOPRESERVED OF FOLLICULAR CELLS AND FRAGMENTS OF OVARY OF WOMEN AT TREATMENT OF OVARY HYPOFUNCTION

L. G. Demina, O. S. Prokopjuk, V. E. Chadayev, N. N. Tchoob, I. V. Dobrunova

SUMMARY

The method of implantation of cryopreserved of granulosa and cumulus cells and fragments of ovary of women at the amniotic shell with the purpose of application them in clinical practice at treatment of ovarian hypofunction was developed.

МЕТОДИКА ИМПЛАНТАЦИИ КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ ФОЛЛИКУЛЯРНЫХ КЛЕТОК И ФРАГМЕНТОВ ЯИЧНИКА ЧЕЛОВЕКА ПРИ ЛЕЧЕНИИ ОВАРИАЛЬНОЙ ГИПОФУНКЦИИ

Л. Г. Дёмина, О. С. Прокопюк, В. Е. Чадаев, Н. Н. Чуб, И. В. Добрунова

РЕЗЮМЕ

Была разработана методика имплантации криоконсервированных клеток гранулезы и кумулюса и фрагментов яичника человека в амниотической оболочке с целью применения их в клинической практике при лечении овариальной гипопункции.

Ключові слова: імплантація, яєчник, клітини гранульози та кумулюсу, кріоконсервування.

Сучасний техногенний вплив та екологічна ситуація характеризуються із збільшенням у населення ендокринної патології та значними порушеннями в репродуктивній системі. Зміни, які відбуваються в організмі жінки внаслідок зниження або виключення функції яєчників, призводять до безпліддя, невиношування вагітності, остеопорозу та інших хвороб.

Медикаментозні схеми лікування овариальної гіпофункції містять в собі замісну гормонотерапію, препарати кальцію, кардіотонічні, гіпотензивні засоби, психостимулятори, поєднані з психо- і фізіотерапією. Однак не завжди можливо використання зазначеного лікування через тривалі курси терапії, побічні реакції на гормони, наявність протипоказань, високу вартість ліків та ін. У зв'язку з цим, сучасна медицина має тенденції до впровадження альтернативних методів лікування, зокрема тканинної терапії. Так, імплантація овариальної тканини, клітин гранульози та кумулюсу стала новим, перспективним засобом корекції овариальної недостатності і системних порушень, пов'язаних з даною патологією. Крім того, було показано, що небажаний побічний ефект лікування злоякісних захворювань може бути подоланий за допомогою кріоконсервування аутологічної овариальної тканини до проведення хіміо-радіотерапії з послідуною трансплантацією її під час ремісії. Тому, процедура аутопересадки не має обмежень, ефективна й не дуже коштовна.

Засновником досліджень по пересадці яєчників вважають Роберта Моррісона, який в 1895 році провів аутопластичну трансплантацію цих органів крільчій після кастрації, і виявив, що яєчники зберігали свою структуру впродовж тривалого часу дослідження. В Росії подібні операції проводив В.Г. Григор'єв в 1897 р. Після приживлення аутотрансплантованих яєчників у людини спостерігали їх функціонування, включаючи овуляцію, відсутність маточної атрофії та продукцію гормонів [1, 3].

Але, незважаючи на позитивні результати, терапевтичне використання овариальної тканини не знайшло поширеного застосування в клінічній практиці через відсутність надійних методів її довгострокового зберігання, що є обов'язковою умовою для всебічного обстеження і безпеки трансплантаційного матеріалу та створення банку зразків для клініки. Вирішенням цієї проблеми є кріоконсервування і довгострокове зберігання овариальної тканини та клітин гранульози та кумулюсу [2, 4, 5, 6].

Мета роботи – розробка техніки імплантації кріоконсервованих клітин і фрагментів яєчника людини у амніотичних оболонках при овариальній гіпофункції.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Матеріалом для отримання кріоконсервованих овариальних фрагментів (КОФ) були інтраопераційно видалені фрагменти яєчників у пацієнток від 20 до

55 років відповідно до медичних показань. Клітини гранулози та кумулюсу (КГК) отримували з преовуляторних фолікулів яєчників жінок (25-35 років), що проходили курс лікування в медичних центрах з приводу безпліддя при проведенні програми запліднення ЗІВ, з їх поінформованої письмової згоди. Після аспірації та поміщення ооцит-кумуляного комплексу в умови культивування фолікулярну рідину (ФР) з КГК збирали у стерильні пластикові пробірки та впродовж 1-2 годин транспортували на льоді в Інститут проблем кріобіології і кріомедицини (ІПК і К) НАН України. Видалені оваріальні фрагменти або КГК переносили в ємність з живильним розчином, що містить антибіотик. В умовах ламінарного боксу оваріальні фрагменти відмивали від ФР і клітин крові, подрібнювали (1x1x3-5 мм), розміщували по 6-7 фрагментів в охолоджене середовище кріоконсервування (СК). У роботі використали розчини 10% диметилсульфоксиду (ДМСО) та 10% поліетиленоксиду з молекулярною масою 400 (ПЕО-400), а також двохкомпонентне кріозахисне середовище, що складалось з 5% ДМСО та 5% ПЕО-400, які готували на розчині Хенкса. Час експозиції фрагментів з СК становив 15-30 хв. Після інкубації фрагменти тканини поміщали в поліетиленові ампули (1 мл), герметизували, маркували та кріоконсервували, використовуючи повільну програму охолодження. На першому етапі біооб'єкт охолоджували зі швидкістю 1-2°C/хв. від кімнатної температури до початку кристалізації у зразку, після чого проводили напівавтоматичний сидінг протягом 5 хв. На другому етапі швидкість охолодження становила 10°C/хв. до -45-50°C, потім ампули занурювали у рідкий азот і зберігали при -196°C. Кріоконсервування проводили на програмному заморозувачі (ЗП-10), виготовленому СКТБ ІПК і К НАН України. Розморожували ампули зі зразками на водяній бані при температурі 38-40°C до фази вода-лід.

Морфологічну збереженість КОФ оцінювали в гістологічних препаратах з забарвленням гематоксилін-еозін та при культивуванні [6]. Придатність фрагментів яєчників для використання є відсутність в зразках та в анамнезі пацієнтки-донора сифілісу, туберкульозу, гепатитів В і С, ВІЛ-інфекції, злоякісних процесів будь-якої локалізації або попередні операції на яєчниках.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ІХ ОБГОВОРЕННЯ

Показанням до клінічного застосування КОФ є зниження або відсутність функції яєчників, екстирпація яєчників. КОФ не призначали пацієнткам молодше 14 років і старше, ніж 55 років, а також при наявності гострих запальних процесів, злоякісних пухлин. Всі маніпуляції по клінічному використанню КОФ проводили із дотриманням вимог асептики і антисептики. Для безпосереднього застосування КОФ використо-

ували медико-імунологічний препарат Платекс-амніотичний (ПА). Після відтаювання КОФ і ПА перенесли в чашку Петрі. По 4 КОФ загортали в ПА та фіксували кетгуттом. Препарати імплантували гетеротопічно в підшкірну клітковину в ділянку верхньозовнішнього квадранта сідниці. Після обробки шкіри 70% спиртом і 5% йодом, під місцевою інфільтраційною анестезією 10 мл – 0,5% новокаїну (після проби на алергію) виконували розріз шкіри до 3 см. Латерально від розрізу робили 2 підшкірні кишені (3x3 см). В одній кишені розташовували 4 КОФ в ПА, в другій – 4 КОФ без ПА. Рану ушивали та накладали асептичну пов'язку. Перев'язки робили через добу.

В результаті дослідження було виявлено, що структурно КОФ зберігали специфічну архітектуру тканини. Застосування напівпроникних мембран з метою зниження імунологічного конфлікту дозволило досягти значних результатів при трансплантації аlogenної кріоконсервованої оваріальної тканини [4, 5].

Таким чином, є підстави вважати, що кріоконсервування оваріальної тканини й КГК та методи їх трансплантації отримують широку наукову і суспільну увагу через потенційну можливість їх використання для забезпечення ендокринного, репродуктивного та генетичного здоров'я жінки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Використання ауто трансплантації оваріальної тканини у лікуванні посткастраційного синдрому / Д. В. Салтовский, О. С. Прокопюк, В. В. Лазуренко [и др.] // Трансплантология. – 2003. – Т. 4, № 1. – С. 186–188.
2. Добрунова И. В. Культивирование клеток гранулезы и кумулюса после гипотермического хранения / И. В. Добрунова, Н. Н. Чуб, М. П. Петрушко // Проблемы кробиологии. – 2008. – Т. 18, № 1. – С. 98–100.
3. Свободная гомотрансплантация яичников в биологических полупроницаемых мембранах / Г. М. Грязнова, В. И. Лопухин, Г. Г. Моломина [и др.] // Акушерство и гинекология. – 1972. – № 8. – С. 18–22.
4. Создание банка кроеконсервированной овариальной ткани человека для аллогенных трансплантаций в акушерско-гинекологической практике / В. И. Грищенко, Л. Г. Демина, В. Е. Чадаев [и др.] // Кробиология. – 1987. – № 3. – С. 7–12.
5. Чадаев В. Е. Аллотрансплантация кроеконсервированной овариальной ткани в амниотической оболочке как метод коррекции при эндокринном бесплодии : автореф. дис. на соиск. науч. степени канд. мед. наук : спец. 14.01.01 “Акушерство и гинекология” / В. Е. Чадаев. – Харьков, 1988. – 23 с.
6. Akar M. Restoration of ovarian endocrine function by ovarian transplantation / M. Akar, K. Oktay // Trends in Endocrinology and Metabolism. – 2005. – Vol. 16, № 8. – P. 23–25.