

Влияние субнижких температур на морфофункциональную сохранность овариальной ткани человека

В.И.Грищенко¹, Н.Н.Чуб¹, Л.Г.Демина², П.Тодоров³

¹Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

²Харьковский государственный медицинский университет

³Институт биологии и иммунологии размножения, г. София, Болгария

Клиническое применение овариальной ткани человека с целью немедикаментозного лечения аменореи, бесплодия, гипоменструального, посткастрационного и патологического климактерического синдромов возможно лишь при наличии запасов всесторонне обследованного трансплантационного материала. Исследования, проведенные на животных, показали принципиальную возможность длительного хранения овариальной ткани при сверхнизких температурах.

Целью данного исследования являлось изучение влияния низкотемпературного консервирования на структуру овариальной ткани человека и способность к восстановлению ее функциональных свойств в органотипической культуре.

Материалом исследования служили яичники женщин в возрасте 30-50 лет, оперированных по поводу фибромиомы матки. Овариальную ткань трижды промывали в среде Хенкса с антибиотиками и разрезали на фрагменты (1×1×3-4мм). В качестве криозащитной среды использовали 0,3 моль/л раствор полиэтиленоксида м.м. 400 (ПЭО-400). После 30-минутной эквilibрации при комнатной температуре с ПЭО-400 фрагменты яичника помещали в 1мл полиэтиленовые ампулы, герметизировали, маркировали и замораживали на установке УОП-2, разработанной в ИПКиК НАН Украины. На 1-м этапе охлаждение проводили со скоростью 1°С/мин до точки кристаллизации, затем – изотермическая выдержка на плато кристаллизации в течение 10 мин, на 2 этапе скорость охлаждения составляла 10°С/мин до –40°С с последующим погружением образцов в жидкий азот для длительного хранения. Отогрев проводили в течение 3-5 мин на водяной бане при 40-42°С/мин до 0°С. Морфологическую целостность деконсервированной ткани исследовали на препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином, пролиферативную способность клеток оценивали в органотипической культуре в среде RPMI-1640 с добавлением сыворотки крови АВ(У). Оценку препаратов культуры проводили на 3, 6, 9 и 12-е сутки. Секрецию эстрадиола и

прогестерона в культуральной жидкости определяли радиоиммунологическим методом.

При анализе гистологических срезов было отмечено, что после замораживания-оттаивания ткань яичника сохраняла характерную архитектуру, многоклеточные тяжи и волокна окружали примордиальные и незрелые фолликулы и сосуды, создавая “вихревой”, характерный для яичниковой ткани, рисунок. Разобщенность клеток и увеличение межклеточного пространства отмечали преимущественно в центральных областях препаратов. При органотипическом культивировании после более длительного латентного периода (2-3 суток) деконсервированные эксплантаты яичника сохраняли жизнеспособность, о чем свидетельствовала адгезия их к субстрату, миграция клеточных элементов по фильтру и в дальнейшем формирование зоны роста вокруг “материнского” фрагмента ткани. Наряду с миграцией наблюдали деление клеток, митозы, клетки на стадии телофазы. По истечении 12 суток процесс роста и развития культуры замедлялся, и в большей части периферических клеток возникали явления неспецифической дегенерации. Регрессивные изменения в клетках, прежде всего, проявлялись в ядре, которое приобретало более четкие очертания, пикнотизировалось. Пик секреции стероидных гормонов приходился на 6-8-е сутки культивирования нативных и криоконсервированных образцов.

Таким образом, разработанный метод криоконсервирования позволяет сохранять морфофункциональные характеристики овариальной ткани человека и может быть использован для создания низкотемпературного банка с целью дальнейшего применения в клинической практике при лечении эндокринопатии различного генеза у женщин.

Адрес для корреспонденции: Грищенко В.И., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-41-43, факс: +38 (057) 373-30-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua