

УДК 611.651.15.08:616-089.843:541.1

Е.А. Мединец, В.В. Кирошка, Ю.О. Тищенко, Т.П. Бондаренко

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

АНАЛИЗ МОРФОЛОГИИ ТРАНСПЛАНТАТОВ ОВАРИАЛЬНОЙ ТКАНИ ПОСЛЕ ГИПОТЕРМИЧЕСКОГО ХРАНЕНИЯ

Проведен сравнительный анализ изменения морфологических характеристик фрагментов и трансплантатов овариальной ткани в условиях гипотермического хранения в электролитных и неэлектролитных средах. Установлено, что при 24-часовом гипотермическом хранении в электролитных средах сохраняется морфологическая структура фрагментов овариальной ткани, а также наблюдается высокий уровень жизнеспособных фолликулов после их трансплантации.

Ключевые слова: гипотермическое хранение, овариальная ткань, электролит, неэлектролит, трансплантация.

В настоящее время клеточная и тканевая трансплантология является одним из методов коррекции различных заболеваний, в том числе и эндокринных. В современной медицине трансплантация овариальной ткани применяется для восстановления эндокринной и репродуктивной функций у женщин детородного возраста при патологиях яичников различного генеза, а также после курсов химио- и радиотерапии [1]. При этом одной из основных задач остается разработка оптимальных методов хранения ткани яичников в целях увеличения пула жизнеспособных фолликулов в трансплантационном материале. Особенно это актуально в случаях, когда время транспортировки материала довольно продолжительное (до 24 часов), что является критическим для жизнеспособности ткани, поскольку фолликулы подвержены воздействию ишемии [2]. В настоящее время для хранения овариальной ткани в основном используются такие среды, как физиологический раствор (для хранения яичников крупного рогатого скота, коз, овец [3] и собак [4]), среда 199 (для коров, коз и овец), фосфатно-солевой буфер — PBS (для собак) [5]. В [6] показано, что при гипотермическом хранении (+4 °С) наблюдается увеличение количества жизнеспособных фолликулов по сравнению с их количеством при нормотермическом хранении (+37 °С).

Однако несмотря на достигнутые успехи в этой области метод хранения овариальной ткани до сих пор не является оптимальным.

Это связано с тем, что овариальная ткань представлена комплексом разных типов клеток, которые неоднородно распределены в объеме ткани, а также содержит фолликулы разных стадий фолликулогенеза.

В связи с изложенным целью данной работы явился сравнительный анализ морфологических характеристик трансплантатов овариальной ткани в зависимости от электролитного состава среды гипотермического хранения (ГХ).

Материал и методы. Объектом исследования служили фрагменты овариальной ткани половозрелых крыс линии Вистар, которые содержались в стандартных условиях вивария ИПКиК НАН Украины. Содержание и использование лабораторных животных соответствовало положениям «Европейской конвенции защиты позвоночных животных, которые используются с экспериментальной и иной научной целью» (г. Страсбург, 1985) и общепринятым Национальным нормам биоэтики [7]. Для получения фрагментов овариальной ткани в процессе овариоэктомии крыс выделяли яичники, которые фрагментировали (0,5–1 мм³) в чашке Петри в физиологическом растворе, содержащем пенициллин и стрептомицин (100 ед на 100 мл). После этого для ГХ данные фрагменты помещали в инкубационные среды различного состава: среда 1 – 250 мМ маннита, 10 мМ NaCl, 20 мМ KCl, 20 мМ фосфатного буфера при pH=7; среда 2 – 130 мМ NaCl, 20 мМ KCl, 20 мМ фосфатного буфера при pH=7,4. ГХ осуществляли

© Е.А. Мединец, В.В. Кирошка, Ю.О. Тищенко, Т.П. Бондаренко, 2011

в холодильной камере при температуре +4 °С. Время ГХ составляло 1 и 5 суток. Для морфологических исследований осуществляли фиксацию фрагментов овариальной ткани после ГХ 2 % раствором глутарового альдегида на 150 мМ фосфатном буфере. Готовили полутонкие срезы по стандартной методике [8].

Жизнеспособность овариальной ткани после ГХ изучали методом гетеротопической трансплантации. Для проведения экспериментальной работы животные были разделены на следующие группы: группа 1 — контрольная (животные с трансплантатами половозрелой овариальной ткани), группа 2 — животные с трансплантатами половозрелой овариальной ткани после ГХ в неэлектролитной среде (раствор 1), группа 3 — с трансплантатами половозрелой овариальной ткани после ГХ в электролитной среде (раствор 2). Трансплантацию овариальной ткани во всех группах осуществляли одновременно с двухсторонней овариоэктомией. Операции животным проводили в стерильных условиях под комбинированным наркозом (0,1 мг кетамина, 0,25 мг ксилазина на 100 г массы тела животного). Сайтом гетеротопической трансплантации служила капсула левой почки. Время проведения трансплантации составляло 20 мин.

Для анализа морфологии трансплантатов половозрелой овариальной ткани на 30-е сутки после трансплантации проводили эвтаназию животных эфирным наркозом. Для морфологических исследований выделяли почку с трансплантатом. Производили их фиксацию в 10 % растворе формалина в течение 48 часов, дегидратировали и заключали в парафиновые блоки [9]. С каждого образца делали серийные срезы всего трансплантата толщиной 10 мкм. Каждый третий срез окрашивали гематоксилин-эозином. Анализировали гистологические срезы, изучая только фолликулы с видимым ядром для исключения повторного счета одного и того же фолликула в анализируемом срезе. Развитие овариальной ткани после трансплантации оценивали по изменению его объема (длина × ширина × толщина × 0,523) [10].

Идентифицировали стадии развития фолликулов согласно классификации К. Октау [11], модифицированной по Gougeon [12]: примордиальный — ооцит окружен одним слоем уплощенных гранулезных клеток; первичный — ооцит окружен одиночным слоем кубических клеток гранулезы; преантральный — ооцит окружен более

чем двумя слоями гранулезных клеток, расположенных на базальной мембране, вокруг которой находятся единичные тека-клетки; антральный — ооцит увеличен в объеме, окружен несколькими слоями гранулезных клеток, формируется полость, содержащая фолликулярную жидкость.

Исследование полутонких и гистологических препаратов осуществляли с помощью светового микроскопа при увеличениях объектива ×20 и ×40. Микрофотосъемку осуществляли с помощью микроскопа Carl Zeiss Axio Observer Z1 и пакета прикладных программ для обработки изображения.

Результаты и их обсуждение. Данные об изменении структуры фолликулов при ГХ в средах различного электролитного состава представлены на рис. 1. В норме (рис. 1, а) фолликулы имеют круглый или сферический ооцит с крупным ядром круглой или цилиндрической формы. К ооциту плотно прилегают организованные между собой клетки гранулезы (рис. 1, а). Видно (рис. 1, б), что после 24 часов ГХ в неэлектролитной среде наблюдаются начальные этапы сжатия ооцита, что проявляется в изменении формы ядра ооцита. При этом отмечается также сжатие клеток гранулезы, которые уже менее плотно прилегают к ооциту и разобщены между собой. При ГХ в электролитной среде фолликулы сохраняют четко очерченную форму. При этом наблюдаются округлые ооциты с плотно прилегающими клетками гранулезы (рис. 1, в).

При увеличении сроков ГХ до 5 суток наблюдается дальнейшая динамика структуры овариальной ткани. Так, в неэлектролитных средах происходит деформация ооцита до «грибовидной» формы, дезорганизация клеток гранулезы, что проявляется в их разобщении между собой (рис. 1, в). В электролитных средах (рис. 1, д) отмечается набухание фолликулов, увеличение межклеточного пространства между клетками гранулезы и теки. При этом мембрана ооцита не имеет четко выраженных границ.

Для выявления обратимости наблюдаемых нами морфологических изменений, а также степени сохранения жизнеспособности фолликулов мы считали целесообразным трансплантировать овариоэктомизированным животным фрагменты овариальной ткани после 24 часов ГХ в различных средах. В трансплантатах овариальной ткани у животных всех исследованных групп имеют место фолликулы различной степени зрелости (рис. 2). Следует отметить, что в отли-

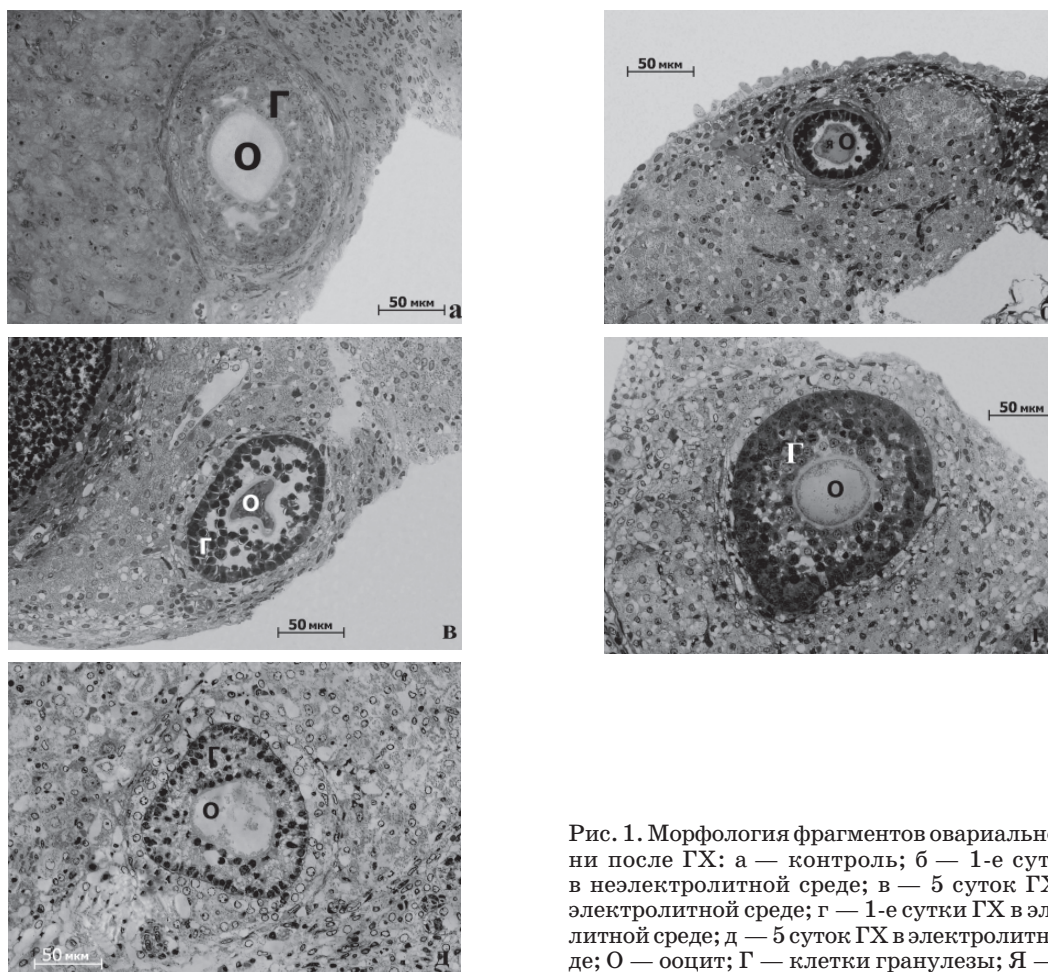


Рис. 1. Морфология фрагментов овариальной ткани после ГХ: а — контроль; б — 1-е сутки ГХ в неэлектролитной среде; в — 5 суток ГХ в неэлектролитной среде; г — 1-е сутки ГХ в электролитной среде; д — 5 суток ГХ в электролитной среде; О — ооцит; Г — клетки гранулезы; Я — ядро

чие от контрольной группы трансплантаты овариальной ткани у животных групп 2 и 3 имеют зональный характер, который может свидетельствовать о повреждении поверхностного слоя фрагментов овариальной ткани при ГХ.

Помимо этого у животных группы 2 (рис. 2, б) наблюдается фиброз около 5–10 % ткани трансплантата, что, очевидно, связано с меньшей степенью сохранности клеток овариальной ткани при ГХ в неэлектролитных средах. При этом количество созревающих фолликулов в трансплантатах у животных группы 2 значительно ниже, чем у животных групп 1 и 3 (таблица).

Сравнительный анализ фолликулярной плотности в трансплантатах овариальной ткани показал, что количество фолликулов на единицу объема в трансплантатах у животных группы 3 сравнимо с контрольной группой, тогда как у животных группы 2 этот показатель достоверно снижался (рис. 3).

Экспериментальные данные, приведенные в этой работе, однозначно указывают на

то, что изменение структуры овариальной ткани и дальнейшее функционирование трансплантата зависит от электролитного состава среды инкубации в условиях ГХ. Видно (рис. 1), что в неэлектролитных средах наблюдается сжатие ооцитов и дегидратация клеток гранулезы в первые 24 часа ГХ, тогда как при инкубации овариальной ткани в электролитных средах не происходит изменения структуры фолликулов в данный временной период ГХ. При увеличении сроков ГХ до 5 суток выявляются качественные отличия изменения морфологии овариальной ткани (рис. 1). Следовательно, можно предположить, что одним из основных механизмов повреждения овариальной ткани в условиях ГХ является нарушение ионной проницаемости ооцита, а также клеток гранулезы и теки. Трансплантация овариоэктомированным животным фрагментов овариальной ткани через 24 часа после ГХ (рис. 2) приводила к развитию морфологических структур, соответствующих физиологической норме, при использо-

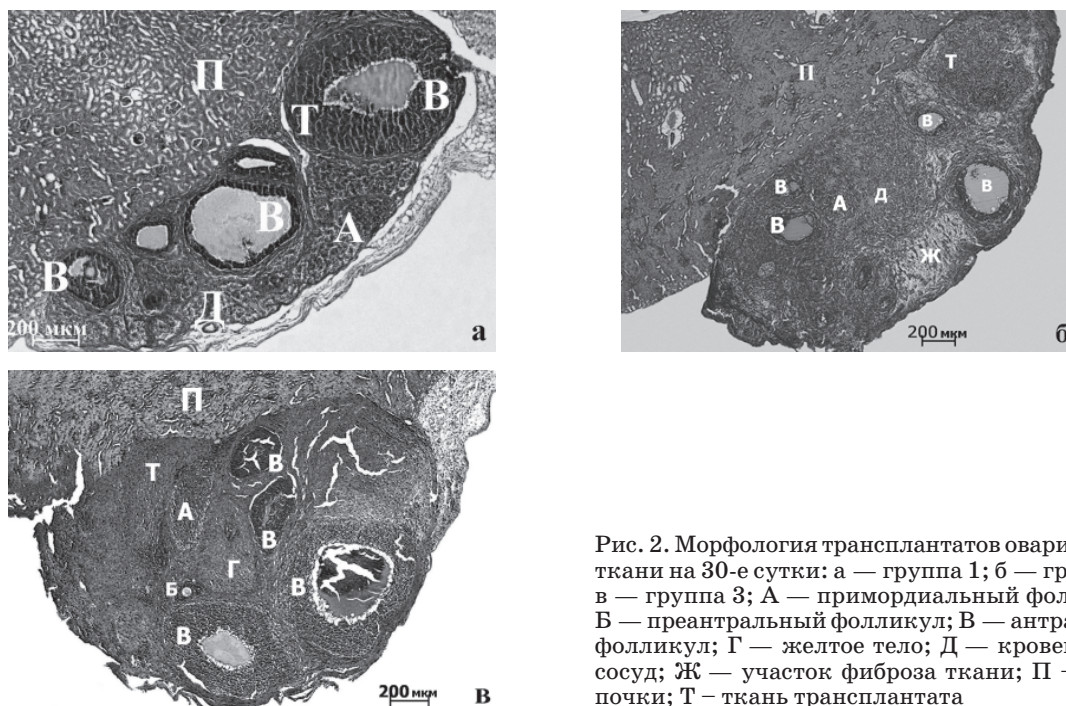


Рис. 2. Морфология трансплантатов овариальной ткани на 30-е сутки: а — группа 1; б — группа 2; в — группа 3; А — примордиальный фолликул; Б — преантральный фолликул; В — антральный фолликул; Г — желтое тело; Д — кровеносный сосуд; Ж — участок фиброза ткани; П — ткань почки; Т — ткань трансплантата

Объем и количество фолликулов различной степени зрелости в трансплантатах овариальной ткани

Группа	Объем трансплантата, мм ³	Количество фолликулов			
		всего	примордиальные	преантральные	антральные
1	12,55±2,80	616±89	605±87	5±2	5±2
2	13,0±2,6	497±312	490±167	3,5±2,1	2,3±0,6
3	18,04±3,30	657±110	648±110	4,7±2,5	4,3±0,6

Кол-во фол-лов на 1 мм³

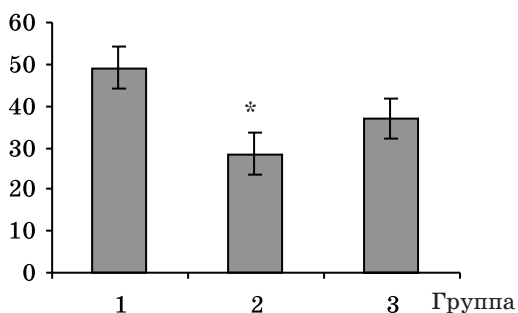


Рис. 3. Фолликулярная плотность в трансплантатах овариальной ткани: * $p < 0,05$ относительно контроля

вании как неэлектролитной, так и электролитной среды инкубации. Однако следует отметить, что фолликулярная плотность в трансплантатах овариальной ткани, подвергнутой ГХ в неэлектролитных средах, практически в 2 раза ниже, чем в контрольной группе (рис. 2). Следовательно, эти данные подтверждают тот факт, что неэлектро-

литная среда инкубации оказывает более выраженное повреждающее действие на овариальную ткань в процессе ГХ, чем электролитная. Это, по всей видимости, связано с необратимым повреждением значительного количества клеток гранулезы в первые сутки ГХ в неэлектролитной среде (рис. 1), что обусловлено нарушением проницаемости плазматической мембраны (выход ионов K^+), изменением величины трансмембранного потенциала [13] и функционированием ионных каналов. В [14] на культуре гранулезных клеток показано, что электрофизиологические свойства клеток овариальной ткани определяются молекулярной структурой таких ионных каналов, как K^+ , Ca^{2+} и Cl^- , которые, в свою очередь, направленно регулируются стероидными гормонами. Следовательно, можно предположить, что при ГХ овариальной ткани в неэлектролитных средах происходит нарушение проницаемости мембраны, связанное с изменением мембранного потенциала этих

клеток [13], що внаслідок викликає порушення їх гормонпродуцуючої функції, приводящої до гормональному дисба-

лансу, а також зменшенню розвиваючих фолликулів в трансплантованій овариальній тканині.

Список літератури

1. Orthotopic and heterotopic autografts of frozen-thawed ovarian cortex in cheap / Y. Aubard, P. Piver, Y. Cognle [et al.] // Hum. Reprod. — 1999. — V. 14. — P. 2149–2154.
2. Short-term preservation of canine preantral follicles: effects of temperature, medium and time / C. A. Lopesa, R. R. Santos, J. J. Celestino [et al.] // Animal Reprod. Science. — 2009. — V. 115. — P. 201–214.
3. Effects of lowered temperatures and media on short-term preservation of zebu (*Bos indicus*) preantral ovarian follicles / C. M. Lucci, M. A. Kacinski, R. Rump, S. N. Bao // Theriogenology. — 2004. — V. 61. — P. 461–472.
4. Preservation of goat preantral follicles enclosed in ovarian tissue in saline or TCM 199 solutions / S. H. Costa, E. R. Andrade, J. R. Silva [et al.] // Small Ruminant Research. — 2005. — V. 58. — P. 189–193.
5. Short term maintenance of sheep preantral follicles in situ in 0,9 % saline and Braun-Collins solution / E. R. Andrade, P. R. Rodrigues, C. A. Amorim [et al.] // Small Ruminant Research. — 2001. — V. 41. — P. 141–149.
6. Short-term storage of canine preantral ovarian follicles using a powdered coconut water (ACP)-based medium / G. L. Lima, L. L. Costa, D. M. Cavalcanti [et al.] // Theriogenology. — 2010. — V. 74. — P. 146–152.
7. Protocol of amendment to the european convention for the protection of vertebrate animals used for the experimentation and other scientific purposes. — Strasbourg, 1998.
8. Уикли Б. Електронна мікроскопія для починаючих / Б. Уикли. — М.: Мир, 1975. — 324 с.
9. Лилли Р. Патогістологічна техніка і практична гістохімія / Р. Лилли. — М., 1969. — 645 с.
10. Татарчук Т. Ф. Ендокринна гінекологія (клінічнісні очерки) / Т. Ф. Татарчук, Я. П. Сольський. — К.: Заповіт, 2003. — 303 с.
11. Oktay K. Development of human primordial follicles to antral stages in SCID/hpg mice stimulated with follicle stimulating hormone / K. Oktay, H. Newton, J. Mullan // Hum. Reprod. — 1998. — V. 13, № 5. — P. 1133–1138.
12. Gougeon A. Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results / A. Gougeon // Hum. Reprod. — 1986. — №. 1. — P. 81–87.
13. Emery B. R. Hamster oocyte membrane potential and ion permeability vary with preantral cumulus cell attachment and developmental stage / B. R. Emery, R. L. Miller, D. T. Carrell // BMC Dev. Biol. — 2001. — V. 1, № 14.
14. Activation of Cl⁻ channels by human chorionic gonadotropin in luteinized granulosa cells of the human ovary modulates progesterone biosynthesis / P. Olivero, E. Leiva-Salcedo, L. Devoto, A. Stutzin // Endocrinology. — 2008. — V. 149, № 9. — P. 4680–4687.

К.О. Мединець, В.В. Кірошка, Ю.О. Тищенко, Т.П. Бондаренко

АНАЛІЗ МОРФОЛОГІЇ ТРАНСПЛАНТАТІВ ОВАРІАЛЬНОЇ ТКАНИНИ ПІСЛЯ ГІПОТЕРМІЧНОГО ЗБЕРІГАННЯ

Проведено порівняльний аналіз зміни морфологічних характеристик фрагментів і трансплантатів овариальної тканини за умов гіпотермічного зберігання в електролітних та неелектролітних середовищах. Встановлено, що при 24-годинному гіпотермічному зберіганні в електролітних середовищах зберігається морфологічна структура фрагментів овариальної тканини, а також спостерігається високий рівень життєздатних фолікулів після їх трансплантації.

Ключові слова: гіпотермічне зберігання, овариальна тканина, електроліт, неелектроліт, трансплантація.

К.О. Medynets, V.V. Kiroshka, J.O. Tischenko, T.P. Bondarenko

MORPHOLOGY OF TRANSPLANT OVARIAN TISSUE AFTER HYPOTHERMIC STORAGE

The comparative analysis of changes in morphological characteristics of the fragments and transplant of the ovarian tissue under condition the hypothermic storage in the electrolyte and nonelectrolyte solutions was carried out. It was established, that at 24-hour hypothermic storage in electrolytic solutions was preserved morphological structure of the fragments of ovarian tissue as well as the high level of viability follicles after transplantation was found.

Key words: hypothermic storage, ovarian tissue, electrolyte, nonelectrolyte transplantation.