

Разработка и оптимизация метода криоконсервации овариальной ткани с целью сохранения репродуктивного здоровья у онкологических пациенток.

Актуальность исследования

Поиск путей эффективной ранней диагностики преждевременной недостаточности яичников (ПНЯ) и сохранения овариального резерва продолжает оставаться одной из самых актуальных задач современной медицины. Современные достижения в ранней диагностике и своевременном лечении заболеваний у женщин привели к значимому улучшению показателей выживаемости в течение последних двух десятилетий. Однако, имеется большое количество пациенток репродуктивного возраста с преждевременной недостаточностью функции яичников. Целью настоящего междисциплинарного проекта является разработка методов сохранения овариального резерва при помощи трансплантации криоконсервированной овариальной ткани. В связи с этим, увеличение числа молодых пациенток, излечившихся от основного онкологического заболевания, является главным стимулом для развития и совершенствования современных технологий сохранения фертильности. Одним из эффективных методов сохранения фертильности является трансплантация криоконсервированной овариальной ткани.

Научная платформа

Репродуктивное здоровье

Планируемый (ые) научные подразделения исполнители (с указанием руководителя исследования)

Руководитель исследования - Комличенко Эдуард Владимирович – д.м.н., директор клиники Института перинатологии и педиатрии «СЗФМИЦ им. В.А. Алмазова»

Исполнители:

Институт перинатологии и педиатрии

НИЛ оперативной гинекологии

НИЛ репродуктивных технологий

Институт молекулярной кардиологии и генетики

НИЛ молекулярной кардиологии

Центр доклинических трансляционных исследований

Ключевые слова

Аутотрансплантация криоконсервированной овариальной ткани, онкофертильность, методы сохранения фертильности, стандартное медленное замораживание, витрификация ткани яичника.

Цель проекта

Сохранение овариального резерва у пациенток с онкологическими заболеваниями при помощи разработки и оптимизации метода ортотопической аутотрансплантации криоконсервированной овариальной ткани

Задачи проекта

1. Оценить жизнеспособность овариальных биоптатов, забранных во время лапароскопической овариоцистэктомии у пациенток с доброкачественными образованиями яичников до и после криоконсервации ткани.

2. Оптимизировать протоколы стандартного медленного замораживания овариальной ткани в культуре клеток («IVC - in vitro culture» model).
3. Оптимизировать протоколы витрификации ткани яичников в культуре клеток («IVC - in vitro culture» model).
4. Сравнить протоколы стандартного медленного замораживания овариальной ткани и витрификации ткани яичников в культуре клеток («IVC - in vitro culture» model) и выбрать наилучший криопротокол.
5. Изучить степень экспрессии генов тканевого ремоделирования и ангиогенеза в овариальном трансплантате до и после заморозки ткани.
6. Исследовать процесс фолликулогенеза при трансплантации размороженной человеческой овариальной ткани в перитонеальную полость иммунодефицитных мышей («Immunodeficient nu/nufemale Balb/C mice» model) с целью доказательства жизнеспособности ткани яичника после длительной криоконсервации.
7. Оценить гормональный статус пациенток с лимфомами Ходжкина до и после проведения гонадотоксичного лечения.
8. Разработать методику частичной декорткации ткани яичника у пациенток с лимфомами Ходжкина.
9. Создать научно-клиническую базу данных пациенток с диагнозом лимфома Ходжкина в программе Excel.

Ожидаемые результаты проекта

1. Морфологическая характеристика овариальных трансплантатов до и после криоконсервации.
2. Создание протоколов иммуногистохимической детекции маркеров, отвечающих за жизнеспособность овариальной ткани
3. Разработка протокола стандартного медленного замораживания овариальной ткани.
4. Разработка протокола витрификации ткани яичника.
5. Создание наиболее оптимального криопротокола для длительной консервации овариальных трансплантатов
6. Протокол методики детекции ДНК в препаратах срезов овариальной ткани для выявления степени экспрессии генов тканевого ремоделирования и ангиогенеза.
7. Создание протокола проведения экспериментального исследования на модели («Immunodeficient nu/nu female Balb/C mice» model).
8. Оценка гормонального статуса пациенток с лимфомами Ходжкина до и после проведения гонадотоксичного лечения (20 пациенток).
9. Разработка методики частичной декорткации ткани яичников у пациенток с лимфомами Ходжкина (20 пациенток)
10. Создание научно-клинической базы данных пациенток с диагнозом лимфома Ходжкина в программе Excel.

Назначение и предполагаемое использование (внедрение) результатов проекта

По итогам выполнения проекта ожидается получение важнейшего результата в виде разработки методов сохранения репродуктивного потенциала у пациенток с преждевременной недостаточностью функции яичников.

В ходе выполнения проекта будут использованы следующие методики: Биопсия овариальной ткани, патоморфологическая и иммуногистохимическая оценка биоптатов, отработка методики стандартного медленного замораживания овариальной ткани, выбор оптимального криопротектора, температурного режима заморозки, отработка методики размораживания овариальной ткани, культивирование ткани яичника In vitro и In vivo.

Необходимо отметить, что в современной мировой научной литературе подобные

материалы рассматриваются в качестве перспективных методик сохранения овариального резерва.

На следующем этапе работ будет разработана и оптимизирована методика витрификации овариальной ткани и оценка жизнеспособности овариального трансплантата после длительной заморозки в жидком азоте и последующей разморозки.

Имеющиеся предпосылки позволяют предполагать, что овариальная ткань после длительного хранения в жидком азоте, будет сохранять овариальный пул высокого качества, что приведет в дальнейшем к инициации фолликулогенеза в овариальном трансплантате после его трансплантации и, затем, к восстановлению овариального резерва в целом.

Возможными потребителями разрабатываемых способов сохранения овариального резерва будут пациентки с диагнозом преждевременная недостаточность функции яичников. Помимо значительного социального эффекта от применения результатов данного научного проекта, связанного с улучшением качества жизни данной когорты пациенток, разработка и внедрение результатов исследования будет сопровождаться существенным экономическим эффектом, связанным с уменьшением затрат на лечение и реабилитацию пациенток со сниженным овариальным резервом.

Результаты научных исследований будут сделаны общественным достоянием в соответствии с законодательством Российской Федерации-будут опубликованы в рецензируемых российских и зарубежных научных изданиях. Результаты работ по проекту будут опубликованы в изданиях,индексируемых в базах данных “Сеть науки” (Web of science) или “Скопус” (Scopus).

Описание предлагаемого научного исследования

Криоконсервация выполняется методом стандартной медленной заморозки. Аутотрансплантация криоконсервированной ткани яичника имеет уникальные преимущества по сравнению с другими методами сохранения фертильности.

Этот метод 1) не приводит к отсрочке противоопухолевой терапии; 2) безопасен при гормонально-зависимых онкологических заболеваниях; 3) может быть выполнен вне зависимости от дня менструального цикла; 4) является единственным вариантом сохранения фертильности у девочек в препубертатном периоде, 5) использование данного метода в клинической практике приводит к восстановлению эндокринной функции яичников, а также в последующем – и фертильности.

Планируется изучение генетических аспектов нарушения менструального цикла, связанного с недостаточностью овариального резерва для своевременного грамотного медико-генетического консультирования семьи и оценки рисков бесплодия.

Также будет изучена экспрессия генов тканевого ремоделирования и ангиогенеза в ткани яичника для оценки ее качества после хранения в жидком азоте. Следующим этапом планируется выполнить трансплантацию овариальных биоптатов в перитонеальную полость иммунодефицитных мышей с целью оценки инициации фолликулогенеза в пересаженном трансплантате, что будет являться прямым доказательством сохранения овариального резерва после длительного хранения овариальной ткани в жидком азоте.

Проект позволит выявить генетические механизмы развития ПНЯ, а также изучить возможность сохранения овариального резерва после трансплантации криоконсервированной ткани яичников. Предложенные методы реализации проекта обладают научной новизной в связи с тем, что данное направление недостаточно широко развито в России и прослеживается острая необходимость в дальнейшем внедрении полученных результатов в клиническую деятельность. Очевидно, что совершенствование методов сохранения овариального резерва с учетом индивидуальных особенностей протекания данной патологии, которому посвящен настоящий проект, продолжает оставаться актуальной медико-социальной задачей.

Описание научных подходов и методов, используемых для решения поставленных задач

В исследование впоследствии будут включены 30 пациенток с лимфомами, которым планируется выполнить:

- клинический анализ крови,
- биохимический анализ крови,
- коагулограмму,
- анализ крови на HBV, HCV, HIV, RW,
- анализ крови на ФСГ, ЛГ, эстрадиол, прогестерон, АМГ,
- общий анализ мочи,
- УЗИ органов малого таза трансвагинальным датчиком с AFC (с подсчетом количества антральных фолликулов),
- МРТ малого таза с контрастированием.

Перед выполнением операции будет оценен гормональный статус пациенток (ФСГ, ЛГ, эстрадиол, прогестерон, пролактин, АМГ и УЗИ органов малого таза с AFC). Частичная декорткация ткани яичника будет выполнена с использованием лапароскопической Кримоконсервации или витрификации будет подвержен лишь кортикальный слой яичника, так как он содержит до 90% пула примордиальных фолликулов. Таким образом, мы сохраняем овариальный резерв пациенток. Пациенткам, которым будет выполняться в последующем лучевая терапия, после получения образцов кортикального слоя яичников, будет выполнена транспозиция яичников для выведения их из зоны облучения малого таза. гематоксилином и эозином. Иммуногистохимическое исследование с антителами к HLA-DR-антигену гистосовместимости II класса, фенотипирование лимфоцитов и макрофагов с антителами к CD3, CD45, CD8, CD68; определение вирусной инфекции.

Иммуногистохимическое исследование (оценка качества фолликулов и жизнеспособности овариального трансплантата после размораживания) выполняется с использованием ИГХ с маркированными специфическими АТ:

- ☐ ki-67 - для оценки жизнеспособности и роста фолликулов
- ☐ PCNA – оценка пролиферативного клеточного потенциала
- ☐ caspase-3 – оценка апоптоза стромальных клеток
- ☐ метод Masson trichrome – для оценки очагов фиброза
- ☐ VEGF-A – оценка ангиогенеза
- ☐ AMH и GDF-9 - для оценки функции фолликулов

Критерии включения и пациентов:

- гистологически верифицированные лимфомы (ЛХ, НХЛ)
- недиссеминированные формы лимфом
- возраст: 18 - 35 лет
- отсутствие признаков ПНЯ
- отсутствие противопоказаний для выполнения лапароскопической операции
- отсутствие противопоказаний для анестезии
- отсутствие проведенной ранее противоопухолевой терапии
- высокий риск развития ПНЯ вследствие лечения по программам: BEACOPP, CHOP, CHIVPP, Hyper-CVAD, HSCT
- поддиафрагмальная лучевая терапия
- наличие обоих интактных яичников
- желание иметь детей в будущем.

Критерии невключения пациентов.

- а) Наличие тяжелой сопутствующей патологии, препятствующей выполнению хирургического вмешательства (осложнения сердечно-сосудистой системы, выраженная недостаточность функции печени и почек)

Научные методы:

- статистический анализ
- создание компьютерных баз данных
- математическое моделирование