

ВОЗМОЖНОСТИ ВОССТАНОВЛЕНИЯ РЕПРОДУКТИВНОЙ ФУНКЦИИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ ЗА СЧЕТ ТРАНСПЛАНТАЦИИ КРИОКОНСЕРВИРОВАННОЙ ТКАНИ ЯИЧНИКА

Е.В. Абакушина^{1,2}, Т. Отой², А.Д. Каприн³

¹ Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал Национального медицинского исследовательского радиологического центра, Обнинск, Россия

² Университет Ямагути, Ямагути, Япония

³ Национальный медицинский исследовательский радиологический центр, Обнинск, Россия

Recovery options of reproductive function of cancer patients due to transplantation of cryopreserved ovarian tissue

E.V. Abakushina^{1,2}, T. Otoi², A.D. Kaprin³

¹ A.F. Tsyb Medical Radiological Research Center – branch of the National Medical Research Radiological Centre, Obninsk, Russia

² Yamaguchi University, Yamaguchi, Japan

³ National Medical Research Radiological Centre, Obninsk, Russia

В последние годы увеличилась выживаемость онкологических больных, однако успехи в лечении нередко приводят к бесплодию у молодых пациентов. В случаях, когда нет возможности избежать токсического действия на репродуктивные органы – криоконсервация ткани яичника до начала лечения может помочь сохранить фертильность таких пациентов. Хорошо известно, что яичник млекопитающих содержит огромный запас покоящихся яйцеклеток. Большое количество этих незрелых фолликулов создает потенциальный источник зрелых яйцеклеток для оплодотворения. Для того чтобы использовать женские половые клетки из ткани яичников, очень важно сохранить эту ткань до того как ооциты начнут подвергаться дегенерации вследствие токсического лечения. Криоконсервация и трансплантация ткани яичников – два новых метода сохранения фертильности, особенно у молодых онкологических больных. Если эти техники будут внедрены в клиническую практику, они должны быть безопасными, легко воспроизводимыми и результативными. Успехи современной криобиологии дали возможность сохранения ткани яичников с минимальной потерей жизнеспособности. Если токсические воздействия химиолучевой терапии не удастся избежать, врачи должны знать о способах сохранения фертильности и предлагать их пациентам. Возможность иметь генетически родственного ребенка очень важна для пациентов, излеченных от рака.

Ключевые слова: онкологические больные, сохранение фертильности, криоконсервация ткани яичников, трансплантация ткани яичников.

Введение

Анализ структуры заболеваемости злокачественными новообразованиями за последние годы показал, что среди всех онкологических диагнозов около 8% приходится на пациентов моложе 40 лет, включая детей [1]. Только в США каждый год вновь выявляется почти 70 000 больных злокачественными новообразованиями в возрасте от 15 до 39 лет. [2]. В Российской Федерации ежегодно вновь выявляется более 400 тыс. случаев злокачественных опухолей, в том числе более половины – у пациентов женского пола и около 3 тыс. у детей [1]. Смертность от онкозаболеваний за последние 3 года снизилась, а ожидаемая продолжительность жизни увеличилась [1]. В основном это происходит благодаря развитию новых методов диагностики и лечения. Однако более 70% пациентов будут подвергаться комплексной химио- и лучевой терапии, которая может привести к бесплодию. Именно эти женщины и девочки должны

Cancer patients survive at increasing rates, but successful treatment in younger patients often leads to reduced fertility. If damage to reproductive organs from treatment is unavoidable, cryopreservation of ovarian tissue can protect fertility for young patients prior to treatment. Well known that the mammalian ovary contains a huge stock of resting oocytes. The large store of these small follicles creates a potential source of oocytes for fertilization. To utilize the potential female gametes stored in ovaries, it will be important to save ovarian tissue before oocytes undergo degeneration during treatment of cancer. Cryopreservation and transplantation of ovarian tissue are two emerging techniques for fertility preservation, especially in young cancer patients. If these technologies are to become widely accepted, they need to be safe, easy to perform and must obtain favorable result. Recent advances in cryobiology have made it possible to preserve ovarian tissue with relatively little loss of viability. If gonadal toxicity of chemo radiotherapy is unavoidable, physicians also should be knowledgeable about options for fertility preservation and offer patients a referral to a fertility specialist. The ability of having genetically related children is an important issue for patients surviving cancer.

Keywords: cancer patients, fertility preservation, cryopreservation of ovarian tissue, transplantation of ovarian tissue.

быть потенциальными кандидатами для сохранения репродуктивной функции.

По данным зарубежной литературы, одна из 250 женщин репродуктивного возраста ранее получала противоопухолевое лечение и сегодня около 90% из них с большой долей вероятности доживают до старости [3]. Однако в результате лечения также высока вероятность частичной или полной потери фертильности, вследствие высокой чувствительности ткани яичников к цитотоксическому противоопухолевому лечению [4–6], но большинство вылеченных женщин хотели бы иметь собственных детей в будущем [7, 8].

Существует несколько основных возможностей для сохранения репродуктивной функции онкологических больных женского пола: заморозка (криоконсервация) яйцеклеток, эмбрионов или ткани яичников [3, 9–11]. В нашей стране уже накоплен некоторый опыт криоконсервации гамет, эмбрионов

и ткани яичника онкологических больных [12–15]. Педиатрические пациенты могут не понимать всей серьезности проблемы и не ожидают побочных эффектов лечения, а сохранение репродуктивной функции также важно и для них. В силу своего возраста такие пациенты не могут воспользоваться услугами репродуктологов и вспомогательными репродуктивными технологиями (ВРТ) чтобы заморозить яйцеклетки или эмбрионы. Для них остается только одна возможность сохранения собственных гамет — криоконсервация ткани яичников (КТЯ) (фрагментов кортикального слоя, изолированных фолликулов или целого яичника) [6, 16, 17]. Основной целью этой стратегии является последующая аутотрансплантация ткани яичника (после разморозки) [18, 19].

Выбор метода сохранения наследственного материала у онкологических больных зависит от многих параметров: возраста пациента, типа опухоли, планируемого лечения и его продолжительности, а также от прогноза заболевания и наличия партнера.

Основной целью криоконсервации ткани яичников, ее последующей трансплантации, а также выращивания фолликулов *in vitro* является сохранение фертильности у женщин, сталкивающихся с нарушением репродуктивной функции или преждевременным истощением яичников. Хотя метод КТЯ появился относительно недавно, он охарактеризовал себя как легкий, быстрый и недорогой.

Имеются неоспоримые преимущества КТЯ по сравнению с криоконсервацией яйцеклеток или эмбрионов. Во-первых, ткань яичника может быть получена без промедления, так как нет никакой необходимости в стимуляции яичников для получения

зрелых яйцеклеток. Во-вторых, для данной процедуры не требуется наличие партнера у женщины. В-третьих, можно сохранить большое количество гамет (примордиальных фолликулов). В-четвертых, нет необходимости откладывать начало лечения.

Этот метод обладает преимуществами и в процессе восстановления репродуктивной и эндокринной функций, так как не требует гормональной терапии, а также применения иммунодепрессантов в процессе аутогенной трансплантации. Криоконсервация ткани яичников также является более надежной альтернативой заморозки яйцеклеток или эмбрионов, особенно для детей, страдающих онкологическими заболеваниями. Единственным недостатком замораживания ткани яичников является то, что процедура требует дополнительного хирургического вмешательства.

Эксплантация ткани яичников может производиться лапароскопически двумя разными способами. Первый способ — это удаление около 50% кортикального слоя одного яичника, второй способ — это множественные (5–10) биопсии кортикального слоя со средним размером биоптатов около 5 мм³. Следует избегать электрокоагуляции во время операции, которая приводит к деструкции фолликулов [20]. Альтернативным методом может служить овариэктомия. Однако ее можно рекомендовать только пациентам перед облучением малого таза, пересадкой костного мозга, высокодозной химиотерапией и в случае высокого риска повреждения яичников. Если шанс приобретения вторичной аменореи после лечения менее 50%, то рекомендована частичная овариэктомия.



Рис. 1. Стратегии криоконсервации ткани яичников и ее использования после разморозки

Методы криоконсервации ткани яичников и оценка жизнеспособности фолликулов после криоконсервации

Ткань яичника человека может быть успешно заморожена и разморожена. Это подтверждают многочисленные эксперименты по оценке жизнеспособности и восстановлению функций ткани яичников после разморозки. Все подобные работы, начиная с 1996 г., были обобщены в обзоре, когда был описан первый опыт КТЯ человека [21].

Стандартным методом КТЯ для человека является медленная заморозка с использованием среды с добавлением сывороточного альбумина, пропандиола (ПД), диметилсульфоксида (ДМСО) и этиленгликоля (ЭГ) как классических криопротекторов в различных сочетаниях и концентрациях. ПД, ДМСО и ЭГ способны проникать через мембраны ооцитов и клеток стромы, они обеспечивают защиту как внутри, так и вокруг клеток. Эти проникающие криопротекторы часто используют в комбинации с непроникающими, такими как сахароза, глицерин или сывороточный альбумин человека [21–24]. Они защищают клетки посредством дегидратации, стабилизации липидного бислоя и белков, или за счет изменения свойств воды в непосредственной близости от мембран. Когда клетки фолликулов и ооциты испытывают воздействие моно- или дисахаридов, они реагируют осмотически потерей воды. Поскольку эти криопротекторы не проникают сквозь мембраны, клетки остаются сжатыми до тех пор, пока не произойдет уравнивания. Хотя механизмы, отвечающие за защиту во время криоконсервации, полностью не ясны, все криопротекторы имеют ряд схожих свойств. Смешиваясь с водой, они снижают точку замерзания и повышают вязкость водных растворов, также уменьшают температуру льдообразования в клетках или растворах.

Перед заморозкой кортикальный слой яичника толщиной 1–2 мм разрезают на фрагменты 5×5 мм и мельче и распределяют по индивидуальным пробиркам, которые медленно охлаждаются в программируемом замораживателе со скоростью от 1°C до 3°C/мин. до -7°C, далее со скоростью 0,3°C/мин. до -40°C и переключаются в пары азота или жидкий азот (-196°C) для длительного хранения [24]. Медленная заморозка осуществляется в течение нескольких часов, поэтому существует риск повреждения клеток.

Несмотря на использование в клинической практике метода медленной КТЯ и наличия факта рождения первого ребенка после успешной ортотопической трансплантации медленно замороженной ткани яичника [22], средняя выживаемость фолликулов с нормальной морфологией оставалась низкой. Также были обнаружены ультраструктурные изменения ооцитов под электронным микроскопом [25–27]. Это связали с разрушающим действием кристаллов льда на ооциты и клетки стромы ткани яичника после медленной заморозки. Возможно, именно эти факторы приводили лишь к временному функционированию трансплантированных фрагментов и требовали дополнительных оперативных вмешательств по реплантации ткани яичников. Теоретически надо было значительно увеличить скорость заморозки, а значит увеличить концентрацию криопротектора и, следовательно, уменьшить время инкубации ткани яичника, чтобы избежать токсического эффекта.

В результате многочисленных экспериментов был предложен новый метод заморозки – витрификация (vitrification), или прямое погружение биологического материала в жидкий азот. Этот метод является более простым в использовании, менее затратным и более эффективным.

Витрификация была впервые применена при криоконсервации ооцитов хомяка J. Critser с соавт. в 1986 г. [28]. Спустя 13 лет данный метод был использован для криоконсервации ткани яичника мышей [29]. В настоящее время он широко используется для заморозки ооцитов и ткани яичников человека и других млекопитающих. Многими авторами показано, что морфология фолликулов не изменяется после витрификации и размораживания, а также сохраняется жизнеспособность преантральных фолликулов [18, 30, 31].

При витрификации заморозка осуществляется в несколько этапов с инкубацией кусочков ткани в высокой концентрации криопротекторов в течение нескольких минут и последующей быстрой заморозкой со скоростью 23000°C/мин. Такой метод позволяет избавиться от формирования разрушающих клетку кристаллов льда [30]. Однако необходимо добиться адекватного проникновения криопротекторов внутрь ткани через строму к яйцеклетке и при этом избежать их возможного токсического воздействия. На сегодняшний день существует множество протоколов витрификации. Значительные успехи в разработке метода витрификации тканей и оценке выживания преантральных фолликулов, выделенных ферментативно после витрификации и размораживания ткани яичников коров и человека, были получены группой японских ученых [32]. Основываясь на высокоэффективном методе витрификации яйцеклеток – Cryotop, учеными был разработан новый метод заморозки ткани яичника – Cryotissue. Для витрификации методом Cryotissue ткань яичника размером 10×10 мм инкубируют 25 мин. в питательной среде TCM-199 с добавлением ЭГ (7,5%), ДМСО (7,5%) и сыворотки (20%). Вторую инкубацию проводят в течение 15 мин. в той же среде без сыворотки с добавлением большего количества ЭГ (20%) и ДМСО (20%). Далее фрагменты ткани переносят на металлические пластины и погружают в жидкий азот для витрификации, то есть мгновенного замораживания, и хранения.

Данный протокол витрификации показал высокую выживаемость фолликулов у мышей, коров и человека. Не было найдено различий в жизнеспособности яйцеклеток, выделенных из свежей (88,2%) и замороженной/размороженной ткани яичников коров (89,3%) и человека (89,6%). Эти результаты доказывают высокую перспективность метода витрификации для клинического применения.

Используя вышеописанный метод Cryotissue с некоторой модификацией для витрификации ткани яичников черных японских коров с добавлением ДМСО и ЭГ в качестве криопротекторов, нами было показано, что первичные фолликулы коров остаются жизнеспособными сразу после размораживания (более 87%) (рис. 2). В нашей работе для длительного культивирования (28 дней) фрагментов замороженной/размороженной ткани яичников коров мы использовали среду TCM-199 с добавлением бычьего сывороточного альбумина, гипоксантина, инсулина, фолликулостимулирующего гормона и эпидермального фактора роста. Фрагменты ткани после раз-

морозки измельчались скальпелем и погружались в 3D-матрикс, в роли которого использовали коллаген II типа. На протяжении длительного периода культивирования (28 дней) фрагментов ткани яичников более 85% фолликулов сохраняли жизнеспособность (рис. 3). Несколько ниже была жизнеспособность фолликулов онкологических больных после витрификации и размораживания (более 83%) [13].

В сравнении с медленным замораживанием витрификация имеет несколько преимуществ. Во-первых, исключается риск образования внеклеточных или внутриклеточных кристаллов льда, которые могут повреждать клетку. Во-вторых, во время витрификации клетки теряют воду или обезвоживаются до того как будут охлаждены. При медленном замораживании обезвоживание клетки запускается при инициации внеклеточной кристаллизации в результате повышения концентрации соли во внеклеточном пространстве. Во время витрификации такого не происходит, следовательно, отсутствует риск возникновения «эффекта растворения». В-третьих, во время медленного замораживания клетки охлаждаются в течение длительного времени сначала до температуры -7°C , а потом до -40°C . Поскольку мейотическое и митотическое веретёна деления чувствительны к изменению температуры и особенно чувствительны к охлаждению, замораживание этих структур может причинить необратимый вред и привести к анеуплоидии. При витрификации охлаждение происходит очень быстро и, следовательно, возможный ущерб, причиняемый охлаждением, практически исключается.

После криоконсервации с использованием метода витрификации или медленной заморозки фрагменты ткани яичника могут храниться длительное время в жидком азоте. Перед их дальнейшим использованием ткань яичников подвергают быстрой разморозке в растворе, содержащем сахарозу.

Трансплантация ткани яичника

В настоящее время основным методом использования замороженной и размороженной ткани яичника является аутотрансплантация, или реплантация. Существуют две основные разновидности данной процедуры. Первая заключается в ортотопической (перитонеальное пространство, яичник) трансплантации ткани яичников, вторая — в гетеротопическом введении (под кожу предплечья или брюшной стенки, под капсулу почки) фрагментов ткани яичника.

Несмотря на обнадеживающие результаты применения криоконсервации и трансплантации овариальной ткани с целью сохранения фертильности у женщин с онкологическими заболеваниями, применение этих методик сопряжено с некоторыми проблемами. Первая связана с риском переноса злокачественных клеток, а другая — с ишемией ткани яичника. Чтобы избежать обратного переноса опухолевых клеток пациенту, можно изолировать фолликулы из ткани яичника и выращивать их *in vitro* [13, 33, 34]. Решение второй проблемы предполагает заморозку целого яичника с последующей трансплантацией с сосудами, что позволит избежать потери фолликулов из-за ишемии и отсутствия реваскуляризации [18–20].

Ортотопическая трансплантация

Впервые R. Gosden с соавт. продемонстрировали спонтанную беременность у овцы после аутотрансплантации замороженной и размороженной ткани яичника в 1994 г. [35]. У человека такая спонтанная беременность наступила в 2003 г. и закончилась рождением девочки Тамары в 2004 г. [22]. У пациентки в 25 лет (1997 г.) была обнаружена лимфома Ходжкина IV ст. До начала лечения ей было предложено заморозить ткань яичника. Лапароскопически была выполнена биопсия левого яичника размером

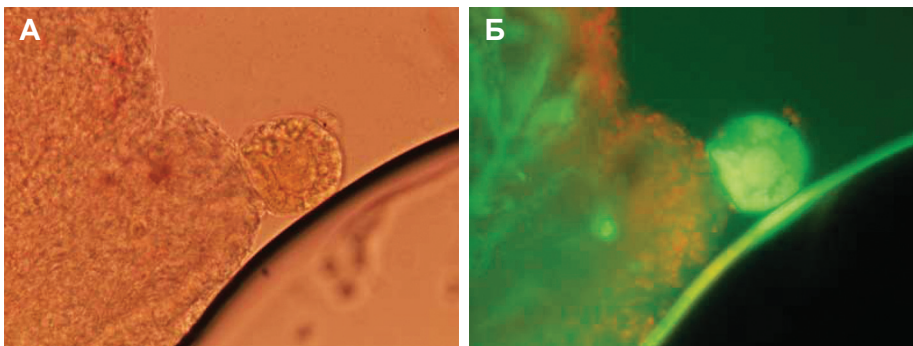


Рис. 2.
Ткань яичника коровы
с фолликулом сразу после
разморозки:
А — световая микроскопия;
Б — флуоресцентная микроскопия.
Окраска: FDA/PI (цитоплазма
и живые клетки гранулезы
окрашены в зеленый цвет).
Ув. $\times 100$

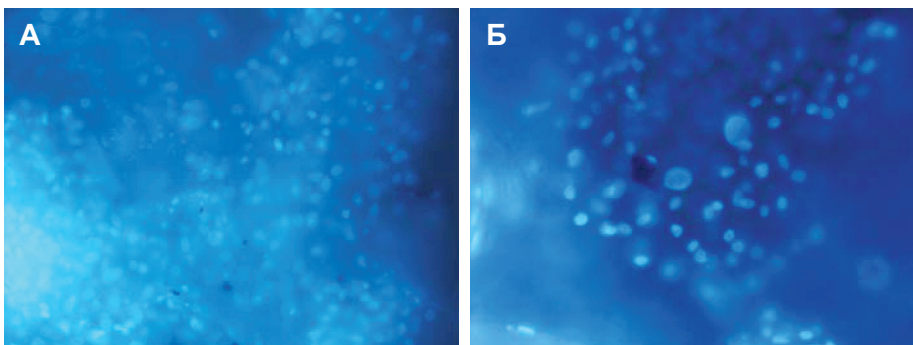


Рис. 3.
Фрагмент кортикального слоя
яичника коровы, подвергшегося
витрификации и разморозке:
А — 7 сут. культивирования;
Б — 28 сут. культивирования
in vitro в 3D коллагеновом
геле. Флуоресцентная
микроскопия.
Окраска: Hoechst/PI (живые
клетки стромы и фолликулы
окрашены в голубой цвет).
Ув. $\times 100$

около 1,2–1,5 см в длину и 5 мм в ширину и медленно заморожена с использованием ДМСО [35]. Пациентка прошла лечение (MOPP/ABV/38 Гр) и в 2003 г. 35 фрагментов ткани яичников были реплантированы под кортикальный слой атрофированного яичника, когда у пациентки наблюдалась полная аменорея. С 5-го по 9-й мес. после трансплантации ультразвуковые исследования ежемесячно показывали развитие доминантного фолликула, также наблюдались менструальные кровотечения. Через 11 мес. после операции была зафиксирована беременность, которая завершилась рождением девочки весом 3,720 кг на 39 нед. гестации. Это был первый в мире ребенок, рожденный после ортотопической трансплантации криоконсервированной ткани яичника.

К маю 2008 г. почти 30 женщинам была успешно ортотопически трансплантирована ткань яичника. В результате этого в Европе и Израиле родились 6 детей [24]. К сентябрю 2010 г. после трансплантации ткани яичников у 10 женщин, ранее получавших лечение по поводу различных заболеваний, родились уже 13 здоровых детей (8 девочек и 5 мальчиков) [36]. В 2011 г. родилась еще одна девочка у больной с серповидно-клеточной анемией после пересадки кортикального слоя яичника от генетически не родственной сестры [37] (табл.).

Большинство беременных женщин (6/10, 60%) не получали какого-либо лечения до момента забора и криоконсервации ткани яичников. Две из 10 пациенток (20%) получали химиотерапию в полном

Таблица. Рождение 13 детей после ортотопической аутотрансплантации ткани яичников

№ пациента (ссылка)	Возраст (год)	Заболевание	Химиотерапия до заморозки	Реплантация (год)	Время до наступления беременности (мес.)	Оплодотворение	Сроки гестации (нед.) / пол/вес (кг)
1 (J. Donnez et al. 2004)	25 (1997)	ЛГМ IVст.	Нет	2003	11	Е	39/♀/3.720
2 (J. Donnez et al. 2011)	19 (2001)	Нейроэкто- дермическая опухоль с Mts	Нет	2008	9	Е	38.5/♂/2.830
3 (D. Meirou et al. 2005)	28 (2001)	В-кл. лимфома	VACOP-B, MINE/ESHAP	2003	11 27	IVF Е	38/♀/3.000, ----
4 (I. Demeestere et al. 2007)	24 (2000)	ЛГМ IVст.	ABVD (1с)	2004 2006	8, 5, 33	Е, Е	---- 39/♀/3.130, 39/♀/2.870
5 (S.Y. Andersen et al. 2008)	27 (2004)	Саркома Юинга	Нет, левостор. овариэктомия	2005	6 25	IVF, Е	39/♀/3.204, 39/♀/3.828
6 (S.Y. Andersen et al. 2008)	27 (2003)	ЛГМ	ABVD (6с) + ЛТ, MIME (2с)	2005 2006	--- 8	IVF	37/♂/2.600
7 (S.J. Silber et al. 2010)	20 (2005)	ЛГМ IIIb ст.	Нет	2009	8	Е	38/♂/3.090
8 (M. Piver et al. 2009)	27 (1999)	Полиангиит	Циклофосфамид (2,5 г)	2007	14	IVF	37/♀/2.030
9 (M. Sánchez- Serrano et al. 2010)	36 (2006)	Рак молочной железы	Нет	2008	10	IVF (ICSI)	33/♂/1.650, 33/♂/1.830
10 (C. Roux et al. 2010)	20 (2005)	Серповидно- клеточная анемия	Нет	2008	6	Е	38/♀/3.700

Е — естественное оплодотворение; IVF — in vitro fertilization (ЭКО), ICSI — вариант экстракорпорального оплодотворения в виде интрацитоплазматической инъекция сперматозоида.

режиме (ABVDMINE/VACOP, MINE-ESHAP) до того как их ткань яичника была заморожена. Среди этих двух пациенток одна получила только один курс химиотерапии (ABVD), а другая была пролечена циклофосфамидом в суммарной дозе 2,5 г. У обеих пациенток было гистологически подтверждено наличие большого числа примордиальных фолликулов в образцах ткани яичников. К 2013 г. было выполнено около 60 ортотопических трансплантаций криоконсервированной ткани яичника и описаны случаи рождения 24 детей [38]. В 2014 г. насчитывалось уже 30 случаев рождения детей [39]. Тот факт, что большинство женщин смогли забеременеть самостоятельно после трансплантации медленно замороженной/размороженной ткани яичника, является хорошим аргументом в пользу использования ортотопической реплантации в клинической практике.

В последнее время появляются статьи, в которых оценивают гормональный статус и описывают длительные наблюдения за женщинами после аутоотрансплантации яичников, хотя первая трансплантация ткани яичников была проведена только в 2003 г. Для того чтобы оценить функциональную активность ткани яичника после трансплантации S. Silber с соавт. с 2005 по 2010 гг. проделали ряд операций по пересадке свежей ткани яичника девятерым монозиготным близнецам с преждевременным истощением яичников [40]. В результате 14 спонтанных беременностей были зарегистрированы и 8 детей были рождены, а одна женщина на момент написания статьи была беременна двойней [41]. Другую группу составили 16 онкологических больных, две из которых были бесплодны на момент забора ткани яичников. Показано, что во многих случаях менструация началась в течение 2–6 мес. (в среднем 4 мес.) после трансплантации ткани яичников и продолжалась от 1 до 6 лет у разных женщин без вспомогательного медикаментозного лечения [42, 43]. Интервал времени от аутоотрансплантации до наступления беременности (в естественном или индуцированном IVF цикле) колебался от 6 до 25 мес. [37]. Суммарно было получено сравнимое количество беременностей после пересадки свежей и замороженной ткани яичников, однако функциональная активность криоконсервированных фрагментов была короче [41], а эндокринная функция у большинства женщин после пересадки криоконсервированной ткани яичника сохранялась в течение одного или двух лет. Активность яичников после трансплантации не замороженной ткани составила более 4 лет.

Гетеротопическая трансплантация

Результаты экспериментальных и клинических исследований показывают, что гетеротопическая трансплантация сопровождается меньшим числом наступления беременностей по сравнению с ортотопической. Однако существует перспектива одновременной пересадки ткани яичника в несколько точек, то есть смешанной трансплантации. Было показано, что после гетеротопической трансплантации ткани яичника восстанавливается менструальный цикл и отмечается незначительный рост и созревание фолликулов. Однако на сегодняшний день не было описано ни одного случая клинической беременности после переноса в полость матки эмбрионов, полученных из ооцитов после пункции фолликулов из гетеротопически расположенного трансплантата [42–44].

В зарубежной литературе представлен лишь один случай биохимической беременности у пациентки после гетеротопической трансплантации ткани яичников [45]. Во всех остальных работах, описывающих такую трансплантацию, говорится о развитии фолликулов, однако размер этих фолликулов всегда меньше 15 мм [43, 44]. Предполагают, что ограниченный рост фолликулов и нарушение процесса созревания и последующего оплодотворения ооцитов связаны с атипичным расположением трансплантата, а именно с негативным воздействием более низкой температуры поверхности кожи, повышенным давлением, а также с механическим воздействием [17].

Недавно 28-летней пациентке с лимфомой Ходжкина через 2,5 года после пересадки костного мозга в нижнюю треть брюшной стенки была реплантирована ранее криоконсервированная ткань яичника [46]. Через 2 мес. после трансплантации было обнаружено развитие фолликулов. Пациентка забеременела спонтанно 4 раза на протяжении 5 лет и родила троих детей. Хотя яичник оставался истощенным *in situ*, была показана активность единичных фолликулов одновременно с активностью фолликулов трансплантата. Механизм спонтанного восстановления репродуктивной функции с последующей нормальной беременностью после гетеротопической трансплантации ткани яичника пока не понятен и должен быть исследован детально. Дальнейшие исследования будут необходимы, чтобы изучить истинное происхождение беременностей после гетеротопической трансплантации.

В России, в городском онкологическом диспансере г. Санкт-Петербурга проводилось исследование по аутоотрансплантации размороженной ткани яичника. Совместно с клиникой «АВА-ПЕТЕР» разработана программа сохранения фертильности для онкологических пациенток репродуктивного возраста. В 2008 г. было выполнено 12 гетеротопических аутоотрансплантаций. В 7 случаях пациентки наблюдались у репродуктолога по поводу мониторинга фолликулогенеза и планирования беременности. В одном случае была получена зрелая яйцеклетка [12].

Сравнивая результаты ортотопической и гетеротопической трансплантаций, важно отметить, что после первой в фазу роста вступает большее количество фолликулов. Также большее количество зрелых ооцитов способно к оплодотворению [11, 42]. Все описанные случаи удачных беременностей произошли после трансплантации ткани яичников непосредственно в яичник или в малый таз около яичника [36]. Также ортотопическая трансплантация не нарушает концепции естественного оплодотворения и остается более предпочтительной, а гетеротопическая может быть оправдана для пациентов после овариэктомии или массивного облучения органов малого таза, а также, если у пациентки затруднен доступ к яичникам или передней брюшной стенке.

Криоконсервация и реплантация целого яичника

Многие ученые оценивают работу яичника после пересадки свежей или криоконсервированной ткани яичника как временную, поскольку функция органа восстанавливается на короткий срок. Основной причиной угасания функциональной активности яичника является ишемия, которая возникает в первые часы после трансплантации и способна привести

к гибели более трети примордиальных фолликулов [22, 47, 48]. Именно поэтому для восстановления репродуктивного потенциала крайне важно сокращение временного интервала ишемии и ускорение реваскуляризации трансплантатов. В этой связи была предложена трансплантация ткани яичников на сосудистой ножке в качестве наиболее логичного подхода по сравнению с трансплантацией кортикального слоя яичников. Исследованием и развитием технологии криоконсервации целых органов, так же как и хирургическими методами аутоотрансплантации всего яичника на сосудистой ножке активно занимаются разные группы учёных [49–53]. Как было показано на животных, трансплантация целого интактного яичника с микрохирургическим анастомозированием сосудов, несмотря на техническую сложность этой процедуры, является единственным решением проблемы, так как она обеспечивает непосредственное кровоснабжение ткани яичников после пересадки, минимизируя опасность возникновения ишемии. Однако эта процедура гораздо сложнее и более рискованная, по сравнению с реплантацией фрагментов ткани яичников [50–52]. Также требует отработки и дальнейших исследований заморозка целого яичника.

Процедура криоконсервации целого яичника была изучена на модели яичника овец [50]. Для этого первоначально через артерию яичника в течение 3 мин. проводили перфузию раствором, содержащим 10% ДМСО. После этого яичник помещали в пластиковый флакон с холодным криопротектором и замораживали в специальной аппаратуре с использованием технологии направленного замораживания, что позволило криоконсервировать орган очень медленно, со скоростью охлаждения 0,3°C/мин. Аутоотрансплантацию проводили к сосудистой ножке другого яичника той же овцы через несколько дней после резекции. Перед этим, из размороженного яичника через артерию вымывали криопротектор с помощью 10 мл среды с HEPES-TALP, содержащей 0,5 моль сахарозы и 10 МЕ/мл гепарина. Далее под микроскопом проводили сшивание конец в конец сосудистых анастомозов вены и артерии. Кровоток проверяли путем наблюдения пульсации в яичниковой артерии и венозного возврата, который приводит к нормальному вздутию яичниковой вены.

Несколько лет назад впервые был описан протокол криоконсервации интактного яичника человека и показана высокая выживаемость фолликулов (75,1%) [53]. После процедуры размораживания орган имел нормальную гистологическую структуру, также отмечалось наличие сохранных мелких сосудов и неизмененных жизнеспособных клеток стромы. Методом трансмиссионной электронной микроскопии было подтверждено, что большинство примордиальных фолликулов (96,7%) были интактными после криоконсервации [54]. Используя метод иммуногистохимии по оценке активации внутриклеточной каспазы-3, не наблюдалось никакой индукции апоптоза в фолликулярных клетках. Доля активных каспаза-3-позитивных эндотелиальных клеток составила менее 1%.

Впоследствии были описаны и другие техники успешной трансплантации целого яичника [55, 56]. Все случаи сопровождались пересадкой с микрохирургической техникой. Успешная аллогенная трансплантация целого яичника была проведена на паре монозиготных близнецов. Одна из сестер имела нормальную функцию яичников и родила двоих детей, у второй сестры было преждевременное

истощение фолликулов. После пересадки ей целого яичника от сестры на 101 день возобновился менструальный цикл, а через 11 регулярных циклов была выявлена спонтанная беременность, в результате которой на 40-й неделе гестации родилась здоровая девочка [55].

На сегодняшний день такие работы единичные, так как они требуют участия высококвалифицированных специалистов в области сосудистой хирургии и трансплантологии. Учитывая персонализированный подход к каждому больному и особенности течения заболевания, а также желание пациента иметь собственных детей, в исключительных случаях можно использовать данную процедуру в клинической практике.

Изоляция и культивирование фолликулов *in vitro*

В некоторых случаях существует опасность попадания клеток злокачественной опухоли в организм после аутоотрансплантации замороженной и размороженной ткани яичника. Яичники чаще поражаются метастазами при гемобластозах, опухолях органов желудочно-кишечного тракта и раке молочной железы. Возможной альтернативой для указанной группы пациенток является выделение интактных Граафовых пузырьков или преантральных фолликулов из криоконсервированной ткани яичников с последующей их аутоотрансплантацией. К. Oktay с соавт. в 1997 г. предложили выделять примордиальные фолликулы из ткани яичников механическим способом при помощи микродиссекции с последующей ферментативной обработкой ткани яичников, то есть путем инкубации мелких фрагментов ткани с коллагеназой или актиназой, и замораживать или выращивать их *in vitro*. Было показано, что в результате такого выделения можно получить жизнеспособные примордиальные фолликулы из свежей или замороженной ткани яичников [57]. Однако сама процедура выделения фолликулов остается достаточно сложной, а механическая и ферментативная обработка повреждают стромальные клетки и нарушают межклеточные взаимодействия между ооцитом и окружающими его фолликулярными клетками. Для изучения фолликулогенеза и культивирования ооцитов было предложено множество различных моделей на животных [31, 33, 58–61]. Для этого фолликулы или фрагменты ткани яичников погружались в 3D-матрикс, в роли которого использовали коллаген II типа, альгинатный гель, или выращивались на специальных мембранах. Однако на сегодняшний день еще не было получено зрелой яйцеклетки человека, выращенной *in vitro* из примордиального фолликула, хотя работы в этом направлении ведутся и имеют определенный успех [33, 58, 61].

На основании ряда современных исследований была предложена поэтапная многостадийная система развития фолликулов [60]. На первом этапе культивируют маленькие фрагменты ткани яичника, на втором механически выделяют преантральные фолликулы и выращивают их отдельно, далее из развивающихся антральных фолликулов выделяют «кумуляус-ооцит» комплексы и культивируют их на специальной мембране или в 3D-системе, после чего собранные ооциты подвергают окончательному дозреванию *in vitro* (IVM). Данная система, в теории, позволяет получить зрелый ооцит, однако тонкий подбор ростовых факторов, гормонов и медиа-

торов необходим на каждом отдельном этапе. Также требуется детальная отработка методов выделения единичных фолликулов и подбор физических параметров культивирования ранних фолликулов. Роль многих факторов фолликулогенеза у человека еще предстоит оценить и изучить. Главная задача исследователей — это научиться активировать пул покоящихся примордиальных фолликулов *in vitro*, а также выявить эндокринные, паракринные и аутокринные факторы, необходимые для роста и созревания первичных фолликулов, что является ключевым доступом к неограниченному источнику зрелых ооцитов для их биомедицинского использования.

Будущие перспективы метода культивирования криоконсервированных фрагментов овариальной ткани *in vitro* связывают с внедрением в лабораторную практику новых трехмерных многостадийных систем, воссоздающих естественные условия, в которых из ткани яичника можно будет выращивать зрелые яйцеклетки человека.

Трансплантация единичных фолликулов

Процедура трансплантации единичных фолликулов еще не получила широкого использования в силу своей малоизученности. Однако недавно была проведена кратковременная ксенотрансплантация единичных фолликулов и суспензии CD34⁺-клеток стромы и эндотелия кортикального слоя яичника человека иммунодефицитным мышам. Было продемонстрировано, что для успешного роста сосудов и реваскуляризации, а также для формирования овариоподобной стромы после пересадки клеточных элементов, необходимо ко-трансплантировать CD34⁺-клетки, то есть клетки на ранних этапах дифференцировки [62].

Развитие технологий клеточной трансплантации, вероятно, позволит в будущем перейти от хирургического вмешательства к миниинвазивным операциям, что должно привести к широкому внедрению метода реплантации фолликулов в клиническую практику.

Заключение

Выбор кандидатов для сохранения фертильности методом криоконсервации ткани яичника должен основываться на возрасте пациента, типе злокачественного образования, методе лечения и исходить из ожидаемого прогноза заболевания. Большую группу пациентов могут составить молодые женщины и девочки, лечение которых требует трансплантации костного мозга, перед которой используют алкилирующие препараты в высоких концентрациях, что в большинстве случаев приводит к стерилизации. На сегодняшний день нет сообщений о рецидиве рака в результате трансплантации ткани яичника. Поэтому для криоконсервации ткани яичников могут подходить все женщины репродуктивного возраста, а также дети, которым планируется проводить заведомо гонадотоксическое лечение. Реплантацию размороженной ткани яичников надо проводить после гистологического заключения об отсутствии злокачественных клеток в образцах. Даже при наличии метастатического поражения яичников можно выделять единичные фолликулы и выращивать их *in vitro*.

Анализ современной литературы показал, что наиболее удобным методом забора ткани яичников является лапароскопия, простым и более дешевым

методом заморозки ткани яичников является витрификация, а наиболее естественным способом восстановления репродуктивной функции — ортотопическая аутотрансплантация.

Методика замораживания ткани яичника человека является относительно новой, однако успехи криоконсервации и клинического применения методов трансплантации замороженной и размороженной ткани, а также многочисленные факты рождения здоровых детей делают эту процедуру многообещающей. Развитие новых методов поэтапного культивирования незрелых фолликулов *in vitro*, полученных из ткани яичников млекопитающих после заморозки и разморозки, также является хорошим аргументом в пользу использования методики КТЯ в клинической практике и показывает высокую перспективность внедрения этого метода [31, 58–61].

С другой стороны, учитывая низкий уровень информированности пациентов о потере репродуктивной функции вследствие проведенного комплексного лечения, а также территориальную удаленность регионов и онкологическую настороженность медицинского персонала, бесплодных женщин и девочек в нашей стране становится с каждым годом все больше и больше. Хорошо известно, что более чем у одной трети женщин после применения химио- или радиотерапии обнаруживается аменорея [63]. Надо полагать, что, зная возможные негативные последствия предполагаемой комплексной терапии, мы не вправе не информировать пациентов о современных возможностях сохранения репродуктивной функции.

Наша задача объединить усилия врачей-онкологов и репродуктологов и информировать пациентов детородного возраста и родителей девочек препубертатного возраста обо всех возможных негативных последствиях лечения, рассказать о процедуре криоконсервации ткани яичников как альтернативном методе сохранения фертильности для большинства онкологических пациенток, а также предоставить больному возможность самостоятельного выбора. Все пациентки, согласившиеся на процедуру эксплантации ткани яичников, должны знать, что метод криоконсервации этой ткани в настоящее время не является широко распространенным, но эффективным для сохранения репродуктивной функции у большинства молодых онкологических больных. Каждая женщина должна быть проинформирована об этом и при необходимости подписать информированное согласие на данную процедуру. Следует отметить, что для широкого внедрения метода КТЯ в медицинскую практику требуется создание высокоспециализированных центров сохранения фертильности на базах онкологических клиник и централизованных криобанков, а также тесного мультидисциплинарного сотрудничества между различными специалистами в области онкологии, хирургии, репродукции и фундаментальных исследований.

Современная наука развивается стремительными темпами и что сегодня является мечтой, завтра — это объективная реальность.

Благодарности

Исследование выполнено при финансовой поддержке фонда Matsumae International Foundation (Япония), грант № 2008-06, и Japan Society for the Promotion of Science (JSPS) (Япония), грант № L09565.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. Злокачественные новообразования в России в 2012 году (заболеваемость и смертность). Москва: ФГБУ «МНИОИ им. П.А. Герцена» Минздрава России; 2014.
2. Smith M.A., Altekruze S.F., Adamson P.C. et al. Declining childhood and adolescent cancer mortality. *Cancer* 2014; 120(16): 2497-506.
3. Jeruss J.S., Woodruff T.K. Preservation of fertility in patients with cancer. *N. Engl. J. Med.* 2009; 360: 902-11.
4. Anderson R.A., Themmen A.P., Al-Qahtani A. et al. The effects of chemotherapy and long-term gonadotrophin suppression on the ovarian reserve in premenopausal women with breast cancer. *Hum. Reprod.* 2006; 21: 2583-92.
5. Larsen E.C., Muller J., Schmiegelow K. et al. Reduced ovarian function in longterm survivors of radiation and chemotherapy-treated childhood cancer. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2003; 88: 5307-14.
6. Lee S.J. ASCO Fertility Preservation Guidelines Committee. Preservation of fertility in patients with cancer. *N. Engl. J. Med.* 2009; 360: 2680; author reply 2682-3.
7. Schover L.R., Rybicki L.A., Martin B.A. et al. Having children after cancer. A pilot survey of survivors' attitudes and experiences. *Cancer* 1999; 86: 697-709.
8. Schover L.R., Brey K., Lichtin A. et al. Knowledge and experience regarding cancer, infertility, and sperm banking in younger male survivors. *J. Clin. Oncol.* 2002; 20: 1880-9.
9. Баркалина Н.В., Ревитшвили Н.А., Назаренко Т.А. Криоконсервация ткани яичников: метод сохранения генетического материала для отсроченной реализации репродуктивной функции. *Проблемы репродукции* 2010; 2: 30-3.
10. Киселева М.В., Абакушина Е.В., Цыб А.Ф. Репродуктивное здоровье онкологических больных: состояние проблемы. *Вестник РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН* 2009; 20(2): 66.
11. Demeestere I., Simon P., Emiliani S. et al. Orthotopic and heterotopic ovarian tissue transplantation. *Hum. Reprod. Update* 2009; 15: 649-65.
12. Быстрова О.В., Калугина А.С., Цыбатова Е.В. и соавт. Способы восстановления фертильности у онкологических больных. *Практическая онкология* 2009; 10(4): 245-53.
13. Abakushina E.V., Kiseleva M.V., Ivanov S.A. et al. Cryopreservation of ovarian tissue as fertility preservation technique for young cancer patients BR-23. In: *Biobanking: a choral symphony of science, technology and human rights. Abstract ESBB Annual Meeting; 2014 Oct 21-25; Leipzig, Germany; 2014. с. 69.*
14. Абакушина Е.В., Отой Т. Многообещающий метод сохранения фертильности онкологических больных — криоконсервация ткани яичников. В: *Пароконная А.А., редактор. Рак и репродукция. М.: Галеон; 2011. с. 163-75.*
15. Абакушина Е.В., Отой Т. Экспериментальное обоснование применения метода криоконсервации ткани яичников в клинической практике. В: *Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине. Материалы IV научно-практической конференции; 2014 29 окт. — 1 нояб.; Казань, Россия; 2014. с. 149.*
16. Donnez J., Bassil S. Indications for cryopreservation of ovarian tissue. *Hum. Reprod.* 1998; 4: 248-59.
17. Donnez J., Martinez-Madrid B., Jadoul P. et al. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: a review. *Hum. Reprod. Update* 2006; 12: 519-35.
18. Donnez J., Dolmans M.M. Cryopreservation of ovarian tissue: an overview. *Minerva Med.* 2009; 100: 401-13.
19. Donnez J., Jadoul P., Squiffi J. et al. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation in cancer patients. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynecol.* 2010; 24: 87-100.
20. Donnez J., Squiffi J., Van Eyck A.S. et al. Restoration of ovarian function in orthotopically transplanted cryopreserved ovarian tissue: a pilot experience. *Reprod. Biomed. Online* 2008; 16: 694-704.
21. Hovatta O. Methods for cryopreservation of human ovarian tissue. *Reprod. Biomed. Online* 2005; 10: 729-34.
22. Donnez J., Dolmans M.M., Demylle D. et al. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet* 2004; 364: 1405-10.
23. Meirow D., Levron J., Eldar-Geva T. et al. Pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a patient with ovarian failure after chemotherapy. *N. Engl. J. Med.* 2005; 353: 318-21.
24. von Wolff M., Donnez J., Hovatta O. et al. Cryopreservation and autotransplantation of human ovarian tissue prior to cytotoxic therapy - a technique in its infancy but already successful in fertility preservation. *Eur. J. Cancer* 2009; 45(9): 1547-53.
25. Nisolle M., Casanas-Roux F., Qu J. et al. Histologic and ultrastructural evaluation of fresh and frozen-thawed human ovarian xenografts in nude mice. *Fertil. Steril.* 2000; 74: 122-9.
26. Gook D.A., Edgar D.H., Stern C. Effect of cooling rate and dehydration regimen on the histological appearance of human ovarian cortex following cryopreservation in 1, 2-propanediol. *Hum. Reprod.* 1999; 14: 2061-8.
27. Pictou H.M., Kim S.S., Gosden R.G. Cryopreservation of gonadal tissue and cells. *Br. Med. Bull.* 2000; 56: 603-15.
28. Critser J.K., Arneson B.W., Aaker D.W. et al. Cryopreservation of hamster oocytes: effects of vitrification or freezing on human sperm penetration of zona-free hamster oocytes. *Fertil. Steril.* 1986; 46: 277-84.
29. Nematollahi-Mahani S.N., Saito H., Hiroi M. Vitrification of mouse ovarian tissue in ethylene glycol based solution, thawing, in vitro maturation of follicles and fertilization of oocytes. *Fertil. Steril.* 1999; 72(suppl. 1): 200.
30. Gandolfi F., Paffoni A., Papasso Brambilla E. et al. Efficiency of equilibrium cooling and vitrification procedures for the cryopreservation of ovarian tissue: comparative analysis between human and animal models. *Fertil. Steril.* 2006; 85(Suppl. 1): 1150-6.
31. Abakushina E.V., Morita Y., Kaedei Y. et al. Formation of an antral follicle-like structure of bovine cumulus-oocyte complexes embedded individually or in groups in collagen gels. *Reprod. Domest. Anim.* 2011; 46(3): 423-7.
32. Kagawa N., Silber S., Kuwayama M. Successful vitrification of bovine and human ovarian tissue. *Reprod. Biomed. Online* 2009; 18(4): 568-77.
33. Amorim C.A., Van Langendonck A., David A. et al. Survival of human pre-antral follicles after cryopreservation of ovarian tissue, follicular isolation and in vitro culture in a calcium alginate matrix. *Hum. Reprod.* 2009; 24: 92-9.
34. Dolmans M.M., Martinez-Madrid B., Gadisseux E. et al. Short-term transplantation of isolated human ovarian follicles and cortical tissue into nude mice. *Reproduction* 2007; 134: 253-62.
35. Gosden R.G., Baird D.T., Wade J.C. et al. Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at -196°C. *Hum. Reprod.* 1994; 9: 597-603.
36. Donnez J., Silber S., Andersen C.Y. et al. Children born after autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue. A review of 13 live births. *Ann. Med.* 2011; 43(6): 437-50.
37. Donnez J., Squifflet J., Pirard C. et al. Live birth after allografting of ovarian cortex between genetically non-identical sisters. *Hum. Reprod.* 2011; 26(6): 1384-8.
38. Donnez J., Dolmans M.M., Pellicer A. et al. Restoration of ovarian activity and pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue: a review of 60 cases of reimplantation. *Fertil. Steril.* 2013; 99(6): 1503-13.
39. Meirow D., Ra'anani H., Biderman H. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: a realistic, effective technology for fertility preservation. *Methods Mol. Biol.* 2014; 1154: 455-73.
40. Silber S.J., Lenahan K.M., Levine D.J. et al. Ovarian transplantation between monozygotic twins discordant for premature ovarian failure. *N. Engl. J. Med.* 2005; 353: 58-63.
41. Silber S.J., Kagawa N., Kuwayama M. et al. Duration of fertility after fresh and frozen ovary transplantation. *Fertil. Steril.* 2010; 94: 2191-6.
42. Demeestere I., Simon P., Buxant F. et al. Ovarian function and spontaneous pregnancy after combined heterotopic and orthotopic cryopreserved ovarian tissue transplantation: case report. *Hum. Reprod.* 2006; 21: 2010-4.
43. Oktay K., Tilly J. Livebirth after cryopreserved ovarian tissue autotransplantation. *Lancet* 2004; 364(9451): 2091-2.
44. Wolner-Hanssen P., Hägglund L., Ploman F. et al. Autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue to the right forearm 41/2 years after autologous stem cell transplantation. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 2005; 84: 695-8.
45. Rosendahl M., Loft A., Byskov A.G. et al. Biochemical pregnancy after fertilization of an oocyte aspirated from a heterotopic autotransplant of cryopreserved ovarian tissue: case report. *Hum. Reprod.* 2006; 21(8): 2006-9.
46. Oktay K., Türkçüoğlu I., Rodriguez-Wallberg K.A. Four spontaneous pregnancies and three live births following subcutaneous transplantation of frozen banked ovarian tissue: what is the explanation? *Fertil. Steril.* 2011; 95(2): 804.e7-10.
47. Oktay K., Karlikaya G. Ovarian function after transplantation of frozen, banked autologous ovarian tissue. *N. Eng. J. Med.* 2000; 342: 1919.
48. Radford J.A., Lieberman B.A., Brison D.R. et al. Orthotopic reimplantation of cryopreserved ovarian cortical strips after high-dose chemotherapy for Hodgkin's lymphoma. *Lancet* 2001; 357: 1172-5.
49. Wang X., Chen H., Yin H. et al. Fertility after intact ovary transplantation. *Nature* 2002; 415: 385.
50. Arav A., Revel A., Nathan Y. et al. Oocyte recovery, embryo development and ovarian function after cryopreservation and transplantation of whole sheep ovary. *Hum. Reprod.* 2005; 20: 3554-9.
51. Baird D.T., Webb R., Campbell B.K. et al. Long-term ovarian function in sheep after ovariectomy and transplantation of autografts stored at -196°C. *Endocrinology* 1999; 140: 462-71.
52. Bedaiwy M.A., Falcone T. Harvesting and autotransplantation of vascularized ovarian grafts: approaches and techniques. *Reprod. Biomed. Online* 2007; 14: 360-71.

53. Martinez-Madrid B., Dolmans M.M., Van Langendonckt A. et al. Freeze-thawing intact human ovary with its vascular pedicle with a passive cooling device. *Fertil. Steril.* 2004; 82(5): 1390-4.
54. Camboni A., Martinez-Madrid B., Dolmans M.M. et al. Contribution of transmission electron microscopy to the study of human ovarian tissue integrity after enzymatic isolation, cryopreservation or xenografting. *Fertil. Steril.* 2005; 84(Sup.1): S104, O-252.
55. Silber S.J., Gosden R.G. Ovarian transplantation in a series of monozygotic twins discordant for ovarian failure. *N. Engl. J. Med.* 2007; 356: 1382-4.
56. Silber S.J., DeRosa M., Pineda J. et al. A series of monozygotic twins discordant for ovarian failure: ovary transplantation (cortical versus microvascular) and cryopreservation. *Hum. Reprod.* 2008; 23: 1531-7.
57. Oktay K., Nugent D., Newton H. et al. Isolation and characterization of primordial follicles from fresh and cryopreserved human ovarian tissue. *Fertil. Steril.* 1997; 67: 481-6.
58. Picton H.M., Harris S.E., Muruvi W. et al. The in vitro growth and maturation of follicles. *Reproduction* 2008; 136(6): 703-15.
59. Isachenko V., Montag M., Isachenko E. et al. Effective method for in-vitro culture of cryopreserved human ovarian tissue. *Reprod. Biomed. Online* 2006; 13: 228-34.
60. Smits J., Dolmans M.M., Donnez J. et al. Current achievements and future research directions in ovarian tissue culture, in vitro follicle development and transplantation: implications for fertility preservation. *Hum. Reprod. Update* 2010; 16(4): 395-414.
61. Telfer E.E., McLaughlin M., Ding C. et al. A two-step serum-free culture system supports development of human oocytes from primordial follicles in the presence of activin. *Hum. Reprod.* 2008; 23: 1151-8.
62. Dath C., Dethy A., Van Langendonckt A. et al. Endothelial cells are essential for ovarian stromal tissue restructuring after xenotransplantation of isolated ovarian stromal cells. *Hum. Reprod.* 2011; 26(6): 1431-9.
63. Wallace W.H., Thomson A.B., Saran F. et al. Predicting age of ovarian failure after radiation to a field that includes the ovaries. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2005; 62: 738-44.

Поступила: 19.09.2014