

Эффективность применения криоконсервированной овариальной ткани в экспериментальной биологии и клинической медицине

И.А. Трутаева,
В.В. Киروشка,
Ю.О. Божкова,
Т.П. Бондаренко

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

Резюме. В статье представлены данные литературы о применении метода трансплантации криоконсервированной овариальной ткани в области современной экспериментальной биологии и репродуктивной медицины. Приведены успешные результаты по восстановлению эндокринной функции и фертильности овариоэктомированных животных-реципиентов, а также данные клинической практики о рождении здоровых детей у пациенток, прошедших курсы противораковой терапии. В статье обсуждаются проблемы данной технологии, связанные с повреждением фолликулярного пула в процессе криоконсервирования и трансплантации, а также рассматриваются возможные пути повышения жизнеспособности фолликулов за счет оптимизации протокола.

Ключевые слова: овариальная ткань, репродуктивная функция, трансплантация, криоконсервирование.

В настоящее время основным стандартом репродуктивных биотехнологий как для восстановления детородной функции у женщин, так и для сохранения генофонда редких и исчезающих видов животных является криоконсервирование ооцитов или эмбрионов [1]. Основная сложность применения этих методов заключается в необходимости проведения процедуры суперовуляции для получения большого числа зрелых ооцитов,

поэтому более перспективным подходом является сохранение репродуктивного потенциала — криоконсервирование и трансплантация овариальной ткани [2]. Преимуществами данного подхода является отсутствие процедуры предварительной гормональной стимуляции, возможность забора различных слоев ткани в любое удобное время, достаточный фолликулярный запас в кортикальном слое яичника (от 15 до 100 примордиальных фолликулов на 1 мм³), который необходим для криоконсервирования [3, 4]. Однако создание стандартного протокола для криоконсервирования и трансплантации овариальной ткани

* адреса для листування (Correspondence): Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, 61015, м. Харків, вул. Переяславська, 23.
E-mail: irinatoleubekova@gmail.com

Огляди

ограничивается рядом факторов, основным из которых является морфологическая структура овариальной ткани, функциональная единица которой представлена фолликулом, состоящим из нескольких типов клеток: соматических (клетки гранулезы, теки) и половой — ооцита.

Трансплантация криоконсервированной овариальной ткани в экспериментальной биологии

Для разработки оптимальных протоколов криоконсервирования и трансплантации ткани яичника необходимо значительное количество экспериментального материала, получение которого ограничено для женщин и исчезающих видов животных. В связи с этим для исследований в качестве экспериментальных моделей широко используются такие лабораторные животные, как грызуны, овцы и приматы.

Впервые исследования по замораживанию овариальной ткани грызунов с использованием глицерина, выполненные в 50-х годах прошлого столетия, не увенчались успехом. Новый виток исследований в данном направлении был связан с разработкой и внедрением в криобиологическую практику новых криозащитных веществ, таких как пропандиол, этиленгликоль и диметилсульфоксид (ДМСО). В 90-х годах был проведен ряд успешных работ по консервированию и трансплантации овариальной ткани. Был разработан базовый протокол криоконсервирования, включающий несколько этапов: забор целого яичника или фрагментов ткани, которые при необходимости можно транспортировать на льду не более 2 часов, насыщение биологического материала растворами криопротекторов, замораживание-оттаивание и удаление криопротектора. При этом ткань насыщали при комнатной температуре раствором ДМСО в течение 30 минут и замораживали по следующему режиму: со скоростью $2^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до -7°C , затем производили сидинг и охлаждали со скоростью $0,3^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до -40°C , $10^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ — до -80°C с дальнейшим погружением в жидкий азот (-196°C) до момента востребования образца для трансплантации. Оттаивание осуществляли, как правило, на водяной бане при 37°C до появления жидкой фазы [5]. Через 3 недели после трансплантации криоконсервированной фетальной овариальной ткани у половозрелых мышей был отмечен эстральный цикл. Для свежеевыделенной овариальной ткани была показана различная динамика фолликулогенеза в зависимости от сайта трансплантации. Так, развитие фолликулов и желтых тел было выявлено на 4-й неделе после гетеротопической трансплантации и на 6-й неделе после ортотопической, причем у 33% живот-

ных-реципиентов наступила беременность. После трансплантации криоконсервированной ткани беременность у животных-реципиентов отсутствовала, а восстановление эндокринной функции наблюдалось в 86% случаев [6].

В работах Wang X. и соавт. было показано формирование антральных фолликулов и желтых тел в экспериментах с наложением сосудистого анастомоза при ортотопической трансплантации криоконсервированного яичника у 57% животных [7]. Изменение техники трансплантации целого яичника, а именно имплантирование его без сосудистого анастомоза, приводило к рождению нормального потомства в 73-80% случаев [8].

В современной литературе многочисленные работы посвящены исследованию роста и развития трансплантатов криоконсервированной овариальной ткани овец, поскольку она обладает густой фиброзной стромой и высокой плотностью примордиальных фолликулов в корковом слое, что соответствует морфологии яичников человека. Gosden R.G. и соавт. [5] показали отсутствие отличий в функционировании трансплантатов как свежеевыделенной, так и криоконсервированной овариальной ткани. Фрагменты кортикального слоя яичников подвергали медленному замораживанию под защитой ДМСО, после чего трансплантировали кастрированным животным. Гистологический анализ фолликулогенеза проводили через 9 месяцев после операции. При этом как для свежеевыделенной, так и для криоконсервированной ткани на фоне сильного истощения пула примордиальных фолликулов отмечалось функционирование трансплантатов, в дальнейшем было получено потомство.

Для оценки эндокринной функции Baird D.T. и соавт. (1999) провели криоконсервирование и последующую аутоотransплантацию фрагментов овариальной ткани овец. Результаты показали, что, несмотря на резкое сокращение изначального числа фолликулов, циклическая функция яичников сохранялась в течение 2 лет после трансплантации [9].

Исследования функциональной способности криоконсервированной овариальной ткани приматов при ксенотрансплантации под капсулу почки овариоэктомизированным иммунодефицитным мышам показали восстановление эстрогенной функции на 16-20-й день после трансплантации, а также наличие всех стадий фолликулогенеза на 21-32-й день [10].

Несмотря на приведенные выше результаты восстановления эндокринной и репродуктивной функции, ключевым фактором, ограничи-

вающим успех данной процедуры, является сохранение максимального пула жизнеспособных фолликулов в посттрансплантационный период. Было показано [11, 12], что около 50% примордиальных фолликулов от общего пула гибнет в результате ишемических повреждений в течение первой недели, следовательно, снижается длительность функционирования трансплантата и возможность восстановления фертильности. Степень ишемических повреждений яичника определяется такими параметрами, как размер фрагментов ткани, скорость и степень васкуляризации области трансплантации. В последнее десятилетие в литературе широко обсуждаются вопросы, связанные с применением различных методов снижения степени ишемического повреждения.

Gavish Z. и соавт. [15] проводили сравнительный анализ функции овариальной ткани овцы при трансплантации фрагментов обычной толщины (1-2 мм) и более тонких (0,5-0,9 мм). Свежие или криоконсервированные образцы были ксенотрансплантированы стерилизованным иммунодефицитным мышам (n=49). Трансплантаты всех групп наблюдения были извлечены через 7 дней для анализа. Установлено, что трансплантация как свежей, так и криоконсервированной ткани приводит к восстановлению гормональной секреции и фертильности. Однако «выгорание» фолликулов было более интенсивным в тонко подготовленных фрагментах ткани. В этом случае наблюдался обширный фиброз во всех исследуемых группах. Следовательно, уменьшение толщины трансплантата не вызвало положительного эффекта при ревааскуляризации. Выдвинутое Ferreira M. и соавт. [13], Revel A. и соавт. [14] предположение, что уменьшение размера и толщины фрагмента ткани для трансплантации могло бы снизить степень ишемических повреждений вследствие ускорения васкуляризации, не получило экспериментальных доказательств. Полученный противоположный результат был интерпретирован как возможная потеря растущих фолликулов при механическом измельчении фрагментов овариальной ткани [15].

В работе Lee D.M. и соавт. [16] исследовали развитие трансплантатов овариальной ткани приматов в условиях гетеротопической трансплантации в различные сайты: под капсулу почки, подкожно и в брюшину. Эндокринная функция была отмечена во всех исследуемых случаях. Максимальное число развивающихся фолликулов наблюдалось в трансплантате, расположенном в брюшной полости. В этой эксперимен-

тальной группе было извлечено 23 фолликула, содержащих 8 жизнеспособных ооцитов. Шесть яйцеклеток были оплодотворены с помощью интрацитоплазматической инъекции сперматозоида (ИКСИ), после чего четыре эмбриона достигли 5-клеточной стадии. Два эмбриона после подсадки на стадии морулы привели к беременности и родам при суррогатном материнстве.

В современной литературе существуют предположения, что факторы роста, такие как фактор роста фибробластов, трансформирующий фактор роста β , сосудистый эндотелиальный фактор (VEGF), а также уровень гонадотропинов в организме могут стимулировать ревааскуляризацию трансплантата [17].

Schnorr J. и соавт. [18] исследовали функцию трансплантатов овариальной ткани приматов при введении VEGF для ускорения васкуляризации. В течение 120 дней был проведен анализ вагинальных мазков, гормональный анализ крови с измерением концентрации половых гормонов (эстрадиол, прогестерон) и гипофизарных (лютеинизирующий гормон ЛГ и фолликулостимулирующий гормон ФСГ). Показано, что применение VEGF приводило к уменьшению времени функционирования трансплантатов.

Таким образом, несмотря на приведенные выше успешные экспериментальные результаты трансплантации криоконсервированной овариальной ткани, восстановление детородной функции носит несистемный характер. Это связано с тем, что различные попытки увеличить пул жизнеспособных фолликулов за счет снижения ишемических повреждений на сегодняшний день оказались неэффективны. Следовательно, необходима дальнейшая оптимизация существующих протоколов криоконсервирования и трансплантации овариальной ткани для стандартизации данного метода.

Клиническое применение криоконсервированной овариальной ткани

Для клинического применения возможности трансплантации овариальной ткани рассматриваются учеными и врачами на протяжении многих лет. Однако только в начале XX столетия трансплантация репродуктивных органов получила широкое распространение в практике для восстановления эндокринной и репродуктивной функции у женщин.

Исследования, проведенные Novatta O. и соавт. в 1996 году, показали устойчивость овариальной ткани человека к низкотемпературному консервированию под защитой ДМСО или в сочетании 1,2-пропандиола (1,2-ПД) и саха-

Огляди

розы [19]. При этом структурная целостность фолликулов и компонентов стромы, а также неповрежденная архитектоника ткани после замораживания-оттаивания дали основания авторам предполагать, что существует возможность ее дальнейшего использования для трансплантации. Устойчивость овариальной ткани к криоповреждениям, т.е. высокий уровень сохранности примордиальных фолликулов был подтвержден и другими исследователями [20, 21].

В современной репродуктивной медицине одним из возможных подходов к восстановлению эндокринной функции и фертильности у женщин с патологией яичников различного генеза может стать комплексное применение методов трансплантации криоконсервированной овариальной ткани (орто- или гетеротопической) в сочетании с вспомогательными репродуктивными технологиями (экстракорпоральное оплодотворение — ЭКО).

Ортотопическая трансплантация яичника или его фрагментов осуществляется лапароскопически в область малого таза. При этом фрагменты коркового слоя овариальной ткани трансплантируются на мозговое вещество яичника с наложением сосудистых анастомозов, либо же формируется перитонеальный карман на поверхности брюшины рядом с фимбриями и сосудистой сетью яичника.

Ортотопические сайты обеспечивают естественные факторы для оптимального развития фолликулов (температура, давление, паракринные факторы и кровоснабжение), что может привести к естественной беременности в случае проходимости маточных труб [22, 23].

Первая ортотопическая трансплантация овариальной ткани человека была выполнена Oktay K. и Karlikaya G. в 2000 году 29-летней пациентке с двусторонней овариоэктомией. Фрагменты криоконсервированной овариальной ткани трансплантировали лапароскопически в перитонеальный карман в области малого таза и на медиальную поверхность яичника. При этом отмечалось восстановление кровоснабжения трансплантата, формирование фолликула размером 17 мм и менструального цикла после гормональной стимуляции в течение 10 мес. [24].

Radford J.A. и соавт. проводили забор и криоконсервирование ткани яичника у 36-летней пациентки с лимфомой Ходжкина перед курсом высокодозовой химиотерапии. После наступления менопаузы пациентке была проведена ортотрансплантация двух фрагментов овариальной ткани на поверхность яичников. Через 8 месяцев

было отмечено повышение уровня половых гормонов и один менструальный цикл. По мнению авторов, это было связано с недостаточным количеством жизнеспособных фолликулов в трансплантируемой овариальной ткани [25].

В 2004 году Donnez J. и соавт. опубликовали данные о первой наступившей беременности и рождении ребенка после трансплантации криоконсервированных яичников. Замораживание яичника было выполнено в 1997 году перед курсом химиотерапии 25-летней пациентке с IV стадией лимфомы Ходжкина. В 2003 году провели аутоотрансплантацию одного большого и 35 маленьких фрагментов криоконсервированной ткани яичника в перитонеальный карман, расположенный очень близко к сосудам правого яичника и фимбриям фаллопиевой трубы. Анализ концентрации 17 β -эстрадиола, прогестерона и ФСГ продемонстрировал наличие овуляторного цикла с 5-го по 9-й месяц после имплантации. Через 11 месяцев пациентка забеременела и впоследствии родила здорового ребенка [26].

В 2005 году Meirou D. и соавт. сообщили об успешной ортотопической аутоотрансплантации криоконсервированной ткани яичника у пациентки после пересадки костного мозга и химиотерапии. В этом случае через восемь месяцев после трансплантации наблюдалась первая спонтанная менструация, а еще через месяц — вторая. После установления цикла был произведен забор зрелой яйцеклетки для дальнейшей процедуры ЭКО, в результате которой родился здоровый ребенок весом 3000 г [27].

К 2013 году было проведено 60 ортотопических трансплантаций криоконсервированной ткани яичников с использованием медленного режима замораживания-оттаивания в исследовательских центрах Европы. В 93% случаев было отмечено восстановление активности яичников. Из 60 женщин 11 забеременели, шестеро из них родили 12 здоровых детей [22]. Следует отметить, что беременность наступала у женщин моложе 30 лет [28], что, по-видимому, обусловлено большим фолликулярным пулом на момент криоконсервирования.

Однако несмотря на то, что ортотопическая трансплантация создает возможность восстановления фертильности в благоприятных естественных условиях, существует ряд недостатков этого метода. Во-первых, операция трансплантации в этом случае является инвазивной, а во-вторых, объем трансплантата ограничивается размерами яичника, что значительно снижает количество фолликулов, потенциально способных к

развитию и дальнейшему оплодотворению [3]. Более простой процедурой и экономически эффективной является гетеротопическая трансплантация, не связанная с ограничениями в количестве пересаживаемых фрагментов. Овариальная ткань имплантируется под кожу передней брюшной стенки либо в область предплечья, что дает возможность наблюдать за развитием фолликулов и производить их пункцию для дальнейшего ЭКО. Данная процедура является оптимальной для пациентов с наличием спаек в области малого таза и может быть при необходимости проведена повторно [22, 29, 30].

Lerporrier M. и соавт. показали восстановление менструального цикла у пациентки с лимфомой Ходжкина после курсов химиотерапии после гетеротопической трансплантации левого яичника под кожу предплечья с наложением сосудистого анастомоза [31].

Аналогичная подкожная трансплантация коркового слоя яичников на глубину 1 см в фасцию плечелучевой мышцы была осуществлена 35-летней пациентке с карциномой шейки матки [32]. В течение шести недель после операции уровень ФСГ и ЛГ оставался в пределах, характерных для постменопаузы. Через десять недель ультразвуковое исследование трансплантата показало наличие четырех антральных фолликулов и одного доминантного размером 15 мм. При этом наблюдался ежемесячный фолликулярный рост, хотя уровень прогестерона не достигал постовуляторного. На 120-227-й день после трансплантации, по завершении заместительной гормональной терапии, отмечалась низкая концентрация ФСГ и ЛГ в крови. Интересно, что в этом случае локтевой сосуд взял на себя роль вены яичников, о чем свидетельствует повышение уровня эстрадиола в 10 раз относительно данного показателя в периферической вене. Из трансплантата был получен фолликул размером 14 мм, содержащий ооцит на стадии деления метафаза-I. Однако после его созревания *in vitro* процедура ИКСИ не привела к оплодотворению [32].

Oktay K. и соавт. трансплантировали ткань яичника в медиальную зону предплечья 37-летней пациентке с двухсторонней овариоэктомией и плотными тазовыми спайками. Наряду с заместительной гормональной терапией через шесть месяцев после трансплантации УЗИ показало развитие фолликула размером до 7,5 мм. Отмена заместительной гормональной терапии не вызывала нарушений менструального цикла. Через десять месяцев после трансплантации была зарегистрирована спонтанная овуляция [33].

Описан случай гетеротопической трансплантации криоконсервированной овариальной ткани 36-летней пациентке со II стадией рака молочной железы, которой ранее была проведена двухсторонняя мастэктомия с рассечением лимфатического узла. При этом кортикальный слой ткани был имплантирован в область прямой фасции брюшины. В этом случае предплечье не могло служить сайтом трансплантации в связи с предыдущей обширной подмышечной лимфодиссекцией. В процессе развития трансплантата было извлечено 20 ооцитов, восемь из которых достигли оплодотворения с помощью процедуры ЭКО. Только один ооцит развился до 4-клеточной стадии эмбриона, однако беременность после имплантации не наступила. Oktay, K. и соавт. установили, что в случае гетеротопической трансплантации размеры зрелых фолликулов намного меньше, чем при ортотопической, и достигают диаметра 10-12 мм и 16-17 мм соответственно. Авторами было высказано предположение, что выявленная разница в размерах зрелых фолликулов является результатом пространственных ограничений, а не скорости созревания (средняя продолжительность фолликулогенеза была сопоставима с физиологической нормой) [34].

Первая успешная беременность после гетеротопической трансплантации была получена Stern C.J. и Gook D. в 2013 году. В 2001 г. пациентке в возрасте 21 год была проведена левосторонняя овариоэктомия на ранней стадии рака клеток гранулезы. Через 4 года после прохождения курса противораковой терапии был выполнен забор ткани правого яичника для криоконсервирования с использованием 1,2-ПД и сахарозы. В 2010 году пациентке трансплантировали 60 фрагментов криоконсервированной овариальной ткани в правую и левую латеральные стенки таза, переднюю брюшную стенку и в подбрюшинную область. Впервые через четыре с половиной месяца было обнаружено восстановление эндокринной функции. В данный период времени ученым удалось получить три зрелых ооцита для оплодотворения и сделать подсадку двух эмбрионов, однако беременность не наступила [35, 36]. Через 2 года при отсутствии клинических симптомов менопаузы этой пациентке повторно трансплантировали 30 фрагментов криоконсервированной ткани яичника в область предыдущих трансплантатов для увеличения пула зрелых ооцитов. Наряду с этим был проведен цикл стимуляции созревания ооцитов рекомбинантным ФСГ, ЛГ и антагонистом гонадолиберина, в результате чего в правой передней

Огляди

брюшной стенке начали развиваться два фолликула размером 16 мм и 18 мм. Их овуляция была инициирована на стадии МІІ рекомбинантным хорионическим гонадотропином. Оба ооцита прошли процедуру ИКСИ, в результате которой было получено два эмбриона 8- и 5-клеточной стадии развития. На 4-й неделе гестации был получен первоначальный положительный тест на беременность, наличие дихорионических диамниотических эмбрионов на трансвагинальном УЗИ было зарегистрировано на 6-й неделе [23].

Анализ приведенных выше литературных данных позволяет сделать заключение, что в настоящий момент не существует оптимального протокола криоконсервирования и трансплантации овариальной ткани. Несмотря на то, что после ортотопической трансплантации было достигнуто рождение детей, процент успешных операций остается довольно низким, поскольку в большинстве случаев происходит гибель основного пула фолликулов в результате посттрансплантационной ишемии. Сайты гетеротопической трансплантации обеспечивают ряд технических преимуществ для ускорения процесса восстановления кровоснабжения трансплантата. Однако в этом случае изменение температурного режима и отсутствие внутриовуляторных эндокринных и паракринных факторов приводит к развитию большего числа атретических фолликулов.

Таким образом, криоконсервирование и трансплантация овариальной ткани — интенсивно развивающаяся технология как в области экспериментальной биологии, так и в клинической медицине. На сегодняшний день по протоколу одного из крупнейших центров криоконсервирования (Криобанк Бонн) жизнеспособность фолликулов после замораживания-оттаивания составляет 77-93% [37], однако в строге отмечается уменьшение уровня потребления глюкозы, что указывает на сниженный метаболизм в ткани. Эти данные свидетельствуют о необходимости усовершенствования метода криоконсервирования овариальной ткани, поскольку для полноценного процесса фолликулогенеза необходимо сохранение всех структурных компонентов ткани яичника. Помимо этого, в результате ишемических посттрансплантационных повреждений из 500-1000 примордиальных фолликулов гибнет около 50%, что является критическим показателем для восстановления репродуктивной функции. Следовательно, эффективность данной технологии в настоящее время невелика, что обуславливает необходимость дальнейших исследований как для создания банков генофонда редких

видов животных, так и для увеличения процента успешных трансплантаций криоконсервированной овариальной ткани, приводящих к рождению здоровых детей в клинической практике.

Список использованной литературы

1. Porcu E., Fabbri R., Ciotti P.M. et al. Oocytes or embryo storage // *Fertil. Steril.* 2002, 78, № 1, 5-38.
2. Demeestere I., Simon P., Emiliani S. et al. Options to preserve fertility before oncological treatment: cryopreservation of ovarian tissue and its clinical application // *Acta. Clin. Belg.* 2006, 61, № 5, 259-263.
3. Demeestere I., Simon P., Emiliani S. et al. Orthotopic and heterotopic ovarian tissue transplantation // *Hum. Reprod. Update.* 2009, 15, № 6, 649-665.
4. Demeestere I., Simon P., Buxant F. et al. Ovarian function and spontaneous pregnancy after combined heterotopic and orthotopic cryopreserved ovarian tissue transplantation in a patient previously treated with bone marrow transplantation: case report // *Hum. Reprod.* 2006, 21, 2010-2014.
5. Gosden R.G., Baird D.T., Wade J.C. and Webb G. Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at -196 °C // *Hum. Reprod.* 1994, 9, 597-603.
6. Cox S.L., Shaw J.M. and Jenkin G. Transplantation of cryopreserved fetal ovarian tissue to adult recipients in mice // *Reprod. Fertil.* 1996, 107, 315-322.
7. Gunasena K.T., Villines P. M., Critser E.S., Critser J.K. Livebirths after autologous transplant of cryopreserved mouse ovaries//*Hum. Reprod.* 1997, 12, 101-106.
8. Wang X., Huifang Ch., Hang Y. et al. Cryopreservation: fertility after intact ovary transplantation // *Nature.* 2002, 415, 385.
9. 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, 462-471.
10. Candy C.J., Wood M.J. and Whittingham, D.G. Follicular development in cryopreserved marmoset ovarian tissue after transplantation // *Hum. Reprod.* 1995, 10, 2334-2338.
11. Gosden R.G. Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue // *Mol. Cell. Endocrinol.* 2000, 163, 125-129.
12. Nugent D., Meirrow D., Brook P.F. et al. Transplantation in reproductive medicine: previous experience, present knowledge and future prospects // *Hum. Reprod. Update.* 1997, 3, 267-280.
13. Ferreira M., Bos-Mikich A., Frantz N. et al. The effects of sample size on the outcome of ovarian tissue cryopreservation // *Reprod. Domest. Anim.* 2010, 45, 99-102.
14. Revel A., Laufer N., Ben Meir A. et al. Micro-organ ovarian transplantation enables pregnancy: a case report // *Hum Reprod.* 2011, 26, 1097-1103.
15. Gavish Z., Peer G., Hadassa R. et al. Follicle activation and «burn out» contribute to post-transplantation follicle loss in ovarian tissue grafts: the effect of graft thickness // *Human Reproduction Update.* 2014, 29, № 5, 989-996.
16. Lee D.M., Yeoman R.R., Battaglia D.E. et al. Live birth after ovarian tissue transplant // *Nature.* 2004, 428, 137-138.
17. Imthurn B., Cox S., Jenkin G. et al. Gonadotrophin administration can benefit ovarian tissue grafted to the body wall: implications for human ovarian grafting // *Mol. Cell. Endocrinol.* 2000, 163, 141-146.
18. Schnorr J., Oehninger S., Torner J. et al. Functional studies of subcutaneous ovarian transplants in non-human primates: steroidogenesis, endometrial development, ovulation, menstrual patterns and gamete morphology // *Hum. Reprod.* 2002, 7, 612-619.
19. Hovatta O., Silye R., Krausz T. et al. Cryopreservation of human ovarian tissue using dimethylsulphoxide and propanediol-sucrose as cryoprotectants // *Hum. Reprod.* 1996, 11, 1268-1272.
20. Newton H., Aubard Y., Rutherford A. et al. Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue // *Hum. Reprod.* 1996, 11, 1487-1491.
21. Boiso I., Veiga A., Tresserra F. et al. Ovarian tissue freezing, a promising method for fertility preservation // *Ref. Gynecol. Obstet.* 2001, 8, 448-452.

22. 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, 1503-1513.
23. Stern C.J., Gook D., Hale L.G. et al. First reported clinical pregnancy following heterotopic grafting of cryopreserved ovarian tissue in a woman after a bilateral oophorectomy // *Human Reproduction.* 2013, 28, № 11, 2996-2999.
24. Oktay K., Karlikaya G. Ovarian function after transplantation of frozen, banked autologous ovarian tissue // *N Engl J Med.* 2000, 342, 1919.
25. Radford J.A., Lieberman B.A., Brison D. et al. Orthotopic reimplantation of cryopreserved ovarian cortical strips after highdose chemotherapy for Hodgkin's lymphoma // *Lancet.* 2001, 357, 1172-1175.
26. Donnez J., Dolmans M.M., Demylle D. et al. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue // *Lancet.* 2004, 364, 1405-1410.
27. 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, 318-321.
28. 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, 437-50.
29. Sonmezer M., Oktay K. Orthotopic and heterotopic ovarian tissue transplantation // *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 2010, 24, № 1, 113-126.
30. Kim S.S. Assessment of long term endocrine function after transplantation of frozen-thawed human ovarian tissue to the heterotopic site: 10 year longitudinal follow-up study // *J Assist Reprod Genet.* 2012, 29, 489-493.
31. Leporrier M., Von Theobald P., Roffe J.L. and Muller G. A new technique to protect ovarian function before pelvic irradiation // *Cancer.* 1987, 60, 2201-2204.
32. Oktay K., Buyuk E., Rosenwaks Z., Rucinski J. A technique for transplantation of ovarian cortical strips to the forearm // *Fertil. Steril.* 2003, 80, № 1, 193-198.
33. Oktay K., Economos K., Rucinski J. et al. Endocrine function and oocyte retrieval after autologous transplantation of ovarian cortical strips in the forearm // *JAMA.* 2001, 286, 1490-1493.
34. Oktay K., Buyuk E., Veeck L., Zaninovic N., Xu K., Takeuchi T. et al. Embryo development after heterotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue // *Lancet.* 2004, 363, 837-40.
35. Gook D., Edgar D., Borg J. et al. Diagnostic assessment of the developmental potential of human cryopreserved ovarian tissue from multiple patients using xenografting // *Hum Reprod.* 2005, 20, 72-78.
36. Stern C., Toledo M., Hale L. et al. The first Australian experience of heterotopic grafting of cryopreserved ovarian tissue: evidence of establishment of normal ovarian function // *ANZJOG.* 2011, 51, 268-271.
37. Bastings L., Liebenthron J., Westphal J.R. et al. Efficacy of ovarian tissue cryopreservation in a major European center // *J Assist Reprod Genet.* 2014, 31, № 8, 1003-12.

(Надійшла до редакції 12.01.2015 р.)

Ефективність застосування кріоконсервованої оваріальної тканини в експериментальній біології та клінічній медицині

**І.А. Трутаєва, В.В. Кірошка, Ю.О. Божкова,
Т.П. Бондаренко**

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України

Резюме. В огляді наведено дані літератури стосовно застосування методу трансплантації кріоконсервованої оваріальної тканини в експериментальній біології та репродуктивній медицині. Описано успішні результати з відновлення ендокринної функції та фертильності оваріоектомованих тварин-реципієнтів, а також дані клінічної практики стосовно народження здорових дітей у пацієнток після курсів протиракової терапії. Обговорюються проблеми даної технології, пов'язані з пошкодженням фолікулярного пулу в процесі кріоконсервування та трансплантації, розглядаються можливі шляхи підвищення життєздатності фолікулів за рахунок оптимізації протоколу.

Ключові слова: оваріальна тканина, репродуктивна функція, трансплантація, кріоконсервування.

Efficiency of cryopreserved ovarian tissue in experimental biology and clinical medicine

**I.A. Trutaieva, V.V. Kiroshka, Yu.O. Bozhkova,
T.P. Bondarenko**

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine

Summary. This review is devoted to up-to-date literature on the application of the method of cryopreserved ovarian tissue transplantation in experimental biology and reproductive medicine. Successful results of endocrine function and fertility restoration in ovariectomized animals-recipients are described. Clinical data proved female patients to deliver healthy children after courses of cancer therapy. The problems of technology associated with damage of the follicular pool during cryopreservation and transplantation, as well as possible ways of improving the viability of follicles by optimizing the protocol, are discussed in this article.

Keywords: ovarian tissue, reproductive function, transplantation, cryopreservation.