

**О. В. Быстрова, Ю. В. Динкина,
А. С. Лисянская, Н. И. Тапильская, Г. М. Манихас**

Российско-финская клиника «АВА-ПЕТЕР»
Городской клинический онкологический диспансер
Невский просп., 22–24, Санкт-Петербург, 191186, Россия
E-mail: doctor@avapeter.ru

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ ОВАРИАЛЬНОЙ ТКАНИ В ЛЕЧЕНИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ

Криоконсервация овариальной ткани у онкологических пациенток репродуктивного возраста позволяет сохранить кортикальный слой яичника, содержащий ооциты, перед оперативным или терапевтическим лечением. Криоконсервация овариальной ткани выполнена у 4 пациенток. Рак шейки выявился в 3-х случаях (IIA, IIB стадии), рак тела матки – в одном случае (IV стадия). Использована методика пролонгированной транспортировки овариальной ткани после резекции, позволяющая успешно сохранить ткань перед криоконсервацией. Установлено, что 73 % фолликулов овариального кортекса сохраняют целостность гистологической структуры после длительной транспортировки на льду и криоконсервации / размораживания. Криоконсервация овариальной ткани перед лечением является успешным методом сохранения ооцитов пациентки и может дать шанс на восстановление фертильности, внося новые перспективы в решение социально-психологической проблемы реабилитации онкологических пациенток репродуктивного возраста.

Ключевые слова: бесплодие, злокачественные опухоли, криоконсервация, овариальная ткань.

Криоконсервация овариальной ткани в настоящее время становится важной составной частью вспомогательных репродуктивных технологий человека. Криоконсервация кортикального слоя яичников нацелена на сохранение возможности использования женщиной своих собственных гамет в тех случаях, когда в силу основного заболевания потеряна способность их производить. Криоконсервация овариальной ткани является одним из методов сохранения ткани перед оперативным или терапевтическим лечением. Особенно это актуально на фоне ежегодного (на 2,1 %) повышения числа заболевающих раком шейки матки, которое прослеживается в возрасте до 29 лет [1]. По данным Cancer Register, 3 900 женщин в год проходят лечение рака шейки матки [2]. Из них приблизительно 30 % лиц имеют опухолевый процесс I–II стадии, который обычно излечим с использованием оперативного лечения и лучевой терапии [3].

Несмотря на то что максимальная заболеваемость раком тела матки отмечается в возрасте 50–59 лет, около 8 % случаев рака тела матки встречается в возрасте до 45 лет,

что составляет более чем 1 800 случаев в год [2].

Овариальная криоконсервация возможна не только перед химио- и лучевой терапией, трансплантацией костного мозга, но и при овариэктомии, выполняемой по поводу доброкачественных новообразований яичников, в частности эндометриоидных кист, перед гонадотоксической терапией, используемой при системных заболеваниях.

Современные возможности криобиологии позволяют криоконсервировать овариальную ткань с последующим ее хранением в жидком азоте. Применение криопротекторов и программного замораживания обеспечивает сохранение овариальной ткани. Дальнейшее размораживание фрагментов овариальной ткани и их гетеро- или аутопическая трансплантация могут быть шансом для восстановления фертильности и / или исключения развития посткастрационного синдрома. Такая ауто-трансплантация размороженной овариальной ткани может использоваться в целях лечения бесплодия и гормональной терапии посткастрационного синдрома у онкологических пациенток. В мировой практике существует

два случая рождения здоровых детей после криоконсервации овариальной ткани с последующей аутотрансплантацией фрагментов размороженной ткани в яичник у пациентов, прошедших химиотерапию по поводу лимфомы Ходжкина [4; 5].

Успех замораживания напрямую зависит от количества выживших примордиальных фолликулов. Важность анализа успешности криоконсервации овариальной ткани соизмерима с важностью сохранения органов для трансплантации. Подбор методики подготовки к криоконсервации, собственно замораживание и размораживание ткани лежат в основе оптимального выживания различных клеточных типов и компонентов овариальной ткани. Бесспорно, гистологическое исследование не может оценить жизнеспособность фолликулов. Однако выявленная при микроскопии неповрежденная архитектура ткани, структурная целостность фолликулов и компонентов стромы дает основания предполагать выживание овариальной ткани и готовность использования ее для трансплантации.

Цель исследования: оценка результатов криоконсервации овариальной ткани, полученной у пациенток со злокачественными новообразованиями органов репродуктивной системы.

Материал и методы

Криоконсервация овариальной ткани выполнена у 4 пациенток. Группа сформирована на основании клинического диагноза и возраста пациенток до 35 лет. Рак шейки выявлялся в 3-х случаях (IIA, IIB стадии), рак тела матки – в одном случае (IB стадия). Участок овариальной ткани отмывали в физиологическом растворе. Небольшой фрагмент ткани размером 5 × 8 мм отсекали и фиксировали в жидкости Буэна. Оставшуюся ткань помещали в фосфатный буфер Дюльбеко («Invitrogen inc.», Англия) с *human serum albumin* (HSA) (25 мг/мл). Ткань транспортировали во льду. В течение 1,5 часа ткань доставлялась в клинику, где на холодном столе под лупой в буфере Дюльбеко с альбумином кортикальный слой отделяли от медуллярной части и нарезали на фрагменты размером 5 × 10 мм толщиной 1 мм. Фрагменты ткани проводи-

ли при +4 °C по коммерческим средам, содержащим пропандиол и сахарозу, для криоконсервации (Medicult). Затем ткань в криовиолах Nunc («Nuncclon», Дания) помещали в программный замораживатель Planer Cryo 360–1.7. Использовали программу со стартовой температурой +4 °C и пошаговым охлаждением 2 °C/мин до –9 °C. После ручного сидинга при –9 °C выполнялось пошаговое охлаждение 0,3 °C/мин до –40 °C, затем по 10 °C/мин до –140 °C. После этой температуры криовиолы с тканью погружались в криобанк с жидким азотом (–196 °C). Для контроля криоконсервации один фрагмент ткани от каждой пациентки размораживали, используя быстрое размораживание на водяной бане (37 °C). Затем проводили по средам коммерческого набора для размораживания (Medicult) и фиксировали в жидкости Буэна. На контрольное гистологическое исследование отдавали два фрагмента ткани от каждой пациентки: один фрагмент фиксирован перед криоконсервацией (контроль), другой – после криоконсервации и размораживания. Кусочки овариальной ткани обезвоживались и заключались в парафин. Ступенчатые срезы толщиной 5–6 микрон выполнялись через 20 микрон и окрашивались гематоксилином и эозином.

Морфологическое исследование проводили с использованием системы компьютерного анализа микроскопических изображений и программного обеспечения «Видеотест-Морфология 4.0». Подсчет фолликулов осуществлялся на основании просмотра всех ступенчатых срезов таким образом, чтобы исключить возможность повторного подсчета одного и того же фолликула. Статистическая обработка результатов выполнялась с использованием программного обеспечения Statistica 5.5.

Результаты исследования и обсуждение

Гистологическое исследование овариальной ткани выполнено во всех исследуемых случаях до и после криоконсервации и размораживания. Всего при гистологическом исследовании проанализировано 270 фолликулов. Для оценки структурной целостности фолликулов и стромы после

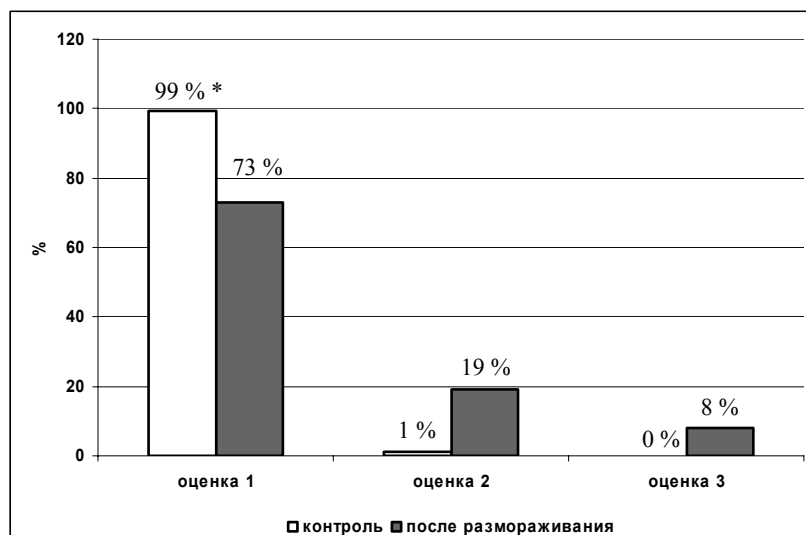


Рис. 1. Результаты гистологической оценки структуры фолликулов в овариальной ткани.
* – $p < 0,05$

криоконсервации и размораживания использовали полуколичественный анализ. Качество фолликулов и стромы оценивали по трехбалльной системе [6].

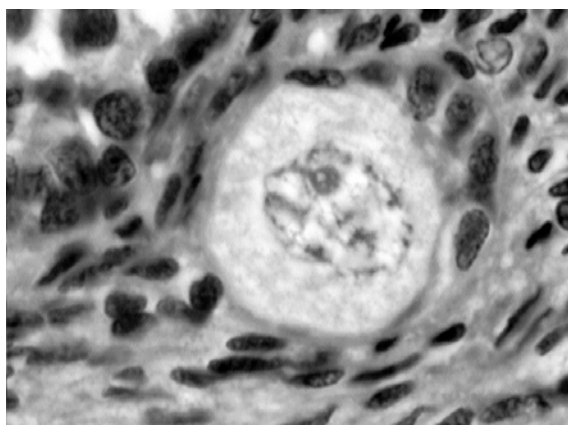
Была оценена стадия развития фолликулов до и после криоконсервации / размораживания. По морфологическим признакам фолликулы были разделены на примордиальные, первичные, вторичные и преантральные в соответствии с классификацией по A. Gougeon [7].

Среднее количество фолликулов, оцененных как жизнеспособные, в контрольной группе составило 99 % (рис. 1). Среднее количество фолликулов, оцененных как жизнеспособные после криоконсервации / размораживания, составило 73 % ($p < 0,05$). Повреждений (оценка 2 и 3) гистологической структуры стромы в контроле и после криоконсервации / размораживания не зафиксировано.

Важным этапом сохранения овариального кортекса является временной период перед криоконсервацией. По данным литературы, фрагменты яичника можно транспортировать при +4 или +37 °C [8–10]. В нашем исследовании после резекции овариальную ткань доставляли на леду в буфере Дюльбеко с HSA. Сравнивая результаты размораживания, выявлено 73 % сохраненных фолликулов (оценка 1), что составило достоверную разницу в 26 % между контролем и исследуемой группой (см. рис. 1). В работе K. L. Schmidt и соавт. [9] овариальная ткань после овариоэктомии, погружалась в IVF-

среду и также транспортировалась на леду перед криоконсервацией. В данной работе авторами для подтверждения жизнеспособности фолликулов с сохраненной гистологической структурой была выполнена подкожная трансплантация фрагментов овариальной ткани иммунодефицитным мышам. При сопоставлении результатов размораживания и трансплантации разница в числе фолликулов между контролем и исследуемой группой составила приблизительно от 10 до 40 %. J. Hreinsson и соавт. [8] после резекции использовали теплую HEPES-среду с HSA, куда помещали фрагмент яичника после резекции. При использовании данной методики доля сохраненных фолликулов в ткани после размораживания составила 69 %.

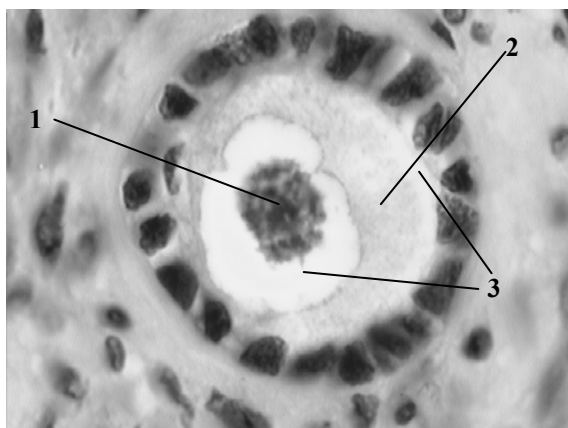
Ооциты в примордиальных фолликулах имеют некоторые характеристики, позволяющие им переживать криоконсервацию лучше, чем ооцитам более зрелых стадий. Наиболее важными являются маленький размер и клеточная стадия ооцита (профаза 1-го мейотического деления), низкая степень метаболизма, отсутствие *zona pellucida*, наличие монослоя гранулезных клеток, которые облегчают эквilibрацию с криопротекторами [11]. Характерное расположение примордиальных фолликулов в аваскулярной зоне также снижает повреждающее воздействие начальных этапов ишемии. В нашем исследовании 19 % фолликулов имело оценку 2, т. е. со слабо выраженными повреждениями (см. рис. 1).



А



Б



В

Из них в большинстве случаев было отмечено наличие пространства между гранулезными клетками и базальной мембраной фолликула (до 30 % поверхности ооцита) (рис. 2). Только в 8 % фолликулов выявлены выраженные повреждения, а именно конденсированное ядро, коллапсированная и эозинофильная цитоплазма ооцита, наличие полостей между гранулезными клетками и базальной мембраной фолликула и перинуклеарные полости (см. рис. 1, 2). С использованием электронной микроскопии показано, что данные полости являются цитоплазматическими зонами, лишенными органелл. Данные пустоты не имеют мембраны, поэтому ошибочно их принимать за вакуоли [12]. Отсутствие повреждений стромы свидетельствовало об успешности этапов дегидратации и криоконсервации. Сохранение клеточных элементов стромы и коллагеновых волокон является важным этапом успешности паракринной регуляции роста примордиальных фолликулов после трансплантации.

Таким образом, криоконсервация овариальной ткани позволяет сохранить пул примордиальных фолликулов, которые состав-

ляют основу овариального резерва. Оказалось, что 73 % фолликулов овариального кортекса сохраняют целостность гистологической структуры после длительной транспортировки на льду и криоконсервации / размораживания.

Криоконсервация овариальной ткани перед лечением, предполагающим цитотоксический эффект, может дать шанс на восстановление фертильности и внести новые возможности в решение социально-психологической проблемы реабилитации онкологических пациенток репродуктивного возраста.

Список литературы

1. Максимов С. Я., Гусейнов К. А. Комбинированное лечение рака шейки матки // Практическая онкология / Под ред. С. А. Тюляндина, В. П. Моисеенко. СПб., 2004.
2. SEER Cancer Statistics Review, 1975–2001 / L. A. G. Ries, M. P. Eisner, C. L. Kosary et al. Bethesda, MD: National Cancer Institute, 2004.
3. *The rising incidence of denocarcinoma relative to squamous cell carcinoma of the*

Рис. 2. Гистологическая оценка структуры фолликулов в овариальной ткани:

А – примордиальный фолликул с полностью сохраненной гистологической структурой (оценка 1), $\times 1000$; Б – примордиальный фолликул с наличием полостей (показано стрелками) (оценка 2), $\times 1000$; В – примордиальный фолликул с конденсированным ядром (1), коллапсированной и эозинофильной цитоплазмой ооцита (2), с наличием перинуклеарных полостей и между гранулезными клетками и базальной мембраной фолликула (3) (оценка 3), $\times 600$

uterine cervix in the United States a 24-year population-based study / H. O. Smith, M. F. Tiffany, C. R. Qualls et al. // *Gynecol. Oncol.* 2000. Vol. 78. P. 97–105.

4. *Livebirth* after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue / J. Donnez, M. M. Dolmans, D. Demylle et al. // *Lancet.* 2004. Vol. 364. P. 1405–1410.

5. *Pregnancy* after transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a patient with ovarian failure after chemotherapy / D. Meirou, J. Levron, T. Eldar-Geva et al. // *N. Engl. J. Med.* 2005. Vol. 353, № 3. P. 318–321.

6. Криоконсервация овариальной ткани у пациенток со злокачественными и доброкачественными новообразованиями органов репродуктивной системы / О. В. Быстрова, Ю. В. Диникина, Н. И. Тапильская и др. // *Журн. акушерства и жен. болезней.* 2006. № 4. С. 252–261.

7. *Gougeon A.* Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses // *Endocr. Rev.* 1996. Vol. 17. P. 121–155.

8. *Cryopreservation* of follicles in human ovarian cortical tissue. Comparison of serum

and human serum albumin in the cryoprotectant solutions / J. Hreinsson, P. Zhang, M. L. Swahn et al. // *Hum. Reprod.* 2003. Vol. 18, № 11. P. 2420–2428.

9. *Density* and distribution of primordial follicles in single pieces of cortex from 21 patients and in individual pieces of cortex from three patients using xenografting / K. L. Schmidt, A. G. Byskow, A. A. Nyboe et al. // *Hum. Reprod.* 2003. Vol. 18. P. 1158–1164.

10. *Preliminary* experience with subcutaneous human ovarian cortex transplantation in the NOD-SCID mouse / F. Weissman, L. Gorlieb, T. Colgan et al. // *Biol. Reprod.* 1999. Vol. 60. P. 1462–1467.

11. *Shaw J. M. et al.* Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue / J. M. Shaw, A. Oranratnachai, A. O. Trounson // *Theriogenology.* 2000. Vol. 1, № 53. P. 59–72.

12. *Gook D. A. et al.* Effect of cooling rate and dehydration regimen on the histological appearance of human ovarian cortex following cryopreservation in 1, 2-propanediol / D. A. Gook, D. H. Ergar, C. Stern // *Hum. Reprod.* 1999. Vol. 14. P. 2061–2068.

Материал поступил в редколлегию 18.03.2007

О. В. Быстрова, Ю. В. Диникина, А. С. Лисьянская, Н. И. Тапильская, Г. М. Маниас

Cryopreservation of ovarian tissue for treatment of the cancer

Cryopreservation of ovarian tissue prior to the cancer treatment effectively preserves the follicles in ovarian cortical tissue in women of reproductive age. The aim of the present study was the histological evaluation of ovarian cortex after cryopreservation and thawing. Biopsies of ovarian cortical tissue were obtained from 4 subjects after laparoscopy or laparotomy. Indications for operation were the following: three cervical cancer (II A, II B), one cancer uteri (I B). Cortical tissue was cut into pieces of 5x10 mm, placed in Dulbecco's PBS with HSA (2,5%), kept on ice and transported for 1.5-2 h to the centre where final dissection and cryopreservation took place. The histological evaluation was performed before cryopreservation and after thawing. After thawing, 73% of the follicles were intact. Thus, transportation of ovarian cortex cooled on ice for period of up to 2 h results in high proportion of intact primordial follicles following cryopreservation. Cryopreservation of ovarian tissue has become an option for fertility preservation of reproductive age women and offers a new opportunity to solve the psychological problems of rehabilitation of oncological patients.

Keywords: sterility, cancer, cryopreservation, ovarian tissue.