

© О. В. Быстрова, Ю. В. Диникина,
Н. И. Тапильская, А. С. Лисянская,
Г. М. Манихас

Российско-финская клиника
«АВА-ПЕТЕР», Санкт-Петербург;
Городской клинический
онкологический диспансер,
Санкт-Петербург;
Санкт-Петербургский государственный
медицинский университет
им. И. П. Павлова: кафедра онкологии

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ ОВАРИАЛЬНОЙ ТКАНИ У ПАЦИЕНТОК СО ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ И ДОБРОКАЧЕСТВЕННЫМИ НОВООБРАЗОВАНИЯМИ ОРГАНОВ РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМЫ

■ Одним из методов, позволяющим сохранить кортикальный слой яичника, содержащий ооциты, у онкологических пациенток репродуктивного возраста, является метод криоконсервации овариальной ткани перед оперативным или терапевтическим лечением. Целью настоящего исследования явилась отработка метода сохранения овариальной ткани, полученной у пациенток со злокачественными и доброкачественными новообразованиями органов репродуктивной системы. Криоконсервация овариальной ткани выполнена у 14 пациенток. Рак шейки выявился в 3-х случаях (II A стадия, T_{2A}N₀M_x), рак тела матки в одном случае (I B стадия, T_{1b}N₀M_x), опухоли яичника с подозрением на малигнизацию — у 10 женщин. Была разработана система гистологической оценки структурной целостности фолликулов и стромы после криоконсервации и размораживания, позволяющая оценить эффективность этапов транспортировки, дегидратации и криоконсервации ткани. Предложена методика пролонгированной транспортировки овариальной ткани после резекции, которая позволяет успешно сохранить ткань перед криоконсервацией. Выявлено сниженное количество фолликулов с сохраненной структурой в контрольных фрагментах ткани, что, вероятнее всего, было связано с причинами, вызванными развитием доброкачественного новообразования яичника. 71 % фолликулов овариального кортекса сохраняет целостность гистологической структуры после длительной транспортировки на льду, криоконсервации и размораживания. Таким образом, 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.

■ **Ключевые слова:** бесплодие; злокачественные опухоли; криоконсервация; фолликулы; овариальная ткань

С каждым годом среди онкологических больных увеличивается доля женщин репродуктивного возраста, не реализовавших свою детородную функцию. Отмечено ежегодное (на 2,1 %) повышение 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 [17]. Из них приблизительно 30 % женщин имеют опухолевый процесс I–II стадии, который обычно излечим с использованием оперативного лечения и лучевой терапии [19].

В последние десятилетия также отмечено значительное увеличение заболеваемости раком тела матки. Несмотря на то, что 7,9 % рака тела матки встречается в возрасте до 45 лет, это составляет более чем 1 800 случаев в год [17].

Из злокачественных новообразований яичников в репродуктивном возрасте встречаются эпителиальный рак (до 30 лет) и герминогенные опухоли. 2/3 дисгермином выявляются в возрасте от 13 до 20 лет и диагностируются на IA стадии опухолевого процесса [8].

Лечение рака яичников, рака эндометрия, рака шейки матки является комплексным и включает в себя хирургическое лечение, химио- и лучевую терапию. При раке шейки матки не всегда удается вывести яичники из зоны облучения, что также приводит к выраженному угнетению функции яичников у женщин и к возникновению синдрома преждевременной менопаузы и потери фертильности. Поэтому современные методы лечения нацелены на сохранение возможности иметь генетически собственного ребенка для женщины репродуктивного возраста. Одним из методов, позволяющим сохранить кортикальный слой яичника, содержащий ооциты, является метод криоконсервации овариальной ткани перед оперативным или терапевтическим лечением.

Современные возможности криобиологии позволяют криоконсервировать овариальную ткань с последующим ее хранением в жидком азоте. Применение криопротекторов и программно-замораживания обеспечивает сохранение овариальной ткани. Дальнейшее размораживание фрагментов овариальной ткани и их гетеротопическая или аутоотопическая трансплантация могут быть шансом на восстановление фертильности и/или исключения развития посткастрационного синдрома. Такая аутоотрансплантация 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 ауто-

рансплантацией фрагментов размороженной ткани в яичник у пациентов, прошедших химиотерапию по поводу лимфомы Ходжкина [12, 15].

Исследования криоконсервации овариальной ткани ведутся с 50-х годов прошлого века. Многочисленные результаты по успешному замораживанию и трансплантации фрагментов овариальной ткани были получены на грызунах, овцах и некоторых видах человекообразных обезьян [2, 3, 13, 14].

Успех замораживания напрямую зависит от количества выживших примордиальных фолликулов, поэтому решающим является как подбор оптимальных условий сохранения овариальной ткани после резекции, так и непосредственно процесс криоконсервации. В связи с этим целью нашего исследования явилась отработка метода сохранения овариальной ткани, полученной у пациенток со злокачественными и доброкачественными новообразованиями органов репродуктивной системы. Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

- отработать метод сохранения овариальной ткани перед криоконсервацией;
- разработать систему морфологической оценки качества фолликулов;
- оценить качество фолликулов до криоконсервации и после размораживания;
- оценить успешность криоконсервации ткани.

Материал и методы

Криоконсервация овариальной ткани выполнена у 14 пациенток, наблюдающихся в Городском онкологическом диспансере Санкт-Петербурга. Данная группа пациенток сформирована на основании клинического диагноза и возраста до 35 лет. В исследуемой группе возраст составил от 23 до 35 лет (средний возраст $30 \pm 3,3$). Рак шейки выявился в трех случаях (IIA стадия, $T_{2A}N_0M_x$), рак тела матки — в одном случае (IB стадия, $T_{1b}N_0M_x$), опухоли яичника с подозрением на малигнизацию — у 10 женщин. При злокачественных опухолях биопсия овариальной ткани размером $20 \times 25 \times 5$ мм была получена в ходе лапароскопии или лапаротомии по основному диагнозу. В случаях опухоли яичника с подозрением на малигнизацию выполнялась цистэктомия в пределах здоровой ткани с обязательной экспресс-биопсией во время операции. В этих случаях минимальный фрагмент здоровой ткани забирался для исследования успешности криоконсервации. 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., UK)

с альбумином (2,5 %) (Sigma). Ткань транспортировали во льду. В течение 1,5 часов ткань доставлялась в клинику «АВА-ПЕТЕР», 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 и толщиной 3 мм. Фрагменты ткани проводили при $+4$ °C по коммерческим средам для криоконсервации (Medicult), содержащим пропандиол и сахарозу. Затем ткань в криовиолах Nunc (Nunclon, Roskilde, Denmark) 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, 10 °C/мин. до -140 °C. После этой температуры криовиолы с тканью погружались в криобанк с жидким азотом (-196 °C). Для контроля криоконсервации 1 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. Таким образом, на контрольное гистологическое исследование отдавали 2 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 $5-6$ мкн выполнялись через 20 мкн и окрашивались гематоксилин-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 (версия 5,5).

Результаты

Гистологическое исследование овариальной ткани было выполнено во всех исследуемых случаях до и после криоконсервации и размораживания. Всего при гистологическом исследовании было проанализировано 458 фолликулов. Была разработана система гистологической оценки структурной целостности фолликулов и стромы после криоконсервации и размораживания. Качество фолликулов и стромы оценивали полуколичественным методом по трехбальной системе (табл. 1, 2).

Таблица 1

Гистологическая оценка качества фолликулов

Оценка	Описание
1	Неповрежденное ядро, неповрежденная цитоплазма, нет полости между гранулезными клетками и базальной мембраной фолликула, нет пикноза в гранулезных клетках (норма)
2	Неповрежденное ядро, неповрежденная цитоплазма, небольшое пространство между гранулезными клетками и базальной мембраной фолликула (до 30 % поверхности ооцита), и/или до 10 % вакуолизации клеток гранулезы, нет пикноза в гранулезных клетках
3	Конденсированное или пикнотическое ядро, коллапсированная цитоплазма ооцита, эозинофилия ооплазмы, наличие полости или полостей между гранулезными клетками и базальной мембраной фолликула, выраженный пикноз в гранулезных клетках

Таблица 2

Гистологическая оценка состояния стромы

Оценка	Описание
1	Многочеточная строма, отсутствие пикнотических ядер в клетках, отсутствие полостей между клетками, без вакуолизации (норма)
2	Наличие немногочисленных пикнотических клеток, слабая вакуолизация, наличие коллапсированных клеток
3	Большое количество пикнотических клеток, выраженная вакуолизация и/или наличие полостей между клетками, наличие коллапсированных клеток

Таблица 3

Оценка качества фолликулов на разных стадиях созревания в контроле и после размораживания в фрагментах овариальной ткани

Оценка качества фолликулов	Доля примордиальных фолликулов, %		Доля первичных фолликулов, %		Доля вторичных фолликулов, %		Доля антральных фолликулов, %	
	контроль	после размораживания	контроль	после размораживания	контроль	после размораживания	контроль	после размораживания
1	77,3	50,8	79,6	30,2	0	90,5	100	100
2	10,9	18,7	6,8	26,5	0	4,8	0	0
3	11,8	30,5	13,6	43,3	0	4,7	0	0

Данные об оценке качества и доли фолликулов разной стадии созревания представлены в таблице 3.

Была оценена стадия развития фолликулов до и после криоконсервации и размораживания (см. табл. 3). По морфологическим признакам фолликулы были разделены на примордиальные, первичные, вторичные, антральные и атретические в соответствии с классификацией по Gougeon A. [10]. Во всех исследуемых случаях атретических фолликулов обнаружено не было. В примордиальных фолликулах первичный ооцит частично или полностью был окружен уплощенными клетками гранулезы (рис. 1). Ядро ооцита имело округлую, объемную форму, с крупным ядрышком и мелкодисперсным хроматином. Примордиальные фолликулы численно преобладали во всех исследуемых случаях, составляя 73 % в контроле и 65 % в фрагментах ткани после размораживания (рис. 2).

В первичном фолликуле ооцит был окружен одиночным слоем кубических клеток гранулезы. Большинство первичных фолликулов обнаруживались в строме кортекса или в кортикомедуллярной зоне. Количество первичных фолликулов было меньше, чем количество примордиальных фолликулов, составляя 27 % в контроле и 28 % в фрагментах ткани после размораживания (рис. 2).

После размораживания были выявлены немногочисленные вторичные фолликулы, имеющие несколько слоев кубических клеток гранулезы, составляя 7 % от общего числа фолликулов (рис. 2). В контрольных фрагментах ткани вторичные фолликулы не были обнаружены.

Среднее количество фолликулов, оцененных как жизнеспособные, в контрольной группе составило 78 % (рис. 3). Среднее количество фолликулов, оцененных как жизнеспособные, после криоконсервации и размораживания составило 49 % (рис. 3). Вы-

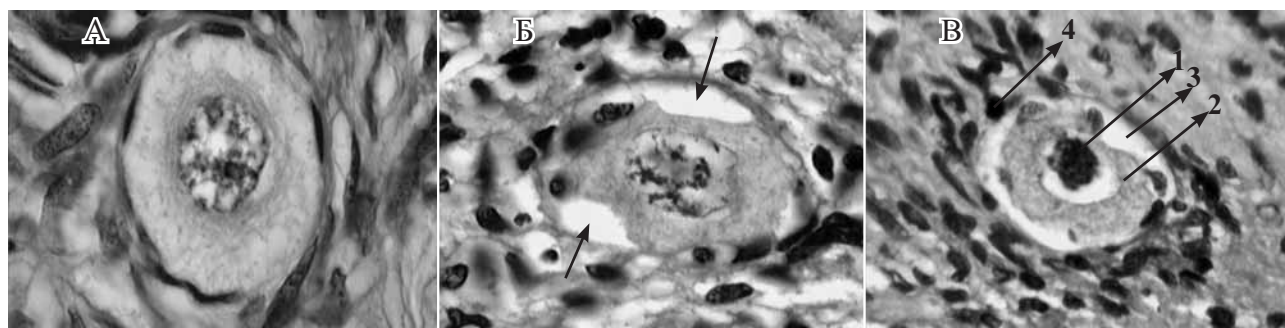


Рис. 1. Гистологическая оценка структуры фолликулов в овариальной ткани.

А — примордиальный фолликул с полностью сохраненной гистологической структурой (оценка 1). Окраска гематоксилин-эозин, $\times 1000$.

Б — примордиальный фолликул с наличием полостей (показано стрелками) между гранулезными клетками и базальной мембраной (оценка 2). Окраска гематоксилин-эозин, $\times 1000$.

В — примордиальный фолликул с конденсированным ядром (1), коллапсирующей и эозинофильной цитоплазмой ооцита (2), с наличием полостей между гранулезными клетками и базальной мембраной фолликула (3), с пикнозом (4) в гранулезных клетках (оценка 3). Окраска гематоксилин-эозин, $\times 600$



Рис. 2. Распределение фолликулов на разных стадиях созревания в контроле и после размораживания в фрагментах овариальной ткани

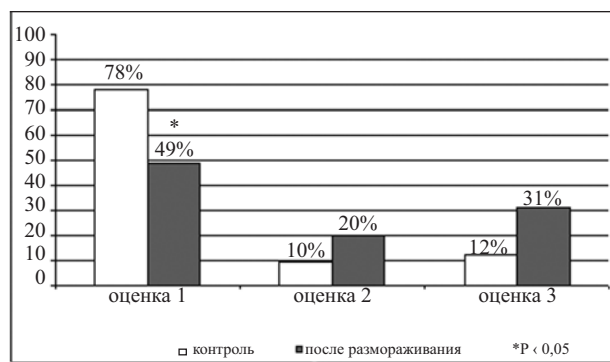


Рис. 3. Результаты гистологической оценки структуры фолликулов в овариальной ткани

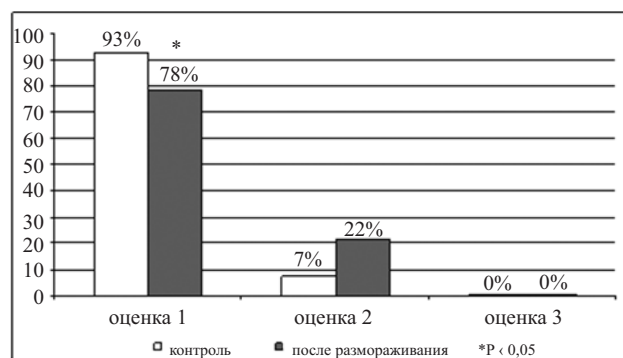


Рис. 4. Результаты гистологической оценки структуры клеточных компонентов стромы

раженных повреждений (оценка 3) гистологической структуры стромы в контроле и после криоконсервации и размораживания не зафиксировано (рис. 4). В 2 случаях после размораживания были выявлены слабо выраженные локальные повреждения стромы в виде вакуализации стромальных клеток (рис. 5). В одном случае слабо выраженные повреждения стромы выявлены как в контроле, так и после криоконсервации и размораживания.

Обсуждение результатов

В литературе описаны несколько методов замораживания овариальной ткани. Был выбран один из них, который наиболее адаптирован к собственным условиям получения материала. Это метод K. L. Schmidt et al. [6], включающий в себя длительную транспортировку овариальной ткани перед криоконсервацией. Одна из ключевых проблем сохранения овариальной ткани — это возникновение ишемии и некроза ткани после операции. Ткань, лишенную нормальной оксигенации, можно сохранить за счет снижения метаболизма. Угнетение метаболизма наилучшим образом достигается с помощью гипотермии, которая обеспечивает сохранение ткани вследствие замедления нормальных катаболических процессов и снижения потребности в кислороде. Поэтому после резекции овариальную ткань транспортировали на льду в буфере Дюльбеко с альбумином. K. L. Schmidt et al. [6] было показано, что данная методика успешно сохраняет примордиальные, первичные и вторичные фолликулы. Так, число фолликулов в ткани после трансплан-

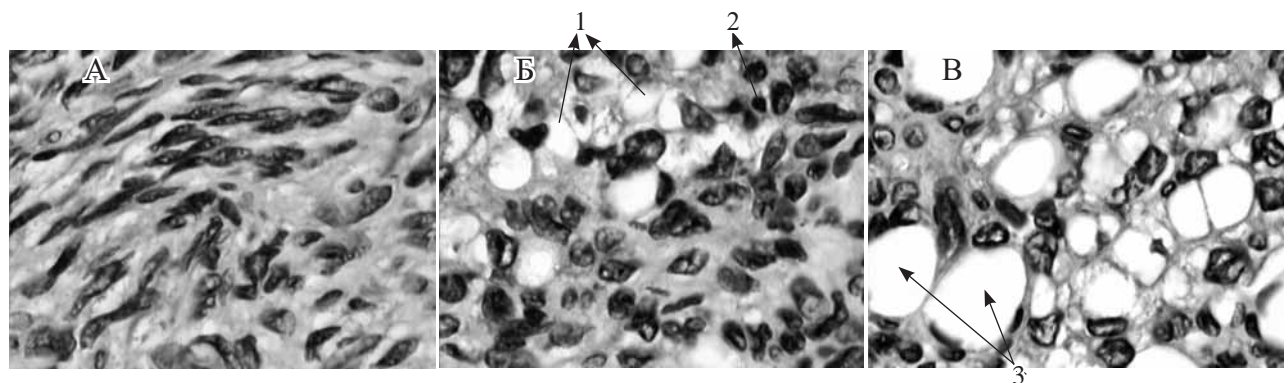


Рис. 5. Гистологическая оценка структуры стромы овариальной ткани.

А — многоклеточная строма с сохраненной гистологической структурой (оценка 1). Окраска гематоксилин-эозин, $\times 1000$.

Б — строма со слабо выраженной вакуолизацией (1), с наличием единичных пикнотических клеток (2) (оценка 2). Окраска гематоксилин-эозин, $\times 1000$.

В — строма с выраженной вакуолизацией клеток, с наличием коллапсированных клеток (оценка 3). Окраска гематоксилин-эозин, $\times 1000$.

тации под кожу иммунодефицитным мышам было снижено, но сопоставимо с контрольными фрагментами ткани и составляло разницу от 10 до 40 %. В нашем исследовании достоверную разницу в количестве сохраненных фолликулов (оценка 1) между контролем и исследуемой группой составило 29 % (см. рис. 3).

В нашем исследовании было отмечено очень неравномерное распределение фолликулов в ткани, что совпадает с данными зарубежной литературы [6, 11, 16]. Так, количество фолликулов варьировало на один порядок как между фрагментами ткани, так и от ступенчатого среза к срезу у одной пациентки. Для того чтобы избежать неоднократного подсчета одного и того же фолликула выполняли ступенчатые гистологические срезы через 20 мкм, т. к. размер примордиального фолликула составляет около 30–40 мкм [7].

По данным литературы, доля сохраненных фолликулов в ткани, фиксированной после резекции, составляет 96–99 % [4, 9, 16]. В исследованиях Gook et al. [9] показанием для биопсии овариальной ткани было цитотоксическое лечение злокачественных новообразований, вызывающее разрушение фолликулярного аппарата. В других исследованиях биопсия овариальной ткани была получена с согласия пациентки после лапароскопии или лапаротомии на основании показаний, не связанных с поражением органов репродуктивной системы [4, 5]. В настоящем исследовании впервые был проведен анализ криоконсервации овариальной ткани, находившейся рядом с доброкачественным новообразованием яичника. Вероятно, наличие новообразования может быть связано с ухудшением качества фолликулов в окружающей ткани. Так, в настоящем исследовании было показано, что в контрольных фрагментах ткани количество фолликулов с сохраненной структурой составило 78 %. Кроме того, в одном случае было прослежено слабо выра-

женное повреждение стромы как в контроле, так и в ткани после криоконсервации/размораживания (см. рис. 5). Немногочисленные фолликулы, в которых отмечались гиперэозинофилия и коллапсированная цитоплазма, конденсированное ядро (оценка 3) (см. рис. 2) были обнаружены в контрольном фрагменте ткани и в ткани после размораживания. Скорее всего, наличие поврежденных фолликулов как в контроле, так и после размораживания свидетельствует о причинах, вызванных развитием доброкачественного новообразования яичника.

Во многих работах показаны морфологические признаки повреждения ткани, характерные для процессов замораживания. Так, 92 % стромы кортикальной части яичника состоят из клеточных компонентов и коллагеновых волокон, тогда как в замороженной ткани их количество достоверно снижается. При электронной микроскопии были выявлены разрывы коллагеновых волокон и лизис стромальных клеток [9]. В норме вакуоли могут занимать до 10 % цитоплазмы ооцита. Электронномикроскопическое исследование поврежденных ооцитов после размораживания показало наличие значительных областей цитоплазмы, лишенных органелл и/или содержащих многочисленные вакуоли [9]. Данные повреждения хорошо визуализируются и при световой микроскопии.

Метод криоконсервации овариальной ткани позволяет успешно сохранить пул примордиальных фолликулов, которые являются основным составляющим овариального резерва. Ооциты в примордиальных фолликулах имеют ряд характеристик, позволяющих им благоприятно пережить криоконсервацию по сравнению с более поздними стадиями созревания. Маленький размер ооцита, окружающие его клетки гранулезы, которые облегчают его эквilibрацию с криопротекторами, низкая степень метаболизма, отсутствие *zona pellucida* и клеточная стадия ооцита

(профаза 1-го мейотического деления) позволяют примордиальным фолликулам благоприятно переносить замораживание [18].

Таким образом, исследование показало, что 71 % фолликулов овариального кортекса сохраняют целостность гистологической структуры после длительной транспортировки на льду и криоконсервации и размораживания. Сохраненная структура гранулезных клеток, ооцита, клеток стромы и коллагеновых волокон, окружающих фолликул, свидетельствует об эффективности этапов дегидратации и криоконсервации.

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 нам основания предполагать о выживании овариальной ткани и готовности использования ее для трансплантации.

Криоконсервация овариальной ткани — это специальная методика, которая на данный момент отсутствует в любом онкологическом учреждении. Криоконсервация и хранение овариальной ткани является прерогативой специалистов клиники вспомогательных репродуктивных технологий. Для осуществления метода необходимо специальное оборудование, среды и штат обученных специалистов, что выходит за рамки онкологической службы. Разработанная нами пролонгированная методика транспортировки дает возможность выполнить одновременно хирургическое вмешательство и взятие материала в онкологическом учреждении с последующей доставкой материала в специальный центр для проведения криоконсервации. Таким образом, 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.

Литература

1. Максимов С. Я. Комбинированное лечение рака шейки матки / Максимов С. Я., Гусейнов К. А. // Практическая онкология / Под ред. С. А. Тюляндина, В. П. Моисеенко. — СПб.: Центр ТОММ, 2004.
2. Candy C. J. Follicular development in cryopreserved marmoset ovarian tissue after transplantation / Candy C. J., Wood M. J., Whittingham D. G. // Hum. Reprod. — 1995. — Vol. 10. — P. 2334–2338.
3. Candy C. J. Restoration of a normal reproductive lifespan after grafting of cryopreserved mouse ovaries / Candy C. J., Wood M. J., Whittingham D. G. // Hum. Reprod. — 2000. — Vol. 15. — P. 1300–1304.
4. Cryopreservation of follicles in human ovarian cortical tissue. Comparison of serum and human serum albumin in the cryoprotectant solutions / Hreinsson J., Zhang P., Swahn M. L. [et al.] // Hum. Reprod. — 2003. — Vol. 18, N 11. — P. 2420–2428.
5. Cryopreservation of human ovarian tissue using dimethylsulphoxide and propanediol-sucrose as cryoprotectants / Hovatta O., Silye R., Krausz T. [et al.] // Hum. Reprod. — 1996. — Vol. 11, N 6. — P. 1268–1272.
6. 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 / Schmidt K. L., Byskow A. G., Nyboe A. A. [et al.] // Hum. Reprod. — 2003. — Vol. 18. — P. 1158–1164.
7. Faddy M. A mathematical model of follicle dynamics in the human ovary / Faddy M., Gosden R. // Hum. Reprod. — 1995. — Vol. 10. — P. 770–775.
8. Gershenson D. M. Menstrual and reproductive function after treatment with combination chemotherapy for malignant ovarian germ cell tumors / Gershenson D. M. // J. Clin. Oncol. — 1988. — Vol. 6. — P. 270–275.
9. Gook D. A. Effect of cooling rate and dehydration regimen on the histological appearance of human ovarian cortex following cryopreservation in 1, 2-propanediol / Gook D. A., Ergar D. H., Stern C. // Hum. Reprod. — 1999. — Vol. 14. — P. 2061–2068.
10. Gougeon A. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses / Gougeon A. // Endocr. Rev. — 1996. — Vol. 17. — P. 121–155.
11. Lass A. Assessment of ovarian reserve: is there still a role for ovarian biopsy in the light of new data? / Lass A. // Hum. Reprod. — 2004. — Vol. 19. — P. 467–469.
12. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue / Donnez J., Dolmans M. M., Demylle D. [et al.] // Lancet. — 2004. — Vol. 364. — P. 1405–1410.
13. Ovarian tissue banking in patients with Hodgkin's disease: is it safe? / Meirou D., Ben Yehuda D. B., Prus D. [et al.] // Fertil. Steril. — 1998. — Vol. 69. — P. 996–998.
14. Parkes A. S. Regeneration of rat ovarian tissue grafted after exposure to low temperatures / Parkes A. S., Smith A. U. // Proc. Roy. Soc. Lond. — 1953. — Vol. 140. — P. 455–467.
15. Pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a patient with ovarian failure after chemotherapy / Meirou D., Levron J., Eldar-Geva T. [et al.] // N. Engl. J. Med. — 2005. — Vol. 353, N 3. — P. 318–321.
16. Qu J. Expression of transforming growth factor-alpha, epidermal growth factor and epidermal growth factor receptor in follicles of human ovarian tissue before and after cryopreservation / Qu J., Godin P. A., Donnez J. // Fertil. Steril. — 2000. — Vol. 74. — P. 113–121.

17. SEER Cancer Statistics Review, 1975–2001 / Ries L. A. G., Eisner M. P., Kosary C. L. [et al.]. — Bethesda: National Cancer Institute, 2004.
18. *Shaw J. M.* Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue / Shaw J. M., Oranratnachai A., Trunson A. O. // *Theriogenology*. — 2000. — Vol. 1., N 53. — P. 59–72.
19. *Smith H. O.* The rising incidence of denocarcinoma relative to squamous cell carcinoma of the uterine cervix in the United States — a 24-year population-based study / Smith H. O., Tiffany M. F., Qualls C. R., Key C. R. // *Gynecol. Oncol.* — 2000. — Vol. 78. — P. 97–105.

Статья представлена Э. К. Айламазяном
НИИ акушерства и гинекологии им. Д. О. Отта РАМН,
Санкт-Петербург

CRYOPRESERVATION OF OVARIAN TISSUE IN PATIENTS
WITH MALIGNANT AND BENIGN TUMORS OF
REPRODUCTIVE SYSTEM

Bystrova O. V., Dinikina Y. V., Tapilskaya N. I.,
Lisyanskaya A. S., Manikhas G. M.

■ **Summary:** 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 to evaluate whether primordial follicles of ovarian cortex survive transportation for up to 2 h prior to cryopreservation. Biopsies of ovarian cortical tissue were obtained from 14 subjects after laparoscopy or laparotomy. Indications for operation were the following: three cervical cancer (II A), one cancer uteri (I B) and ten ovary tumor suspected malignization. Cortical tissue was cut into pieces of 5 × 10 mm, placed in Dulbecco's PBS with albumin (2,5 %), kept on ice and transported for 1,5–2 h to the centre where final dissection and cryopreservation took place. To evaluate effectiveness of tissue transportation, dehydration and cryopreservation, semiquantitative analysis of histological evaluation of structural integrity of follicles and stroma was proposed. The evaluation was performed before cryopreservation and after thawing. Reduced number of intact follicles in freshly dissected tissue may be related to development of benign ovary tumor. After thawing, 71 % 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.

■ **Key words:** sterility; cancer; cryopreservation; follicles; ovarian tissue