

Угроза потери фертильности у онкологических больных репродуктивного возраста и современные возможности криоконсервации овариальной ткани

А.А. Пароконная, Е.Г. Тырси́на, А.А. Лушникова, М.И. Нечушкин,
Е.Б. Кампова-Полевая, И.Ю. Давыдова
ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Контакты: Анастасия Анатольевна Пароконная ANAPARI@yandex.ru

Решение задачи сохранения репродуктивной функции у онкологических больных на сегодняшний день чрезвычайно актуально, так как противоопухолевое лечение, включающее различные комбинации лучевой и химиотерапии, оперативное вмешательство приводят к истощению овариального резерва и преждевременной менопаузе у женщин репродуктивного возраста. Авторы предлагают к рассмотрению один из методов сохранения фертильности — криоконсервацию овариальной ткани. Подробно описана методика криоконсервации, оценена ее эффективность. Данный метод, по мнению авторов, является одним из наиболее перспективных для сохранения полового материала онкологических больных.

Ключевые слова: рак, репродукция, криоконсервация овариальной ткани

Threat of fertility loss in cancer patients of reproductive age and the current feasibilities of ovarian tissue cryopreservation

A.A. Parokonnaya, E.G. Tyrsina, A.A. Lushnikova, M.I. Nechushkin, E.B. Kampova-Polevaya, I.Yu. Davydova
N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Science

To solve the problem of preserving reproductive function in cancer patients is very urgent today because antitumor treatment comprising different combinations of radio- and chemotherapy and surgery lead to ovarian reserve depletion and premature menopause in reproductive-aged women. The authors propose to consider one of the fertility preservation techniques — ovarian tissue cryopreservation. A procedure for cryopreservation is described in detail; its efficiency is evaluated. In the authors' opinion, this procedure is one of most promising in preserving the sexual material of cancer patients.

Key words: cancer, reproduction, ovarian tissue cryopreservation

Введение

Применение в онкологии современных диагностических и лечебных подходов позволило в последние годы значительно улучшить прогноз целого ряда заболеваний и дать надежду пациентам репродуктивного возраста в последующем иметь детей. С каждым годом все большее число онкологических больных задают вопрос о сохранении способности к деторождению. Так, 57% пациенток в возрасте до 35 лет, больных раком молочной железы (РМЖ), волнует этот вопрос в связи с лечением. Как известно, противоопухолевое лечение, включающее различные комбинации лучевой и химиотерапии, оперативное вмешательство и др., приводит к истощению овариального резерва и преждевременной менопаузе у женщин. При этом недостаточная информированность как врачей, так и пациенток о возможностях современных вспомогательных репродуктивных технологий часто не по-

зволяет решить проблему сохранении фертильности при проведении адекватного лечения.

Влияние химиотерапии на репродуктивную функцию

В современной литературе нет статистически значимых данных о числе пациенток, которые становятся бесплодными после проведенной системной терапии. И это понятно, поскольку исход лечения зависит от целого ряда факторов: от препарата, дозы, длительности и режима лечения, способа применения (перорально или внутривенно), возраста пациента, его первоначальной репродуктивной возможности и многих других причин. Химиотерапия стоит на 3-м месте (7%) по риску преждевременной недостаточности яичников при идиопатических формах, включая аутоиммунные (58%), и синдроме Шерешевского — Тернера (23%). С развитием дисфункциональных нарушений яичников ассоциируются активно применяемый в клинической практике циклофосфан и антраци-

клиновые антибиотики [1]. Антиметаболиты — метотрексат, 5-фторурацил — в меньшей степени угнетают овариальную функцию. Комбинации этих препаратов и режимы химиотерапии в различной степени соответственно оказывают влияние на овариальный резерв [2–4]. Яичники женщин в возрасте после 40 лет более подвержены отрицательному влиянию цитостатиков, а репродуктивная функция молодых пациенток более устойчива. Отчасти это можно объяснить заведомо более «мощным» запасом созревающих фолликулов. Бесплодие после химиотерапии у женщин среднего репродуктивного возраста наблюдается в 30–70%. Количество покидающих покоящийся пул примордиальных фолликулов зависит от возраста женщины, поэтому число антральных фолликулов у женщин в возрасте 20 лет в 7–10 раз больше, чем у 44-летних [5, 6].

В 2006 г. ASCO был оценен риск возникновения аменореи у онкологических больных, перенесших лечение, включающее химиотерапию. Высокому риску развития аменореи (более 80%) подвержены женщины в возрасте 40 лет и старше, получившие 6 курсов с использованием препаратов циклофосфан, метотрексат, фторурацил, доксорубин, эпирубин. Те же препараты, но используемые у женщин в возрасте 30–39 лет, ассоциируются со средним риском потери фертильности. Схемы ABVD, CHOP, CVP, CMF, CEF, CAF, применяемые у женщин в возрасте до 30 лет, ассоциируются с низким риском (менее 20%). Винкристин, метотрексат и фторурацил рассматриваются ASCO как препараты «очень низкого риска» потери фертильности. Воздействие таксанов, оксалиплатина, моноклональных антител (трастузумаб), иринотекана, ингибиторов тирозин киназы (эрлотиниб/тарцева, gefitinib/иресса) на репродуктивную функцию пока не изучено [7].

Лучевая терапия и репродуктивная функция

Фертильность во многом зависит от возраста женщины, а также поля и общей дозы облучения. Если доза превышает 1,5 Гр, возможно временное прекращение менструаций. При дозе 4 Гр погибает приблизительно половина фолликулов в яичниках. С увеличением возраста снижается «стерилизующая» доза: 4–6 Гр у женщин в менопаузе и 20 Гр у женщин до 40 лет.

Оперативное вмешательство. Ряд онкологических заболеваний репродуктивных органов при достаточно благоприятном прогнозе требуют в ряде случаев радикального оперативного подхода с тотальным удалением органов репродукции, что соответственно ведет к полной потере фертильности.

Методы забора половых клеток для экстракорпорального оплодотворения (ЭКО), применяемые в практике клиник репродуктивной медицины, сегодня используются и у онкологических больных

в качестве превентивных мероприятий, позволяющих сохранить генетический материал до начала агрессивного лечения. Однако, если при программе ЭКО возможно немедленное использование полученного материала, то в случае онкологических пациентов требуется надежный способ для временного сохранения гамет. Одним из таких методов является криоконсервация овариальной ткани.

Криоконсервация ткани яичника

Современные возможности позволяют криоконсервировать овариальную ткань с последующим долгосрочным хранением в жидком азоте. Метод достаточно прост в исполнении. Забор ткани яичника выполняется лапароскопически под общей анестезией. Для увеличения доли примордиальных фолликулов (не менее 1000) рекомендуется забор достаточного количества кортикального овариального слоя яичника, что примерно соответствует его минимальному объему 50 мм³ для женщин в возрасте до 34 лет. Овариальная ткань несет в себе незрелые ооциты (примордиальные и первичные фолликулы). Для оплодотворения такие фолликулы должны пройти стадию созревания *in vivo* или *in vitro*. Ооциты из встречающихся крупных антральных фолликулов собирают и замораживают отдельно. Для дозревания фолликулов в организме (*in vivo*) размороженные фрагменты овариальной ткани обратно пересаживают женщине — или в яичники (ортотопическая аутооттрансплантация), или в другой орган (гетеротопическая аутооттрансплантация) [5, 8–14]. Для тех пациенток, у которых проведение аутооттрансплантации невозможно, возможна попытка культивирования размороженной ткани в условиях *in vitro* с последующим изолированием незрелых ооцитов. Дальнейшая программа *in vitro* maturation (IVM) представляет собой разновидность вспомогательных репродуктивных технологий, при которой заведомо незрелые ооциты проходят дозревание и инсеминацию «в пробирке», а затем полученные эмбрионы переносят в матку женщины.

Начатые еще в 2000 г. попытки трансплантации криоконсервированной овариальной ткани уже привели к рождению первых детей [11]. Так, в 2004 г. в Бельгии пациентка после перенесенной химиотерапии в результате применения этой методики родила здорового ребенка. Врачами из Израиля за последние 10 лет была криоконсервирована ткань яичников 56 пациенток с различными гематологическими заболеваниями (33 — с Ходжкинской лимфомой; 14 — не Ходжкинской лимфомой; 6 — острым лейкозом; 3 — миелоидным лейкозом) [7]. А в 2005 г. в Израиле родился ребенок после ортотопической трансплантации с последующим проведением ЭКО. Попытки гетеротопной трансплантации (под кожу или в специально созданную «сумку» в брюшной полости) находятся на

этапе эксперимента [10]. Еще одним разрабатываемым методом для развития и созревания фолликулов является метод ксенографтинга (ксенотрансплантации) [8]. На модели животных было показано, что овариальная ткань человека может восстанавливать функцию при ее переносе в яичники некоторых животных (мыши, овцы, коровы). Пересадка на время проведения противоопухолевого лечения участков яичника в орган иммуносупрессированного животного с последующим их возвращением пациентке рассматривается как один из перспективных у онкологических больных.

Собственный материал

С 2009 г. в РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН разрабатывается новое научное направление по сохранению и восстановлению репродуктивной функции онкологических больных. Его клинический аспект предполагает определение наиболее эффективных и «безопасных» методов защиты яичников от повреждающего воздействия химиопрепаратов во время лечения, в том числе рассматриваются возможности проведения фармакопротекции яичников с применением агонистов и антагонистов гонадотропин-рилизинг-гормона. Кроме того, необходимо разработать критерии и методики отбора больных для криоконсервации ткани яичника. Биологическая составляющая данного направления на настоящем этапе заключается в разработке оптимальных условий криоконсервации с целью получения после размораживания максимального количества жизнеспособных и функционально активных половых клеток. Целью настоящей работы являлась медико-биологическая оценка возможности применения криоконсервации овариальных фрагментов и последующих процедур их разморозки и культивирования в условиях онкологического центра.

Криоконсервация овариальной ткани осуществлена у 4 больных РМЖ и 2 больных с пограничными опухолями яичников. Предварительно пациентками подписывалось «Информированное согласие на проведение медицинского вмешательства» (форма утверждена в РОНЦ в качестве Приложения За к приказу по РОНЦ РАМН от 24.04.2006 г. №145), где подтверждалось их согласие на использование биологических образцов в медицинских и научных целях с сохранением конфиденциальности информации и указывался экспериментальный характер проводимых манипуляций. Таким образом, полученный материал овариальной ткани не мог быть использован в качестве донорского.

Двусторонняя овариоэктомия с последующей криоконсервацией овариальной ткани осуществлялась в плане комплексного лечения РМЖ. В случаях пограничных опухолей криоконсервации подвергались участки резецированных яичников, свободные от опухоли.

Участок ткани удаленного яичника помещался во флакон со стерильной культуральной средой. В лабораториях онкогеномики и молекулярно-биологических методов исследования НИИ канцерогенеза РОНЦ была проведена витрификация полученной ткани. Для этого в стерильных условиях ткань яичника в питательной среде разделяли скальпелем на фрагменты размером 1–5 мм. Контроль полученных фрагментов осуществляли под бинокулярным микроскопом (Labovet, Leitz, Германия).

Далее иссеченные фрагменты помещали в пробирку, куда при постоянном помешивании постепенно прибавляли раствор этиленгликоля или глицерина для ступенчатого насыщения ткани. Овариальные фрагменты инкубировали в растворе глицерина еще в течение 1 ч, после чего в криопробирках по стандартной методике производили их глубокую заморозку в жидком азоте для длительного хранения. Для оттаивания криопробирку погружали на 1 мин в кипящую воду, фрагменты ткани переносили в раствор сахарозы, где инкубировали 20–30 мин при комнатной температуре. Затем дважды фрагменты отмывали раствором PBS с добавлением 10% эмбриональной сыворотки и дважды — PBS с 15% сыворотки. После чего ткань переносили в культуральную среду RPMI и инкубировали еще 15 мин.

Для оценки жизнеспособности фолликулов использовали прижизненный краситель метиленовый синий (Sigma, США), которым диффузно окрашиваются только мертвые и вступившие в апоптоз клетки (рис. 1, 2). Жизнеспособные фолликулы не окрашиваются, поскольку метиленовый синий задерживается их мембраной.

Первая оценка жизнеспособности фолликулов была проведена непосредственно после размораживания криоконсервированной овариальной ткани. Оказалось, что жизнеспособными остались 11 из 18 примордиальных фолликулов, т. е. 60%.

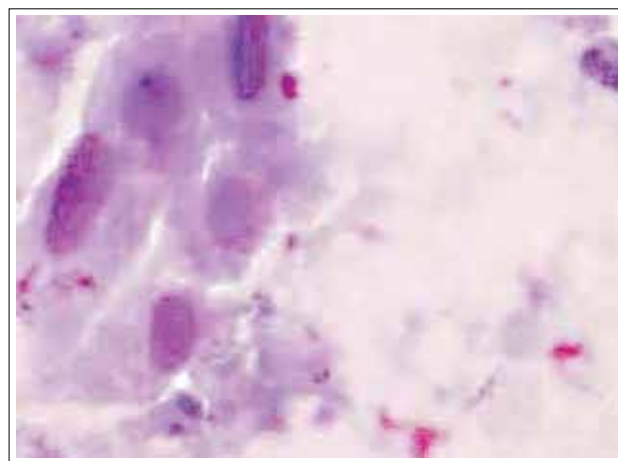


Рис. 1. Жизнеспособные фолликулы (справа). Мертвые клетки и клетки, вступившие в апоптоз (слева)

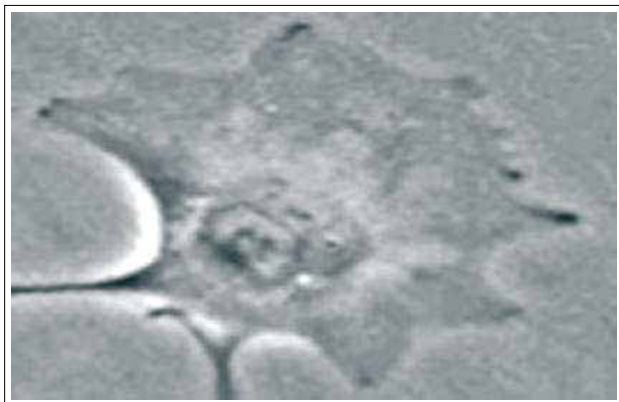


Рис. 2. Апоптоз примордиального фолликула. Фазовый контраст

Следующее определение жизнеспособности проводилось после 2-недельного культивирования фолликулов при температуре 37 °C в атмосфере влажного воздуха с 5% CO₂ в большом объеме культуральной среды F199 (RPMI), содержащей 15% эмбриональной сыворотки и антибиотик гентамицин. После 2-недельного культивирования жизнеспособность сохранили 40–50% фолликулов (3–4 фолликула в поле зрения микроскопа). Таким образом, более 1/3 фолликулов пригодны для оплодотворения после прохождения стадии созревания *in vivo* или *in vitro*. Ясно, что предлагаемая нами методика криоконсервации овариальной ткани требу-

ет не одной серии экспериментов с оценкой жизнеспособности размороженного материала.

Несомненно, эти первые результаты по криоконсервации, размораживанию и культивированию овариальной ткани в условиях *in vitro* (полученные в РОНЦ) диктуют необходимость дальнейших научных исследований, направленных на выявление и, если это возможно, минимизацию потенциально негативных последствий (генетических, цитологических, биохимических и т.д.) применения данных методик. Вместе с тем в будущем, при условии получения положительных результатов в ходе всестороннего исследования размороженных образцов, не исключается возможность использования материала, полученного подобным способом, для гетеротопической или ортотопической трансплантации.

На сегодняшний день наиболее спорными остаются вопросы о «генетической и функциональной сохранности» половых клеток, подвергшихся различным манипуляциям *in vitro*, воздействию криопротекторов и других агентов. Помимо прочего, тщательно должен быть проработан каждый из аспектов, затрагивающих этическую сторону вспомогательных репродуктивных технологий. Тем не менее начало экспериментальных работ в этом направлении открывает новые возможности и перспективы деторождения для онкологических пациенток с благоприятным прогнозом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Manger K., Wildt L., Kalden J., Manger B. Prevention of gonadal toxicity and preservation of gonadal function and fertility in young women with systemic lupus erythematosus treated by cyclophosphamide. *Genomic and proteomic in Autoimmune Diagnostics* 2006;5: 269–72.
2. Lower E.E., Blau R., Gazder P. et al. The risk of premature menopause induced by chemotherapy for early breast cancer. *J Womens Health Gend Based Med* 1999;8:949–54.
3. Meirou D., Schiff E. Appraisal of chemotherapy effects on reproductive outcome according to animal studies and clinical data. *J Natl Cancer Inst Monographs* 2005; (34): 21–5.
4. Oktay K., Reh A., Vahdat L. Measuring the impact of chemotherapy on fertility in women with breast cancer. *JCO* 2006;24:4044–6.
5. Meirou D., Baum M., Yaron R., Levron J., Hardan I., Schiff E., Nagler A., Yehuda D.B. Ovarian tissue cryopreservation in hematologic malignancy: ten years' experience. *Leuk Lymphoma* 2007;48 (8):1569–76.
6. Walshe J., Denduluri N., Swain S. Amenorrhea in Premenopausal Women After Adjuvant Chemotherapy. *Breast Cancer J Clin Oncol* 2006; 24:5769–79.
7. Lee S., Schover L., Partridge A. et al. American society of clinical oncology recommendations on fertility preservation in cancer patients. *J Clin Oncol* 2006;24(18):2917–31.
8. Левков Л. Криоконсервирование овариальной ткани человека: современное состояние. Тезисы докладов научно-практической конференции «Современные возможности вспомогательных репродуктивных технологий». СПб., 2006; с. 23 –24.
9. Donnez J., Dolmans M.M., Demylle D. et al. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet* 2006;364:1405–10.
10. Oktay K., Economos K., Kan M. et al. Endocrine function and oocyte retrieval after autologous transplantation of ovarian cortical strips to the forearm. *JAMA* 2001;286:1490–3.
11. Oktay K., Karlikaya G. Ovarian function after transplantation of frozen, banked autologous ovarian tissue. *N Engl J Med* 2000;342: 1919.
12. Poirot C., Vacher-Lavenu M.C., Helardot P. et al. Human ovarian tissue cryopreservation: Indications and feasibility. *Hum Reprod* 2002;17:1447–52.
13. 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.
14. Tryde Schmidt K.L., Yding Andersen C., Starup K. Orthotopic autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue to a woman cured of cancer - follicular growth, steroid production and oocyte retrieval. *Reprod Biomed Online* 2004;8:448–53.