

УДК 611.651.1.018:57.043:616.089

В.В. Киروشка

## Криоконсервирование и трансплантация овариальной ткани как метод восстановления эндокринной и репродуктивной функций

UDC 611.651.1.018:57.043:616.089

V.V. Kiroshka

### Cryopreservation and Transplantation of Ovarian Tissue as Method of Endocrine and Reproductive Functions Restoration

**Реферат.** В обзоре представлен анализ современной литературы существующих методов криоконсервирования и трансплантации овариальной ткани для восстановления репродуктивной и эндокринной функции. Приведены успешные результаты их применения как на различных экспериментальных моделях животных, так и в клинической практике. В статье отмечены основные технические трудности, которые необходимо преодолеть для широкого внедрения в клиническую практику методов криоконсервирования и трансплантации овариальной ткани.

**Ключевые слова:** овариальная ткань, режимы замораживания-отогрева, трансплантация, репродуктивная функция.

**Реферат.** В огляді подано аналіз сучасної літератури існуючих методів криоконсервування і трансплантації овариальної тканини для відновлення репродуктивної та ендокринної функції. Наведено успішні результати їх застосування як на різних експериментальних моделях тварин, так і в клінічній практиці. У статті зазначено основні технічні труднощі, які необхідно подолати для широкого впровадження в клінічну практику методів криоконсервування і трансплантації овариальної тканини.

**Ключові слова:** овариальна тканина, режими заморожування-відігріву, трансплантація, репродуктивна функція.

**Abstract.** The review represents the state of art in existing methods for cryopreservation and transplantation of ovarian tissue used for restoration of reproductive and endocrine function. The successful outcomes of their application are shown both in experimental animal models and in clinical practice. The paper describes the main technical obstacles, which should be overcome to introduce into clinic the methods of cryopreservation and transplantation of ovarian tissue.

**Key words:** ovarian tissue, freeze-thawing regimens, transplantation, reproductive function.

По данным Всемирной организации здравоохранения бесплодие в Украине установлено у 15% супружеских пар, что ведет к ухудшению демографических показателей в стране. Известны разные причины снижения репродуктивной функции взрослого населения: гинекологические, генетические, эндокринные, иммунологические, а также связанные с заболеваниями, перенесенными в детстве, и имеющие идиопатический характер. Кроме того, применение высокодозовой химио- и радиотерапии в современной онкологии для достижения эффективности лечения оказывает отрицательное побочное действие на репродуктивные органы [1, 5]. У женщин это проявляется в снижении овариального резерва, пула ооцитов или в атрофии ткани яичника,

According to the data of the World Health Organization the infertility in Ukraine is observed in 15% married couples that leads to the degradation of demographic indices in the country. There are known various reasons of decreasing the reproductive functions of adult population: gynecological, genetic, endocrine, immunological as well as the ones associated with the diseases in childhood and having an idiopathic character. Moreover, the application of high-dose chemo- and radiotherapy in contemporary oncology used to increase the efficiency of the treatment has a negative side effect on reproductive organs [1, 5]. Women have it manifested in decrease of ovarian reserve and pool of oocytes or atrophy of ovarian tissue, premature menopause or decreased reproductive function [1, 34, 36].

Отдел криобиохимии и фармакологии нейрогуморальных систем, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

**Адрес для корреспонденции:**

ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015;  
тел.: (+38 057) 373-30-07, факс: (+38 057) 373-30-84,  
электронная почта: vvkiroshka@mail.ru

Поступила 23.01.2013

Принята в печать 15.02.2013

Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2013. – Т. 23, №1. – С. 4–14.  
© 2013, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

Department of Cryobiochemistry and Pharmacology of Neurohumoral Systems, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

**sAddress for correspondence:**

23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015;  
tel.: +380 57 373 3007, fax: +380 57 373 3084,  
e-mail: vvkiroshka@mail.ru

Received January, 23, 2013

Accepted February, 15, 2013

Problems of Cryobiology and Cryomedicine. – 2013. – Vol. 23, Nr. 1. – P. 4–14.  
© 2013 Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

преждевременной менопаузе или сниженной репродуктивной функции [1, 34, 36]. В настоящее время стандарт сохранения репродуктивного потенциала женщин – стимуляция функции яичников для забора ооцитов и их криоконсервирование или оплодотворение зрелых ооцитов и криоконсервирование полученных эмбрионов [47]. Основная сложность применения этих методов – необходимость проведения процедуры суперовуляции для получения большого количества зрелых ооцитов. Также существуют трудности, связанные с криоконсервированием зрелых ооцитов, имеющих большой объем цитоплазмы клеток, высокий уровень метаболизма и хромосомы в стадии метафазы мейоза II [6]. Важно отметить, что стимуляция функции яичников невозможна в детском возрасте [47].

В современной репродуктивной медицине криоконсервирование и трансплантация овариальной ткани являются наиболее перспективными методами сохранения репродуктивного потенциала и восстановления эндокринной функции у пациентов как после курсов химио- и радиотерапии, так и при патологиях яичников различного генеза [15]. Преимущества данного метода – отсутствие предварительной гормональной стимуляции, возможность забора различных слоев ткани в любое время, достаточный фолликулярный запас в кортикальном слое яичника (от 15 до 100 примордиальных фолликулов на 1 мм<sup>3</sup>), который необходим для криоконсервирования [13, 14].

На сегодняшний день получены результаты успешного криоконсервирования и трансплантации овариальной ткани как на разных экспериментальных моделях у животных, так и в клинической практике. Была восстановлена фертильность у мышей после ортотопической трансплантации криоконсервированной овариальной ткани [29, 46, 52]. Gosden R.G. и соавт. показали возможность восстановления детородной функции у овец после ауто-трансплантации овариальной ткани, хранившейся при –196 °C [25]. При ксенотрансплантации криоконсервированной овариальной ткани обезьян иммунодефицитным мышам была восстановлена морфологическая структура ткани яичника доноров, причем количество нормальных фолликулов было сравнимо с таковыми после трансплантации свежесыведенной ткани [10]. В современной мировой практике зарегистрировано несколько случаев рождения здоровых детей после криоконсервирования овариальной ткани и последующей ее ортотопической ауто-трансплантации [3, 14].

Метод трансплантации овариальной ткани используется достаточно давно, однако его сочетание с современными репродуктивными технологиями в клинической практике можно рассматривать как инновационное.

Nowadays the standard for preservation of women reproductive potential is either the stimulation of ovary function for sampling of oocytes and their cryopreservation or fertilization of mature oocytes and cryopreservation of the derived embryos [47]. The main difficulty in application of these methods is the necessity of performing the superovulation to obtain a great number of mature oocytes. There also appear the difficulties associated with the cryopreservation of mature oocytes with a large volume of cell cytoplasm, high level of metabolism and chromosomes at the stage of meiosis metaphase II [6]. It should be noted, that the stimulation of ovary function is impossible in infancy [47].

In contemporary reproductive medicine, the cryopreservation and transplantation of ovarian tissue are the most perspective methods for preservation of reproductive potential and recovery of endocrine function in patients after courses of chemo- and radiotherapy as well as during pathologies of ovaries of different genesis [15]. The advantage of this method is the absence of preliminary hormonal stimulation, possibility of sampling of different tissue layers at any time, sufficient follicular reservoir in ovarian cortical layer (from 15 to 100 primordial follicles per 1 mm<sup>3</sup>) necessary for cryopreservation [13, 14].

Nowadays, successful cryopreservation and transplantation of ovarian tissue were achieved both in various experimental animal models and in clinical practice. The fertility in mice was restored after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue [29, 46, 52]. Gosden R.G. *et al.* showed the possibility to recover reproductive function in sheep after autotransplantation of ovarian tissue stored at –196°C [25]. Xenotransplantation of cryopreserved ovarian tissue of monkeys to immunodeficient mice restored the morphological structure of mice ovarian tissue, moreover, the number of normal follicles was comparable with that after transplantation of freshly isolated tissue [10]. Several cases of birth of healthy children after cryopreservation of ovarian tissue and its following orthotopic autotransplantation have been reported in contemporary world practice [3, 14].

Method of ovarian tissue transplantation has been used for a long time, however its combination with current reproductive technologies in clinical practice may be considered as innovative one.

### **Basic approaches in cryopreserving ovarian tissue**

The difficulty of ovarian tissue cryopreservation is comparable with case of the whole organs as it requires the preservation of heterogenic functional unit of the ovary, the follicle, which consists of several types of somatic cells (granulosa, cumulus, theca) and germ cell (oocyte) differing in size, volume and membrane

## Основные подходы к криоконсервированию овариальной ткани

Сложность криоконсервирования овариальной ткани соизмерима с консервированием целых органов, поскольку требует сохранения гетерогенной функциональной единицы яичника – фолликула, состоящего из нескольких типов соматических клеток (гранулезы, кумулюса, теки) и половой клетки (ооцита), которые отличаются размером, объемом и проницаемостью мембраны. Метод низкотемпературного консервирования овариальной ткани состоит из нескольких этапов: забор ткани, инкубация с криопротектором, замораживание и отогрев. От подбора оптимальных условий на всех перечисленных выше этапах зависит сохранение жизнеспособности овариальной ткани.

Первые попытки, сделанные в 50-х годах прошлого столетия, по замораживанию овариальной ткани грызунов под защитой глицерина, успеха не имели [27, 46]. На протяжении последующих 20 лет результаты работ, связанные с криоконсервированием ткани яичника, практического применения не получили. Разработка и внедрение в 70-х годах новых криозащитных веществ (пропандиол, этиленгликоль и диметилсульфоксид) в криобиологическую практику послужили началом нового этапа исследований в данном направлении. Одна из пионерских работ была выполнена В.И. Грищенко и соавт. в ИПКиК НАН Украины, в которой показано, что подкожная аллотрансплантация овариальной ткани, криоконсервированной под защитой полиэтиленгликоля с молекулярной массой 400, приводила к восстановлению эстрального цикла у пациенток [2, 28]. В 90-х годах было проведено несколько успешных экспериментов по низкотемпературному консервированию овариальной ткани в присутствии ДМСО [12, 25, 29]. У 86% овариоэктормированных животных удалось восстановить эстральный цикл после трансплантации под капсулу почки криоконсервированной овариальной ткани, если использовался быстрый отогрев образца и у 25% – медленный [12]. Аналогичные результаты были получены Gosden R.G. и соавт. после ортотопической трансплантации фрагментов коркового слоя яичника овцы, которые были заморожены до  $-196^{\circ}\text{C}$  в присутствии ДМСО [25]. Исследования, проведенные Novatta O. и соавт. в 1996 г. [30], доказали устойчивость овариальной ткани человека к низкотемпературному консервированию под защитой ДМСО или в сочетании 1,2-пропандиола (1,2-ПД) и сахарозы. Сохранение структурной целостности фолликулов, компонентов стромы, а также архитектоники ткани после замораживания-отогрева было основанием для предположения о сохранении жизнеспособности овариальной ткани

permeability. Method of low-temperature preservation of ovarian tissue involves several stages: sampling of tissue, incubation with cryoprotectant, freezing and thawing. The selection of optimal conditions at all the mentioned stages affects the preservation of ovarian tissue viability.

The first attempts performed in the 1950s to freeze rodent ovarian tissue under protection of glycerol failed [27, 46]. During the following 20 years the results of researches on cryopreservation of ovarian tissue were not used in practice. In the 1970s the development and implementation of new cryoprotective substances (propane diol, ethylene glycol and dimethyl sulfoxide) into cryobiological practice pre-conditioned the beginning of new stage of investigations in this direction. One of the pioneer works performed by the laboratory of V.I. Grischenko at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine showed that subcutaneous allotransplantation of ovarian tissue cryopreserved under protection of polyethylene glycol with molecular weight of 400 resulted in the restoration of estrous cycle in the patients [2, 28]. In the 90s several successful experiments on low-temperature preservation of ovarian tissue with DMSO were carried-out [12, 25, 29]. Estrous cycle was restored in 86% of ovariectomized animals after transplantation under renal capsule of cryopreserved ovarian tissue if the biospecimen was rapidly thawed and only in 25% – if slow regimen was applied [12]. Similar results were obtained by Gosden R.G. *et al.* after orthotopic transplantation of sheep ovarian cortex fragments cooled down to  $-196^{\circ}\text{C}$  in the presence of DMSO [25]. The studies performed by Novatta O. *et al.* in 1996 [30] revealed the resistance of human ovarian tissue to low-temperature preservation under protection of DMSO or of combined 1,2-propanediol (1,2-PD) with sucrose. Preservation of structural integrity of follicles, stromal components as well as tissue architectonics after freeze-thawing allowed to suggest the preservation of human ovarian tissue viability and possibility of its use for transplantation. Resistance of ovarian tissue to cryoinjury and a high degree of survival of primordial follicles were evidenced also by other researchers [7, 39].

Presently the cryopreservation of ovarian tissue mainly involves two cryoprotectants, DMSO and 1,2-PD. Basic protocol of low-temperature preservation of sheep ovarian tissue under DMSO protection was developed by Gosden R.G. *et al.* in 1994, which involved the laparoscopic sampling of an entire ovary or its cortical layer, further cutting of the tissue into  $1\times 1$  mm fragments on ice. The equilibration of ovarian tissue fragments was carried out for 15 min at  $4^{\circ}\text{C}$  in the physiological saline with 1.5 M DMSO and supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS). Controlled

человека и возможности ее использования для трансплантации. Устойчивость овариальной ткани к криповреждениям и высокий уровень сохранности фолликулов примордиальной стадии были подтверждены и другими исследователями [7, 39].

В настоящее время для криоконсервирования овариальной ткани преимущественно используют два криопротектора – ДМСО и 1,2-ПД. Основоплагающий протокол низкотемпературного консервирования под защитой ДМСО для овариальной ткани овцы был разработан Gosden R.G и соавт. в 1994 г., согласно которому забор целого яичника или его кортикального слоя проводили лапароскопически, после чего ткань измельчали на фрагменты размером 1×1 мм на льду. Эквилибрацию фрагментов овариальной ткани в физиологическом растворе в присутствии 1,5 М ДМСО и 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) проводили в течение 15 мин при 4°C. Программное замораживание ткани яичника осуществляли в специальных контейнерах со следующими скоростями охлаждения: до –9°C со скоростью 2 град/мин, затем до –40°C со скоростью 0,3 град/мин и со скоростью 10 град/мин до –140°C, затем образцы погружали в жидкий азот. Для отогрева образцы выдерживали в течение 2 мин на воздухе, затем помещали на водяную баню (22°C). В результате последующей аутоперитрансплантации данной криоконсервированной овариальной ткани появилось потомство [25]. В дальнейшем этот протокол был модифицирован Oktay K. и соавт.: для криоконсервирования овариальной ткани человека в криозащитный раствор, содержащий 1,5 М ДМСО, добавляли 0,1 М сахарозы и увеличивали время эквилибрации ткани яичника с раствором криопротектора до 30 мин при 4°C [42]. В результате использования данного протокола на гистологических срезах овариальной ткани человека после криоконсервирования было выявлено незначительное количество первичных фолликулов [42].

Многочисленные экспериментальные данные, полученные Gook D.A. и соавт. [19–22], показали успешное замораживание фрагментов овариальной ткани под защитой 1,2-ПД. Была проведена оценка морфологической целостности всех структурных элементов овариальной ткани в зависимости от температуры (4 и 22°C) и времени инкубации (15–90 мин) ткани с 1,2-ПД в концентрациях от 1,5 до 4,5 М 1,2-ПД в присутствии 0,1–0,2 М сахарозы или с 10%-й ЭТС [23]. В результате Gook D.A. и соавт. был разработан протокол замораживания овариальной ткани под защитой 1,2-ПД, согласно которому ткань измельчали на фрагменты размером 2×4×1 мм<sup>3</sup> и инкубировали в криозащитном растворе (150 мМ NaCl; 1,5 М 1,2-ПД; 0,1 М сахарозы и 10 мг/мл альбумина) в течение 90 мин при 22°C. Программное замораживание ткани яичника осуществлялось в специальных контейнерах объе-

cooling of ovary tissue was performed in the special containers using the following cooling rates: down to –9°C it was done with 2 deg/min rate, then down to –40°C it was performed with the rate of 0.3 deg/min and 10 deg/min rate down to –140°C, thereafter the samples were plunged into liquid nitrogen. For thawing the samples were kept in air for 2 min, then placed in water bath (22°C). The following transplantation of this cryopreserved ovarian tissue resulted in the appearance of the offspring [25]. Further this protocol was modified by Oktay K. *et al.* as follows: to cryopreserve the human ovarian tissue the cryoprotective solution containing 1.5 M DMSO was supplemented with 0.1 M sucrose and the equilibration time of ovary tissue with cryoprotectant solution at 4°C was increased up to 30 min [42]. Application of this protocol resulted in preservation of few primary follicles revealed in histological sections of human ovarian tissue [42].

A number of experiments performed by Gook D.A. *et al.* [19–22] achieved a successful freezing of ovarian tissue fragments under protection of 1,2-PD. There was assessed morphological integrity of all ovarian tissue structural elements depending on the temperature (4 and 22°C) and duration (15–90 min) of tissue incubation in solution of 1,2-PD in concentration from 1.5 to 4.5 M supplemented with 0.1–0.2 M sucrose or 10% FBS [23]. As a result Gook D.A. *et al.* have developed the protocol for ovarian tissue freezing under 1,2-PD protection according to which the tissue was reduced to 2×4×1 mm<sup>3</sup> fragments and incubated in cryoprotective solution (150 mM NaCl; 1.5 M 1,2-PD; 0.1 M sucrose and 10 mg/ml albumin) during 90 min at 22°C. Programmed freezing of ovary tissue was done in special containers of 1 ml volume with the following cooling rates: down to –7°C it was performed with 2 deg/min rate, then down to –30°C it was done with 0.3 deg/min rate and 50 deg/min down to –150°C and thereafter the specimens were plunged into liquid nitrogen. For thawing the samples were exposed for 2–3 min in water bath at 37°C until the appearance of liquid phase. The following morphological assessment of structural elements in ovarian tissue showed that more than 50% of follicles consisted of undamaged cells of granulosa and oocytes [24].

In spite of considerable success in development of the methods for low-temperature storage of ovarian tissue Sztein J. *et al.* noted the decrease of follicular pool and increase of fibrosis area in transplants of cryopreserved ovarian tissue comparing to the transplants of freshly isolated tissue [52]. Other authors reported DNA fragmentation observed after cryopreservation in primordial and primary follicles [16] as well as the impaired integrity of granulosa cell structure [38]. The application of more novel tests allowed to reveal the expression of abnormal genes in granulosa cells and their apoptosis in transplants of cryopreserved ovarian tissue [35]. In addition, there were some suggestions

мом 1 мл со следующими скоростями охлаждения: до  $-7^{\circ}\text{C}$  со скоростью 2 град/мин, затем до  $-30^{\circ}\text{C}$  со скоростью 0,3 град/мин и со скоростью 50 град/мин до  $-150^{\circ}\text{C}$  с последующим погружением в жидкий азот. Для отогрева образцы выдерживали в течение 2–3 мин на водяной бане при  $37^{\circ}\text{C}$  до появления жидкой фазы. Последующая морфологическая оценка структурных элементов овариальной ткани показала, что более 50% фолликулов состояло из неповрежденных клеток гранулезы и ооцитов [24].

Несмотря на значительный успех в разработке методов низкотемпературного хранения овариальной ткани, Sztein J. и соавт. отмечали уменьшение фолликулярного пула и увеличение площади фиброза в трансплантатах криоконсервированной овариальной ткани по сравнению с трансплантатами из свежeweделенной ткани [52]. В работах других авторов показано, что после криоконсервирования в примордиальных и первичных фолликулах отмечались фрагментация ДНК [16], а также нарушение целостности структуры клеток гранулезы [38]. Использование более современных методов исследования позволило выявить экспрессию аномальных генов в клетках гранулезы и их апоптоз в трансплантатах криоконсервированной овариальной ткани [35]. Кроме того, были высказаны предположения, что криоконсервирование способствует стимуляции апоптоза структурных компонентов ткани яичника, поэтому уменьшается количество растущих фолликулов в культуре криоконсервированной овариальной ткани [11].

Применение витрификационной технологии для криоконсервирования овариальной ткани позволило улучшить сохранность ее стромальных элементов [51]. Электронно-микроскопические исследования структуры внутриклеточных органелл овариальной ткани, проведенные Keros V. и соавт., также показали преимущество использования метода витрификации по сравнению с программным замораживанием [33] для криоконсервирования овариальной ткани крыс и овец с последующей аутоотопической трансплантацией [8, 51], однако при криоконсервировании овариальной ткани человека были получены противоречивые результаты [32].

Таким образом, показано, что метод низкотемпературного хранения овариальной ткани не является оптимальным для широкого внедрения в клиническую практику, поскольку в процессе замораживания-отогрева возникают существенные повреждения, приводящие к нарушению структуры внутриклеточных органелл, снижению количества жизнеспособных фолликулов, увеличению скорости апоптоза клеток гранулезы, а также развитию значительного фиброза ткани после трансплантации. В связи с этим важны оптимизация размеров фраг-

made, that cryopreservation could contribute to the stimulation of apoptosis of ovary tissue structural components, which resulted in the decrease of number of growing follicles in culture of cryopreserved ovarian tissue [11].

The application of vitrification technology for ovarian tissue cryopreservation enabled to improve the preservation of its stromal elements [51]. Electronmicroscopic analysis of ovarian tissue intracellular organelles performed by Keros V. *et al.* also showed the advantage in using the vitrification method if compared to the controlled rate freezing [33] for cryopreservation of rat and sheep ovarian tissue with the following autotopic transplantation [8, 51]. However, the attempts to cryopreserve human ovarian tissue gave the contradictory results [32].

Thus, the method of low-temperature storage of ovarian tissue has been shown not to be an optimal for being implemented widely in clinical practice, since freeze-thawing is accompanied with appearance of significant injuries which induce the disorders in structure of intracellular organelles, decrease in number of viable follicles, arised rate of granulose cells apoptosis as well as development of significant tissue fibrosis after transplantation. In this connection, the issues of optimization of ovary tissue fragments dimensions, selection of cryoprotectant and choosing its concentration, duration and temperature of exposure with tissue as well as development of new freeze-thawing regimens and improvement of existing methods of ovarian tissue cryopreservation for a wide application in clinical practice have remained vitally important.

### **Orthotopic and heterotopic transplantation of ovarian tissue**

The possibility of ovarian tissue transplantation has been studied by scientists and clinicians for a long time. The first researches on the transplantation of reproductive organs including ovarian tissue were performed by Robert Morris at the end of 18<sup>th</sup> century [40]. However, only at the beginning of the 20<sup>th</sup> century after implementation of vascular anastomosis technique the transplantation of reproductive organs acquired a wide application in clinical practice for recovery of endocrine and reproductive function and experimental transplantation as well. Nowadays, one of the approaches of endocrine and reproductive functions restoration in women with ovary pathologies of different genesis can be the complex application of the methods of transplantation of cryopreserved ovarian tissue (ortho- and heterotopic ones) combined with assisted reproductive technologies (*in vitro* fertilization, *in vitro* maturation of follicles). After orthotopic transplantation (onto the ovary surface) the restoration of fertility and development of follicles in favorable environmental conditions are possible, but the transplantation procedure in this



ментов ткани, выбор и определение концентрации криопротектора, времени и температуры экспозиции с тканью, а также разработка новых режимов замораживания-отогрева и совершенствование существующих методов криоконсервирования овариальной ткани для широкого применения в клинической практике.

### **Ортотопическая и гетеротопическая трансплантация овариальной ткани**

Возможность трансплантации овариальной ткани исследуется учеными и врачами на протяжении многих лет. Первые работы по трансплантации репродуктивных органов, в том числе и овариальной ткани, были сделаны Робертом Моррисом в конце 18-го столетия. Однако только в начале 20-го столетия после внедрения техники сосудистых анастомозов трансплантация репродуктивных органов получила широкое распространение как в клинической практике для восстановления эндокринной и репродуктивной функции, так и экспериментальной трансплантологии. В настоящее время одним из подходов восстановления эндокринной и репродуктивной функций у женщин при патологиях яичников различного генеза может быть комплексное применение методов трансплантации криоконсервированной овариальной ткани (орто- или гетеротопической) в сочетании со вспомогательными репродуктивными технологиями (экстракорпоральное оплодотворение, созревание фолликулов *in vitro*). После ортотопической трансплантации (на поверхность яичника) возможны восстановление фертильности и развитие фолликулов в благоприятных естественных условиях, однако операция трансплантации в этом случае оказывается инвазивной, а объем трансплантата ограничивается размерами яичника [13]. Первая ортотопическая трансплантация овариальной ткани человека была выполнена Oktay K. и Karlikaya G. 29-летней пациентке с двусторонней овариэктомией [43]. Фрагменты криоконсервированной овариальной ткани лапароскопически трансплантировали под тазовую брюшину. При этом было получено кровоснабжение в трансплантате, был образован фолликул размером до 17 мм, восстановлен менструальный цикл у пациентки после гормональной стимуляции, нормализован уровень половых гормонов в плазме крови до физиологической нормы. Восстановление уровня половых гормонов у пациенток наблюдали в период между 3-м и 6-м месяцем после ауто трансплантации в область тазовой брюшины или на поверхность медиального слоя яичника. К настоящему времени известно 10 успешных случаев ортотопической трансплантации криоконсервированной овариальной ткани после использования режима медленного замораживания. Следует отметить,

case appeared to be invasive and the transplant volume is limited by the ovary sizes [13]. The first orthotopic transplantation of human ovarian tissue was carried out by Oktay K. and Karlikaya G. to 29-year-old patient with bilateral ovariectomy [43]. The fragments of cryopreserved ovarian tissue were laparoscopically transplanted under pelvic peritonium. As the result, the blood supply was restored in the transplant, follicle of 17 mm size was formed, menstrual cycle in the patient was recovered after hormonal stimulation, the level of reproductive hormones in blood plasma was normalized to the physiological norm. The restoration of reproductive hormones level in the patients was observed in the period between the 3<sup>rd</sup> and 6<sup>th</sup> month after autotransplantation into pelvic peritonium or onto the surface of ovary medial layer. By now, there are reported 10 successful cases of orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue after using the regimen of slow freezing. It is worth noting that all the women labored the children were younger than 30, that was probably associated with a high pool of primordial follicles in the fragments of ovarian tissue cortical layer [3, 14, 17, 18, 37, 44, 45].

Heterotopic transplantation of ovarian tissue fragments is performed mainly under the skin of frontal abdominal wall or forearm, it is not associated with the limits in the number of transplanted tissue fragments. It is relatively simple and enables to easily observe the development of follicles and perform their puncture. But the restoration of reproductive function is possible only with performing the assisted reproductive technologies [50]. The functioning of cryopreserved ovarian tissue in muscular 'pocket' of abdominal wall and the zone of forearm in 46–49 years old women [9] was similar to the functioning of freshly isolated tissue. Moreover, in 3–4 months after transplantation of ovarian tissue into abdominal wall there was noted the re-storage of estradiol level and follicle-stimulating hormone to the physiological indices while after 'implantation' of tissue into the forearm zone no endocrine function in the patients was observed. By now among 61 cases of heterotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue in 43 cases the patients were observed to have the restoration of menstrual cycle during several months [4]. However, no pregnancies were achieved after the transfer into uterus cavity of the embryos derived from oocytes after follicular paracentesis performed after heterotopic transplantation of ovary tissue [44, 45, 48]. It was possibly associated with a negative impact of microenvironment after heterotopic transplantation, as well as temperature and mechanic factors and as a result with the disordered endocrine and paracrine regulation of folliculogenesis in ovarian tissue. In the investigation Demeestere I. *et al.* [13, 14] have demonstrated that after autologous transplantation of cryopreserved ovary cortex fragments performed heterotopically (subcutaneously and

что все женщины, которые родили детей, были моложе 30 лет, и успех, вероятно, связан с высоким уровнем примордиальных фолликулов во фрагментах кортикального слоя овариальной ткани [3, 14, 17, 18, 37, 44, 45].

Гетеротопическая трансплантация фрагментов яичниковой ткани осуществляется в основном под кожу передней брюшной стенки или предплечья, не связана с ограничениями в количестве пересаживаемых фрагментов ткани, относительно проста, позволяет легко наблюдать за развитием фолликулов и производить их пункцию, однако восстановление репродуктивной функции возможно лишь с использованием вспомогательных репродуктивных технологий [50]. Показано, что функционирование криоконсервированной овариальной ткани в мышечном «кармане» брюшной стенки и в зоне предплечья 46–49-летних женщин [9] сравнимо с функционированием свежесыводенной ткани. При этом через 3–4 месяца после трансплантации овариальной ткани в брюшную стенку отмечалось восстановление уровня эстрадиола и фолликулостимулирующего гормона до физиологических значений, тогда как при «подсадке» ткани в зону предплечья эндокринная функция у пациенток отсутствовала. На сегодняшний день из 61-го случая гетеротопической трансплантации криоконсервированной овариальной ткани в 43 случаях наблюдали у пациенток восстановление менструального цикла в течение нескольких месяцев [4]. Однако после переноса в полость матки эмбрионов, полученных из ооцитов при пункции фолликулов после гетеротопической трансплантации ткани яичника, не наступала ни одна беременность [44, 45, 48]. Возможно, это связано с негативным воздействием в условиях гетеротопической трансплантации микроокружения, а также температурного и механического факторов, и как следствие – с нарушением эндокринной и паракринной регуляции процесса фолликулогенеза в овариальной ткани. В исследовании Demeestere I. и соавт. [13, 14] было продемонстрировано, что при аутологичной трансплантации фрагментов криоконсервированного коркового вещества яичника гетеротопично (подкожно и в переднюю мышцу живота) и аутоотопично (на поверхность яичника) развитие фолликулов до диаметра более 15 мм отмечено в 7, 24 и 69% менструальных циклах соответственно. Приведенные выше литературные данные указывают на то, что выбор оптимальной области при гетеротопической трансплантации является основным фактором для успешного функционирования ткани. Еще одним ключевым фактором, ограничивающим успех процедуры трансплантации, является возникновение ишемии во фрагментах овариальной ткани до момента их реваскуляризации. Показано, что около

in frontal abdominal muscle) and autotopically (onto the ovary surface) the development of follicles upto the diameter more than 15 mm was noted in 7, 24 and 69% menstrual cycles, respectively. The reported data attest that selection of optimal site for heterotopic transplantation is an essential factor for normal functioning of tissue. One more key factor limiting the success of transplantation is the appearance of ischemia in the fragments of ovarian tissue before the moment of their revascularization. About 50% of primordial follicles of general pool were shown to die due to ischemic injuries, therefore the term of transplant functioning reduced and the probability of fertility recovery decreased [26, 40]. There are reported the data about the possibility of application of different substances with antioxidant properties during the sampling of ovary tissue, for example vitamin E, ascorbic acid, mannitol aiming to decrease the degree of ischemic damage, but by now the most of these investigations were done in experimental animals [14, 41, 49]. In addition there are the data [31] that a rapid revascularization of transplant may be stipulated by growth factors (factor of fibroblasts, transforming growth factor  $\beta$ , vessel endothelial growth factor (VEGF)) as well as the level of gonadotropins in the organism. The introduction of exogenic gonadotropins was shown to lead to the increase of endogenic VEGF, improvement of transplant vascularization and follicular development [31]. Recently a great attention has been paid to the discussion of the prospects of using hormonal maintenance scheme of pre- and postoperative stage, agonists and antagonists of gonadotropin releasing hormone, exogenic gonadotropins and estrogen-gestagen drugs to optimize the transplant functioning, maximal preservation of ovarian reservoir and fertility recovery. However, the results of investigations directed to the increase of a transplant viability by exogenic growth factors were not efficient so they can not be used in clinical practice. Consequently, the tasks associated with the selection of transplantation place, providing of vascularization, growth and development of follicles as well as improvement of oocytes quality have remained unsolved.

### Conclusion

It could be concluded that cryopreservation and transplantation of ovarian tissue is an intensively developing technology for preservation of women reproductive and endocrine functions. In spite of promising results presented in this review, the effectiveness of this technology nowadays unfortunately is low, that stipulate the extension of further investigations in this field. The following questions need to be answered: which structural or molecular injuries occur during low-temperature preservation? Is full-value development of gametes possible after freeze-thawing?



50% примордиальных фолликулов от общего пула гибнет в результате ишемических повреждений, следовательно сокращаются сроки функционирования трансплантата и уменьшается вероятность восстановления фертильности [26, 40]. Для уменьшения степени ишемического повреждения в литературе обсуждается возможность применения различных веществ с антиоксидантными свойствами во время забора фрагментов ткани яичника, например витамина Е, аскорбиновой кислоты, маннитола, однако большинство этих исследований носило экспериментальный характер [14, 41, 49]. Кроме того, имеются данные [31], что быстрой реваскуляризации трансплантата могут способствовать факторы роста (фактор фибробластов, трансформирующий фактор роста  $\beta$ , сосудистый эндотелиальный фактор (VEGF)), а также уровень гонадотропинов в организме. Показано, что введение экзогенных гонадотропинов приводит к увеличению эндогенного VEGF, улучшению васкуляризации и фолликулярного развития трансплантата [31]. В последнее время уделяется значительное внимание обсуждению перспектив использования схем гормональной поддержки пред- и послеоперационного этапа: агонистов и антагонистов гонадотропин-релизинг-гормона, экзогенных гонадотропинов и эстроген-гестагенных препаратов с целью оптимизации функционирования трансплантата, максимального сохранения овариального резерва и восстановления фертильности. Однако результаты исследований, направленных на повышение жизнеспособности трансплантата экзогенными факторами роста, были не эффективны, поэтому не могут быть использованы в клинической практике. Следовательно, вопросы, связанные с выбором места трансплантации, обеспечением реваскуляризации, роста и развития фолликулов, а также улучшением качества ооцитов, остаются нерешенными.

### Заключение

Таким образом, криоконсервирование и трансплантация овариальной ткани – интенсивно развивающаяся технология сохранения репродуктивной и эндокринной функции женщин. Несмотря на приведенные выше многообещающие результаты, к сожалению, эффективность данной технологии в настоящее время невелика, что обуславливает развитие дальнейших исследований в этой области. Необходимо дать ответы на следующие вопросы: какие структурные или молекулярные повреждения происходят в процессе низкотемпературного консервирования? Возможно ли полноценное развитие гамет после замораживания-отогрева?

Современные направления трансплантации криоконсервированной овариальной ткани включают оптимизацию как протоколов заморажива-

Current tendencies in transplantation of frozen-thawed ovarian tissue transplantation include optimization of freeze-thawing protocols and transplantation technologies enabling to reduce post-transplantation ischemic damages, preserve maximal pool of follicles, determine an optimal amount of tissue for transplantation for increasing the terms of transplant functioning as well the site of transplantation for possible recovery of fertility either natural or using IVF. Moreover, the perspectives of low-temperature storage of ovarian tissue are associated with the implementation in laboratory practice of culturing of follicles in 3D scaffolds reconstructing the conditions for *in vitro* culturing of the human follicles procured from frozen-thawed fragments of ovary tissue [53, 54]. Thus, the development of researches in the field of cryopreservation and transplantation of ovarian tissue lead to the appearance of new possibilities to restore the fertility at pathologies of reproductive system of different genesis.

### References

1. Adamyan L.V., Beloborodov S.M. ART potential in reproductive function restoration after treatment of malignancies // Russian Journal of Human Reproduction. – 2003. – N6. – P. 29–41.
2. Chub N.N. Morphofunctional state of human ovarian tissue at stages of low-temperature preservation: Abstract of thesis ... of the candidate of biological sciences. – Kharkov, 1988. – 23 p.
3. Andersen C.Y., Rosendahl M., Byskov A.G. et al. Two successful pregnancies following autotransplantation of frozen/thawed ovarian tissue // Hum. Reprod. – 2008. – Vol. 23, N10. – P. 2266–2272.
4. Bedaiwy M.A., Shahin A.Y., Falcone T. Reproductive organ transplantation: advances and controversies // Fertil. Steril. – 2008. – Vol. 90, N6. – P. 2031–2055.
5. Blatt J. Pregnancy outcome in long-term survivors of childhood cancer // Med. Pediatr. Oncol. – 1999. – Vol. 33, N1. – P. 29–33.
6. Boiso I., Marto A.M., Santalo A.J. et al. The meiotic spindle configuration of human oocytes cryopreserved in the germinal vesicle and metaphase II stage // Hum. Reprod. – 2002. – Vol. 17, N7. – P. 1885–1891.
7. Boiso I., Veiga A., Tresserra F. et al. Ovarian tissue freezing, a promising method for fertility preservation // Ref. Gynecol. Obstet. – 2001. – Vol. 8, N6. – P. 448–452.
8. Bordes A., Lornage J., Demirci B. et al. Normal gestations and live births after orthotopic autograft of vitrified-warmed hemiovaries into ewes // Hum. Reprod. – 2005. – Vol. 20, N10. – P. 2745–2748.
9. Callejo J., Salvador C., Miralles A. et al. Long term ovarian function evaluation after autografting by implantation with fresh and frozen-thawed human ovarian tissue // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2001. – Vol. 86, N9. – P. 4489–4494.
10. Candy C.J., Wood M.J., Whittingham D.G. Follicular development in cryopreserved marmoset ovarian tissue after transplantation // Hum. Reprod. – 1995. – Vol. 10, N9. – P. 2334–2338.
11. Choi J., Lee J.Y., Lee E. et al. Cryopreservation of the mouse ovary inhibits the onset of primordial follicle development // Cryobiology. – 2007, N1. – Vol. 54. – P. 55–62.
12. Cox S.L., Shaw J., Jenkin G. Transplantation of cryopreserved fetal ovarian tissue to adult recipients in mice // J. Reprod. Fertil. – 1996. – Vol. 107, N2. – P. 315–322.





ния-отогрева, так и технологии трансплантации, которые позволят снизить посттрансплантационные ишемические повреждения, сохранить максимальный пул фолликулов, определить оптимальное количество ткани для трансплантации с целью увеличения сроков функционирования трансплантата, а также место трансплантации для возможности восстановления либо природной фертильности, или с применением ЭКО. Кроме того, перспективы низкотемпературного хранения овариальной ткани связывают с внедрением в лабораторную практику культивирования фолликулов в новых трехмерных системах, воссоздающих естественные условия для выращивания фолликулов человека *in vitro* из криоконсервированных фрагментов ткани яичника [53, 54]. Таким образом, с развитием научно-исследовательских работ в области криоконсервирования и трансплантации овариальной ткани появляются новые возможности восстановления фертильности при патологиях репродуктивной системы различного генеза.

### Литература

- Адамян Л.В., Белобородов С.М. Возможность сохранения репродуктивной функции у онкологических больных // Проблемы репродукции. – 2003. – №6. – С. 29–41.
- Чуб Н.Н. Морфофункциональное состояние овариальной ткани человека на этапах низкотемпературного консервирования: Автореф. дис. ... канд.биол.наук. – Харьков, 1988. – 23 с.
- Andersen C.Y., Rosendahl M., Byskov A.G. et al. Two successful pregnancies following autotransplantation of frozen/thawed ovarian tissue // Hum. Reprod. – 2008. – Vol. 23, №10. – P. 2266–2272.
- Bedaiwy M.A., Shahin A.Y., Falcone T. Reproductive organ transplantation: advances and controversies // Fertil. Steril. – 2008. – Vol. 90, №6. – P. 2031–2055.
- Blatt J. Pregnancy outcome in long-term survivors of childhood cancer // Med. Pediatr. Oncol. – 1999. – Vol. 33, №1. – P. 29–33.
- Boiso I., Marto A.M., Santalo A.J. et al. The meiotic spindle configuration of human oocytes cryopreserved in the germinal vesicle and metaphase II stage // Hum. Reprod. – 2002. – Vol. 17, №7. – P. 1885–1891.
- Boiso I., Veiga A., Tresserra F. et al. Ovarian tissue freezing, a promising method for fertility preservation // Ref. Gynecol. Obstet. – 2001. – Vol. 8, №6. – P. 448–452.
- Bordes A., Lornage J., Demirci B. et al. Normal gestations and live births after orthotopic autograft of vitrified-warmed hemiovaries into ewes // Hum. Reprod. – 2005. – Vol. 20, №10. – P. 2745–2748.
- Callejo J., Salvador C., Miralles A. et al. Long term ovarian function evaluation after autografting by implantation with fresh and frozen-thawed human ovarian tissue // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2001. – Vol. 86, №9. – P. 4489–4494.
- Candy C.J., Wood M.J., Whittingham D.G. Follicular development in cryopreserved marmoset ovarian tissue after transplantation // Hum. Reprod. – 1995. – Vol. 10, №9. – P. 2334–2338.
- Choi J., Lee J.Y., Lee E. et al. Cryopreservation of the mouse ovary inhibits the onset of primordial follicle development // Cryobiology. – 2007, №1. – Vol. 54. – P. 55–62.
- Cox S.L., Shaw J., Jenkin G. Transplantation of cryopreserved fetal ovarian tissue to adult recipients in mice // J. Reprod. Fertil. – 1996. – Vol. 107, №2. – P. 315–322.
- Demeestere I., Simon P., Emiliani S. et al. Orthotopic and heterotopic ovarian tissue transplantation // Hum. Reprod. Update. – 2009. – Vol. 15, N6. – P. 649–665.
- 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. – Vol. 21, N8. – P. 2010–2014.
- 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. – Vol. 61, N5. – P. 259–263.
- Demirci B., Salle B., Frappart L. et al. Morphological alterations and DNA fragmentation in oocytes from primordial and primary follicles after freezing-thawing of ovarian cortex in sheep // Fertil. Steril. – 2002. – Vol. 77, N3. – P. 595–600.
- Donnez J., Dolmans M.M., Demylle D. et al. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue // Lancet. – 2004. – Vol. 364, N9443. – P. 1405–1410.
- 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. – Vol. 43, N6. – P. 437–450.
- Gook D.A., Osborn S.M., Bourne H., Johnston W.I. Fertilization of human oocytes following cryopreservation; normal karyotypes and absence of stray chromosomes // Hum. Reprod. – 1994. – Vol. 9, N4. – P. 684–691.
- Gook D.A., Osborn S.M., Johnston W.I. Cryopreservation of mouse and human oocytes using 1,2-propanediol and the configuration of the meiotic spindle // Hum. Reprod. – 1993. – Vol. 8, N7. – P. 1101–1109.
- Gook D.A., Osborn S.M., Johnston W.I. Parthenogenetic activation of human oocytes following cryopreservation using 1,2-propanediol // Hum. Reprod. – 1995. – Vol. 10, N3. – P. 654–658.
- Gook D.A., Schiewe M.C., Osborn S.M. et al. Intracytoplasmic sperm injection and embryo development of human oocytes cryopreserved using 1,2-propanediol // Hum. Reprod. – 1995. – Vol. 10, N10. – P. 2637–2641.
- Gook D.A., Edgar D.H., Stern C. Effect of cooling rate and dehydration regimen on the histological appearance of human ovarian cortex following cryopreservation in 1,2-propanediol // Hum. Reprod. – 1999. – Vol. 14, N8. – P. 2061–2068.
- Gook D.A., Edgar D.H., Stern C. The effects of cryopreservation regimens on the morphology of human ovarian tissue // Mol. Cell. Endocrinol. – 2000. – Vol. 169, N1–2. – P. 99–103.
- Gosden R.G., Baird D.T., Wade J.C., Webb G. Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at –196°C // Hum. Reprod. – 1994. – Vol. 9, N4. – P. 597–603.
- Gosden R.G. Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue // Mol. Cell. Endocrinol. – 2000. – Vol. 163, N1–2. – P. 125–129.
- Green S.H., Smith A.U., Zuckerman S. The number of ovarian oocytes in ovarian autografts after freezing and thawing // J. Endocrinol. – 1956. – Vol. 13, N3. – P. 330–334.
- Grischenko V.I., Tchoob N.N., Lobyntseva G.S. et al. Creation of a bank of cryopreserved human ovarian tissue for allotransplantations in gynaecology // Cryobiology – 1987. – Vol. 3. – P. 7–11.
- Harp R., Leibach J., Black J. et al. Cryopreservation of murine ovarian tissue // Cryobiology – 1994. – Vol. 31, N4. – P. 336–343.
- Hovatta O., Silye R., Krausz T. et al. Cryopreservation of human ovarian tissue using dimethylsulphoxide and propanediol-sucrose as cryoprotectants // Hum. Reprod. – 1996. – Vol. 11, N6. – P. 1268–1272.
- 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. – Vol. 163, N1–2. – P. 141–146.
- Isachenko V., Isachenko E., Kreienberg R. et al. Human ovarian tissue cryopreservation: quality of follicles as a criteria of ef-



13. Demeestere I., Simon P., Emiliani S. et al. Orthotopic and heterotopic ovarian tissue transplantation // *Hum. Reprod. Update.* – 2009. – Vol. 15, №6. – P. 649–665.
14. 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. – Vol. 21, №8. – P. 2010–2014.
15. 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. – Vol. 61, №5. – P. 259–263.
16. Demirci B., Salle B., Frappart L. et al. Morphological alterations and DNA fragmentation in oocytes from primordial and primary follicles after freezing-thawing of ovarian cortex in sheep // *Fertil. Steril.* – 2002. – Vol. 77, №3. – P. 595–600.
17. Donnez J., Dolmans M.M., Demylle D. et al. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue // *Lancet.* – 2004. – Vol. 364, №9443. – P. 1405–1410.
18. 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. – Vol. 43, №6. – P. 437–450.
19. Gook D.A., Osborn S.M., Bourne H., Johnston W.I. Fertilization of human oocytes following cryopreservation; normal karyotypes and absence of stray chromosomes // *Hum. Reprod.* – 1994. – Vol. 9, №4. – P. 684–691.
20. Gook D.A., Osborn S.M., Johnston W.I. Cryopreservation of mouse and human oocytes using 1,2-propanediol and the configuration of the meiotic spindle // *Hum. Reprod.* – 1993. – Vol. 8, №7. – P. 1101–1109.
21. Gook D.A., Osborn S.M., Johnston W.I. Parthenogenetic activation of human oocytes following cryopreservation using 1,2-propanediol // *Hum. Reprod.* – 1995. – Vol. 10, №3. – P. 654–658.
22. Gook D.A., Schiewe M.C., Osborn S.M. et al. Intracytoplasmic sperm injection and embryo development of human oocytes cryopreserved using 1,2-propanediol // *Hum. Reprod.* – 1995. – Vol. 10, №10. – P. 2637–2641.
23. Gook D.A., Edgar D.H., Stern C. Effect of cooling rate and dehydration regimen on the histological appearance of human ovarian cortex following cryopreservation in 1,2-propanediol // *Hum. Reprod.* – 1999. – Vol. 14, №8. – P. 2061–2068.
24. Gook D.A., Edgar D.H., Stern C. The effects of cryopreservation regimens on the morphology of human ovarian tissue // *Mol. Cell. Endocrinol.* – 2000. – Vol. 169, №1–2. – P. 99–103.
25. Gosden R.G., Baird D.T., Wade J.C., Webb G. Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at  $-196^{\circ}\text{C}$  // *Hum. Reprod.* – 1994. – Vol. 9, №4. – P. 597–603.
26. Gosden R.G. Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue // *Mol. Cell. Endocrinol.* – 2000. – Vol. 163, №1–2. – P. 125–129.
27. Green S.H., Smith A.U., Zuckerman S. The number of ovarian oocytes in ovarian autografts after freezing and thawing // *J. Endocrinol.* – 1956. – Vol. 13, №3. – P. 330–334.
28. Grischenko V.I., Tchoob N.N., Lobyntseva G.S. et al. Creation of a bank of cryopreserved human ovarian tissue for allotransplantations in gynaecology // *Cryobiology* – 1987. – Vol. 3. – P. 7–11.
29. Harp R., Leibach J., Black J. et al. Cryopreservation of murine ovarian tissue // *Cryobiology* – 1994. – Vol. 31, №4. – P. 336–343.
30. Hovatta O., Silye R., Krausz T. et al. Cryopreservation of human ovarian tissue using dimethylsulphoxide and propanediol-sucrose as cryoprotectants // *Hum. Reprod.* – 1996. – Vol. 11, №6. – P. 1268–1272.
31. 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. – Vol. 163, №1–2. – P. 141–146.
32. Isachenko V., Isachenko E., Krienberg R. et al. Human ovarian tissue cryopreservation: quality of follicles as a criteria of effectiveness // *Reprod. Biomed. Online.* – 2010. – Vol. 20, №4. – P. 441–442.
33. Keros V., Xella S., Hultenby K. et al. Vitrification versus controlled-rate freezing in cryopreservation of human ovarian tissue // *Hum. Reprod.* – 2009. – Vol. 24, N7. – P. 1670–1683.
34. Klock S.C., Zhang J.X., Kazer R.R. Fertility preservation for female cancer patients: early clinical experience // *Fertil. Steril.* – 2010. – Vol. 94, N1. – P. 149–155.
35. Lee R.K., Li S.H., Lu C.H. et al. Abnormally low expression of connexin 37 and connexin 43 in subcutaneously transplanted cryopreserved mouse ovarian tissue // *J. Assist. Reprod. Genet.* – 2008, N9–10. – Vol. 25. – P. 489–497.
36. Meirou D., Nugent D. The effects of radiotherapy and chemotherapy on female reproduction // *Hum. Reprod. Update.* – 2001. – Vol. 7, N6. – P. 535–543.
37. Meirou 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. – Vol. 353, N3. – P. 318–321.
38. Navarro-Costa P., Correia S.C., Gouveia-Oliveira A. et al. Effects of mouse ovarian tissue cryopreservation on granulosa cell-oocyte interaction // *Hum. Reprod.* – 2005. – Vol. 20, N6. – P. 1607–1614.
39. Newton H., Aubard Y., Rutherford A. et al. Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue // *Hum. Reprod.* – 1996. – Vol. 11, N7. – P. 1487–1491.
40. Nugent D., Meirou D., Brook P.F. et al. Transplantation in reproductive medicine: previous experience, present knowledge and future prospects // *Hum. Reprod. Update.* – 1997. – Vol. 3, N3. – P. 267–280.
41. Nugent D., Newton H., Gallivan L. et al. Protective effect of vitamin E on ischaemia-reperfusion injury in ovarian grafts // *J. Reprod. Fertil.* – 1998. – Vol. 114, N2. – P. 341–346.
42. Oktay K., Newton H., Gosden R.G. Transplantation of cryopreserved human ovarian tissue results in follicle growth initiation in SCID mice // *Fertil. Steril.* – 2000. – Vol. 73, N3. – P. 599–603.
43. Oktay K., Karlikaya G. Ovarian function after transplantation of frozen, banked autologous ovarian tissue // *N. Engl. J. Med.* – 2000. – Vol. 342, N25. – P. 1919.
44. Oktay K., Tilly J. Livebirth after cryopreserved ovarian tissue autotransplantation // *Lancet.* – 2004. – Vol. 364, N9451. – P. 2091–2092.
45. Oktay K. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: preliminary findings and implications for cancer patients // *Hum. Reprod. Update.* – 2001. – Vol. 7, N6. – P. 526–534.
46. Parrot D. The fertility of mice with orthotopic ovarian grafts derived from frozen tissue // *J. Reprod. Fertil.* – 1960. – Vol. 1. – P. 230–241.
47. Porcu E., Fabbri R., Ciotti P.M. et al. Oocytes or embryo storage // *Fertil. Steril.* – 2002. – Vol. 78, N1. – P. 5–38.
48. Rosendahl M., Loft A., Byskov A.G. et al. Biochemical pregnancy after fertilization of an oocyte aspirated from a heterotopic autotransplant of cryopreserved ovarian tissue: case report // *Hum. Reprod.* – 2006. – Vol. 21, N8. – P. 2006–2009.
49. Sagsz N., Kisa U., Apan A. Ischaemia-reperfusion injury of rat ovary and the effects of vitamin C, mannitol and verapamil // *Hum. Reprod.* – 2002. – Vol. 17, N11. – P. 2972–2976.
50. Sonmezer M., Oktay K. Orthotopic and heterotopic ovarian tissue transplantation // *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* – 2010. – Vol. 24, N1. – P. 113–126.
51. Sugimoto M., Maeda S., Manabe N. et al. Development of infantile rat ovaries autotransplanted after cryopreservation by vitrification // *Theriogenology.* – 2000. – Vol. 53, N5. – P. 1093–1103.
52. Sztejn J., Sweet H., Farley J., Mobraaten K. Cryopreservation and orthotopic transplantation of mouse ovaries: new approach in gamete banking // *Biol. Reprod.* – 1998. – Vol. 58, N1. – P. 1071–1074.
53. Xu M., West-Farrell E.R., Stouffer R.L. et al. Encapsulated three-dimensional culture supports development of nonhuman primate secondary follicles // *Biol. Reprod.* – 2009. – Vol. 58, N3. – P. 587–594.

33. Keros V., Xella S., Hultenby K. et al. Vitrification versus controlled-rate freezing in cryopreservation of human ovarian tissue // *Hum. Reprod.* – 2009. – Vol. 24, №7. – P. 1670–1683.
34. Klock S.C., Zhang J.X., Kazer R.R. Fertility preservation for female cancer patients: early clinical experience // *Fertil. Steril.* – 2010. – Vol. 94, №1. – P. 149–155.
35. Lee R.K., Li S.H., Lu C.H. et al. Abnormally low expression of connexin 37 and connexin 43 in subcutaneously transplanted cryopreserved mouse ovarian tissue // *J. Assist. Reprod. Genet.* – 2008, №9–10. – Vol. 25. – P. 489–497.
36. Meirov D., Nugent D. The effects of radiotherapy and chemotherapy on female reproduction // *Hum. Reprod. Update.* – 2001. – Vol. 7, №6. – P. 535–543.
37. Meirov 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. – Vol. 353, №3. – P. 318–321.
38. Navarro-Costa P., Correia S.C., Gouveia-Oliveira A. et al. Effects of mouse ovarian tissue cryopreservation on granulosa cell-oocyte interaction // *Hum. Reprod.* – 2005. – Vol. 20, №6. – P. 1607–1614.
39. Newton H., Aubard Y., Rutherford A. et al. Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue // *Hum. Reprod.* – 1996. – Vol. 11, №7. – P. 1487–1491.
40. Nugent D., Meirov D., Brook P.F. et al. Transplantation in reproductive medicine: previous experience, present knowledge and future prospects // *Hum. Reprod. Update.* – 1997. – Vol. 3, №3. – P. 267–280.
41. Nugent D., Newton H., Gallivan L. et al. Protective effect of vitamin E on ischaemia-reperfusion injury in ovarian grafts // *J. Reprod. Fertil.* – 1998. – Vol. 114, №2. – P. 341–346.
42. Oktay K., Newton H., Gosden R.G. Transplantation of cryopreserved human ovarian tissue results in follicle growth initiation in SCID mice // *Fertil. Steril.* – 2000. – Vol. 73, №3. – P. 599–603.
43. Oktay K., Karlikaya G. Ovarian function after transplantation of frozen, banked autologous ovarian tissue // *N. Engl. J. Med.* – 2000. – Vol. 342, №25. – P. 1919.
44. Oktay K., Tilly J. Livebirth after cryopreserved ovarian tissue autotransplantation // *Lancet.* – 2004. – Vol. 364, №9451. – P. 2091–2092.
45. Oktay K. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: preliminary findings and implications for cancer patients // *Hum. Reprod. Update.* – 2001. – Vol. 7, №6. – P. 526–534.
46. Parrot D. The fertility of mice with orthotopic ovarian grafts derived from frozen tissue // *J. Reprod. Fertil.* – 1960. – Vol. 1. – P. 230–241.
47. Porcu E., Fabbri R., Ciotti P.M. et al. Oocytes or embryo storage // *Fertil. Steril.* – 2002. – Vol. 78, №1. – P. 5–38.
48. Rosendahl M., Loft A., Byskov A.G. et al. Biochemical pregnancy after fertilization of an oocyte aspirated from a heterotopic autotransplant of cryopreserved ovarian tissue: case report // *Hum. Reprod.* – 2006. – Vol. 21, №8. – P. 2006–2009.
49. Sagsz N., Kisa U., Apan A. Ischaemia-reperfusion injury of rat ovary and the effects of vitamin C, mannitol and verapamil // *Hum. Reprod.* – 2002. – Vol. 17, №11. – P. 2972–2976.
50. Sonmezer M., Oktay K. Orthotopic and heterotopic ovarian tissue transplantation // *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* – 2010. – Vol. 24, №1. – P. 113–126.
51. Sugimoto M., Maeda S., Manabe N. et al. Development of infantile rat ovaries autotransplanted after cryopreservation by vitrification // *Theriogenology.* – 2000. – Vol. 53, №5. – P. 1093–1103.
52. Szein J., Sweet H., Farley J., Mobraaten K. Cryopreservation and orthotopic transplantation of mouse ovaries: new approach in gamete banking // *Biol. Reprod.* – 1998. – Vol. 58, №1. – P. 1071–1074.
53. Xu M., West-Farrell E.R., Stouffer R.L. et al. Encapsulated three-dimensional culture supports development of nonhuman primate secondary follicles // *Biol. Reprod.* – 2009. – Vol. 80, №3. – P. 587–594.
54. Xu M., Kreeger P.K., Shea L.D. et al. Tissue-engineered follicles produce live, fertile offspring // *Tiss. Eng.* – 2006. – Vol. 12, №10. – P. 2739–2746.

