

Н. В. Авраменко

Современные возможности криобиологии при лечении бесплодия, сохранении и восстановлении фертильности

Запорожский государственный медицинский университет

Ключевые слова: криопротоккол, криоконсервация спермы, витрификация эмбрионов и ооцитов, криоконсервация овариальной ткани.

Обзор мировой и отечественной специализированной литературы показал точки приложения криотехнологий в сфере вспомогательных репродуктивных технологий. Сегодня криоконсервация спермы, эмбрионов, ооцитов является рутинной практикой. Достижению современных результатов предшествовала огромная история исследований. Первоначально репродуктивные клетки криоконсервировали с целью формирования банка донорских сперматозоидов, эмбрионов и ооцитов. Использование криоциклов было ограничено из-за недостаточной эффективности программ вспомогательных репродуктивных технологий с применением криоконсервации. Благодаря развитию новых методик работа современной клиники вспомогательных репродуктивных технологий не возможна без криоконсервации спермы, эмбрионов, ооцитов.

Сучасні можливості криобіології під час лікування безпліддя, збереження та відновлення фертильності

Н. В. Авраменко

Огляд світової та вітчизняної фахової літератури показав шляхи використання криотехнологій у галузі допоміжних репродуктивних технологій. Сьогодні криоконсервация сперми, ембріонів, ооцитів є рутинною практикою. Досягненню сучасних результатів передувала величезна історія досліджень. Спочатку репродуктивні клітини криоконсервували з метою формування банку донорських сперматозоїдів, ембріонів та ооцитів. Використання криоциклів було обмеженим через недостатню ефективність програм допоміжних репродуктивних технологій із застосуванням криоконсервації. Завдяки розвитку нових методик робота сучасної клініки допоміжних репродуктивних технологій не можлива без криоконсервації сперми, ембріонів, ооцитів.

Ключові слова: криопротоккол, криоконсервация сперми, витрификация эмбрионів та ооцитів, криоконсервация овариальной тканини.

Патологія. – 2013. – №3 (29). – С. 5–11

Modern possibilities of cryobiology in the treatment of infertility, preservation and restoration of fertility

N. V. Avramenko

Overview of world and national literature showed that cryotechnology is the point of application in the field of assisted reproductive technology (ART). To date, cryopreservation of semen, embryos, oocytes is a routine practice. Achieving the currently available results of studies followed a huge story. Originally cryopreservation of reproductive cells was done in order to form a bank of donor sperm, embryos and oocytes. Using frozen embryo transfer cycles was limited because of the lack of effectiveness of ART programs using cryopreservation. Today, thanks to the development of new cryopreservation techniques, work of modern ART clinics is impossible without cryopreservation of semen, embryos, oocytes.

Key words: frozen embryo transfer cycle, cryopreservation of sperm, embryo vitrification, oocyte vitrification, cryopreservation of ovarian tissue.

Pathologia. 2013; №3 (29): 5–11

Криотехнологии в программах вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) стали неотъемлемой составляющей достижения результативности. Сегодня точкой приложения криотехнологий в программах ВРТ является замораживание спермы, эмбрионов, ооцитов, овариальной ткани.

Цель работы

На основе данных специализированной литературы описать пути использования криотехнологий в сфере современных вспомогательных репродуктивных технологий.

Криоконсервация спермы

1953 год знаменателен рождением первого ребенка, зачатого с применением замороженной спермы человека (UK, Sherman and Bunge) путем внутриматочной инсеминации (ВМИ). В последующие годы криоконсервация спермы ставила перед собой единственную задачу – формирование банка донорской спермы. На территории

Украины с 1970-х г. активно внедрял и разрабатывал данную методику Институт проблем криобиологии и криомедицины под руководством и координацией академика В.И. Грищенко. Преимущества такой опции для программ ВРТ очевидны. Прежде всего, это избежание инфицирования реципиенток такими опасными инфекциями, как вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), гепатит В, С. Скрининговый метод определения статуса ВИЧ, наличия в крови антител к вирусу гепатита В и С на сегодня представлен иммуноферментным анализом (ИФА), оптимальным временем контроля определения антител к антигенам указанных вирусов является карантинный период (6 месяцев). Криоконсервация спермы позволяет дожидаться результата исследования с последующим решением участия биологического материала в программе ВРТ.

При выборе будущего биологического отца ребенка, женщине должен быть известен фенотип, результаты

медицинского, генетического обследования донора сперматозоида. Криоконсервация спермы позволяет успешно формировать криобанк и эффективно пользоваться биологическим материалом.

С развитием методов замораживания появились новые показания и направления, требующие длительного хранения спермы. Широкого распространения в мире приобрело сохранение генетического материала онкологических больных перед гонадотоксической терапией (химиотерапия, лучевая терапия и т. п.) [2]. В программах ВРТ криоконсервация сперматозоидов стала рутинной практикой и успешно используется для страховки в случае отсутствия мужа на момент оплодотворения ооцитов в программе экстракорпорального оплодотворения (ЭКО). Криоконсервация сперматозоидов по немедицинским показаниям с целью сохранения генетического материала в современном обществе становится популярной процедурой для мужчин репродуктивного периода. Важным является сохранение единичных сперматозоидов после тестикулярной экстракции (TESA/microTESA) [1,2,5].

Криоконсервация эмбрионов

10 апреля 1983 г. рожден первый ребенок из замороженного эмбриона человека (Trounson & Mohr, Мельбурн, Австралия) [8].

Существуют три метода криоконсервации биологических объектов, в частности, эмбрионов: медленное программное замораживание, быстрое замораживание, витрификация [3].

Медленное программное замораживание (в англоязычной литературе – «slow freeze») заключается в постепенном программируемом понижении температуры [3,4,6]. Предотвращение образования внутриклеточного льда и, соответственно, сохранность клеток достигается путем медленного понижения температуры, что приводит к постепенному выходу воды и замене последней на крипротекторы после предварительной экспозиции в эквilibрационном растворе. Основные крипротекторы: проникающие (диметилсульфоксид, этиленгликоль, пропиленгликоль, глицерол) и непроникающие (сахароза). По данным авторов [6], концентрация непроникающих крипротекторов составляла в среднем 1,5 М [12].

В 1987 г. как метод впервые использована витрификация. Одними из пионеров в разработке витрификации с целью криоконсервации репродуктивных клеток, в частности эмбрионов, являются Huang, Kuwayama, Zheng, Rama Raju. Сущность методики заключается в предотвращении образования кристаллов льда в результате быстрого перехода в твердое состояние. Успех зависит от высокой скорости замораживания и адекватности дегидратации клеток, что достигается путем эквilibрации в растворах с высокой (в среднем 5,5 М) концентрацией проникающих и непроникающих крипротекторов [2,3,6]. Результативность витрификации чувствительна ко времени и технике выполнения, и поэтому требует надлежащей подготовки эмбриолога и стандартизации процедуры для получения надежных и воспроизводи-

мых результатов [6,12]. По данным некоторых авторов, витрификация эмбриона предпочтительна методике медленного программного замораживания [8]. Так, на смену медленному программному замораживанию приходит витрификация.

Систематический обзор и мета-анализ 2008 и 2010 г. показал статистически значимые различия в показателях выживаемости эмбрионов после медленной программной заморозки и витрификации в пользу последней [2,4]. Частота наступления клинической беременности, по результатам некоторых исследований [8], составляет 20%.

По результатам мета-анализа Faten F. Abdel Hafez, в 2003 г. количество программ переноса эмбриона после криоконсервации (криопротокол) составляла 20% от всех переносов эмбриона в мире [2]. По данным EIM (European IVF Monitoring), ESHRE (European society Human Reproduction and Embryology), в 2005 г. криопротоколы в программах ВРТ стали применять в 30% случаев [8].

На сегодня эффективность витрификации эмбрионов привела к тому, что, по данным последнего мета-анализа (2013), частота наступления беременности в циклах с переносом криоконсервированного эмбриона статистически значимо превышала таковую в сравнении с переносом нативных эмбрионов; частота самопроизвольных абортс была выше в группе переноса нативных эмбрионов, но статистически значимо не превышала соответствующий показатель в группе переноса криоконсервированных эмбрионов.

Акушерские и перинатальные исходы детей, рожденных после переноса витрифицированного эмбриона, по данным зарубежных авторов [23], не отличались от таковых у детей, рожденных после переноса в полость матки нативного эмбриона.

Первоначально перед криоконсервацией эмбрионов стояла цель сохранения избыточного количества эмбрионов у женщин с избыточным количеством яйцеклеток. Так, до появления действительно эффективного метода криоконсервации эмбрионов женщины, у которых в циклах контролируемой овариальной стимуляции было получено избыточное количество ооцитов, выбирали фертилизировать только часть ооцитов, а от избыточного количества отказываться [6].

Таким образом, благодаря значительному прорыву криотехнологий, в частности в развитии и внедрении витрификации в рутинную практику ВРТ, эмбрионы криоконсервируют для повышения кумулятивной частоты наступления беременности в программах ЭКО, предотвращения синдрома гиперстимуляции яичников, выбора здорового эмбриона после проведения предимплантационной генетической диагностики.

В течение контролируемой овариальной стимуляции (КОС) в рамках программы ЭКО происходит значительное повышение уровня эстрадиола, что приводит к нарушению соотношения эстрадиол/прогестерон относительно естественного цикла. В итоге наступает преждевременное повышение уровня прогестерона. При значениях последнего более 0,9 нг/мл [25] происходит

десинхронизация формирования окна имплантации [14–16] по отношению к стадии развития эмбриона. По данным Achache H. [19], высокий уровень стероидных гормонов изменяет иммунные механизмы имплантации в сторону повышения медиаторов провоспалительного типа [26], что приводит к повреждению рецепторного аппарата эндометрия и препятствует полноценной инвазии ворсин трофобласта [16,17]. В результате перенос эмбриона в полость матки с нарушенной рецептивностью эндометрия приводит к отрицательному результату программы ВРТ. Ряд зарубежных исследователей в таких случаях рекомендуют использовать перенос криоконсервированного эмбриона в цикле подготовки эндометрия [17,18].

Наиболее опасным с точки зрения угрозы жизни пациентки является поздний синдром гиперстимуляции, который потенцируется секрецией хорионического гонадотропина человека, выделяемого ворсинами хориона эмбриона [7,9]. Тактику «freeze all» (дословный перевод – «замораживать всех») описали ряд авторов [11,22]. Она заключается в криоконсервации эмбрионов у женщин с высоким риском развития синдрома гиперстимуляции яичников (СГЯ) и переносом последних в полость матки в естественном цикле или цикле заместительной гормональной терапии [12,14].

Первоочередной задачей современных ВРТ является уже не преодоление бесплодия, а рождение здорового потомства. Количественные хромосомные aberrации, особенно анеуплоидии (т. е. наиболее распространенный вид аномалий кариотипа человеческих эмбрионов) фатальны для ранних стадий развития эмбриона, что в дальнейшем приводит к бесплодию. В фетальном и перинатальном периодах указанные хромосомные aberrации являются причиной самопроизвольных абортов [24], привычного невынашивания беременности [25], рождения детей с хромосомной патологией. Флуоресцентная гибридизация (FISH) для диагностики анеуплоидий эмбрионов/ооцитов ограничена фактом, что, в лучшем случае, возможно исследовать только 12 пар хромосом [26]. Сравнительная геномная гибридизация оценивает весь хромосомный набор, а также анеуплоидии, которые невозможно исследовать методом FISH [20,27].

По данным Alan H. Handyside [20], 0,16–1,14% пациентов, страдающих бесплодием, имеют аномалии кариотипа. Сегодня в клинической практике успешно используется метод, позволяющий определить весь хромосомный набор эмбриона – расширенная сравнительная геномная гибридизация (array comparative genomic hybridization, a-CGH) [20,21]. Показания к данному методу: хромосомная патология родителей, возраст одного из супругов старше 40 лет, частые неудачные попытки ЭКО, привычное невынашивание беременности, рождение детей с хромосомной патологией, врожденными пороками развития. После биопсии трофэктодермы эмбриона 5 суток развития (бластоцисты) и биопсированный материал направляется в молекулярно-генетическую лабораторию, которая выдает заключение

на протяжении минимум 3 суток [21,28]. Эти условия диктуют необходимость витрификации исследуемых эмбрионов. T. Schlenker и соавт. опубликовали данные о частоте наступления беременности после биопсии трофэктодермы в 70% случаев [13].

Технология биопсии трофэктодермы бластоцисты и последующей витрификации исследуемых эмбрионов открыли возможность диагностики моногенных заболеваний эмбриона на этапе до имплантации [39]. Преимущество биопсии трофэктодермы над биопсией blastomera – получение достаточного количества ядер, необходимое для выполнения генетического скрининга [28]. Так, у родителей, носителей патологического полиморфного варианта генов муковисцидоза (cystic fibrosis transmembrane regulator), BRCA 1/2, гена ломкой X-хромосомы (CGG-повторы гена FMR1) и др., появился путь реализации репродуктивного потенциала с результатом рождения здорового потомства [27,28].

Криоконсервация ооцитов

Внедрение криоконсервации ооцитов в клиническую практику ВРТ долгое время являлось целью многих исследований. Криоконсервация ооцитов дополняет современный арсенал ВРТ, расширяя его применение для женщин, страдающих бесплодием и планирующих реализацию своего репродуктивного потенциала. Последние достижения в области криобиологии, репродукции и эмбриологии сделали криоконсервацию ооцитов жизнеспособной реальностью. Для поддержания долгосрочной жизнеспособности после длительного хранения, живые клетки должны быть приведены в состояние анабиоза, в котором они остаются в течение неопределенного периода времени, и из которого они могут быть возвращены в жизнеспособное состояние в будущем. Температура, которая обычно используется для хранения клеток млекопитающих, составляет -196°C (температура жидкого азота) и представляется достаточной для этих целей, хотя точное значение порога для оптимальной температуры не известно.

Данные о беременности после криоконсервации ооцитов, достигнутой с помощью техники медленного замораживания с применением диметилсульфоксида (ДМСО), опубликованы в 1986 г. [29]. Авторы сообщали о высокой частоте выживаемости и оплодотворения ооцитов – 80% и 83% соответственно. За последующее десятилетие сопоставимые результаты не достигнуты. Прогресс был медленным также из-за отсутствия интрацитоплазматической инъекции сперматозоида (ICSI) и плохой оплодотворяемости размороженных ооцитов. Описаны единичные случаи наступления беременности [30,34,35].

Аналогично истории развития криоконсервации эмбрионов значительного прогресса достигла криоконсервация ооцитов с появлением и развитием витрификации. В 1999 г. сообщено о рождении первого ребенка после криоконсервации 17 ооцитов человека путем витрификации. В качестве криопротектантов использован этиленгликоль (40%) и 0,6 М сахарозы на открытом

крионосителя (соломинка). Первые серьезные работы по количеству витрифицированных человеческих ооцитов были опубликованы в 2003 г. [36]. В частности; исследовательская группа криоконсервировала 474 кумулюсооцитарных комплекса (зрелых и незрелых ооцитов) с помощью витрификации с применением 5,5 М этиленгликоля и 1,0 М сахарозы в качестве криопротекторов. Для обеспечения максимальной скорости охлаждения ооциты были погружены на сетки для электронной микроскопии. Получены результаты: выживаемость – 68,7%, процент оплодотворения – 71,7%, частота имплантации – 6,4%, частота клинической беременности и живорождения по отношению к эмбриотрансферу – 6/21 (21,4%) [36].

Kuwayama и соавт. [37] сообщили об опыте криоконсервации ооцитов по методу «Cryotop» с использованием комбинации этиленгликоля и сахарозы в качестве криопротекторов. Результат витрификации 64 ооцитов: выживаемость – 90,8%, частота оплодотворения – 89,6%, частота наступления клинической беременности – 41,4%, частота живорождения – 34,5%.

Низкая эффективность криоконсервации ооцитов обусловлена особенностью биологических и морфологических характеристик яйцеклетки. У зрелых ооцитов (M-II), полученных после суперовуляции, метафазы хромосомы выстраиваются по мейотическим веретенам деления вдоль экваториальной пластины. Исследования подтвердили, что веретено деления может быть повреждено внутриклеточным образованием льда при замораживании или оттаивании. Эти повреждения могут зависеть от возраста пациента и техники криоконсервации и варьироваться в зависимости от времени после размораживания [23].

В специализированной литературе описаны только 4 контролируемых рандомизированных исследования о результатах программ ЭКО/ИКСИ с использованием криоконсервированных и нативных ооцитов [24,25,26]. Все группы исследователей использовали идентичный протокол витрификации с открытым крионосителем (Cryotop device, 15% EG, 15% DMSO, 0,5 M sucrose). В первые 2 исследования включены программы донации ооцитов, в другие – женщины, страдающие бесплодием, у которых получено избыточное количество ооцитов в рамках программы ЭКО, в случае отсутствия наступления беременности в цикле стимуляции. Общая частота выживаемости ооцитов после витрификации составила 90–97%, процент оплодотворения варьировал между 71–79%, частота имплантации – от 17% до 41%, частота клинической беременности по отношению к переносу эмбриона – 36–61%.

Отношение частоты наступления клинической беременности на один размороженный ооцит после витрификации указанным методом составила 4,5–12%. Самое показательное контролируемое рандомизированное исследование о сравнении использования нативных и витрифицированных ооцитов доноров проведено на 600 реципиентках. Исследователи заявляли о 92,2%

выживаемости ооцитов после оттаивания и отсутствии значительного различия в частоте оплодотворяемости (72,2% в группе витрификации и 73,3% в группе с использованием нативных ооцитов). Частота имплантации в группе витрифицированных и нативных ооцитов составила 39,9% и 40,9%, клинической беременности – 55,4% и 55,6% соответственно; при среднем количестве перенесенных эмбрионов, равном 1,7 [33,34]. Описанные исследования и мета-анализ 2011 г. [35] свидетельствует об отсутствии различия в частоте наступления клинической беременности в программах ЭКО/ИКСИ с использованием нативных и донорских ооцитов.

Применение витрификации ооцитов сегодня. Эффективность криоконсервации ооцитов привела к значительному упрощению программ донации. Банк криоконсервированных ооцитов дает возможность выбора донора, а также приводит к снижению стоимости за счет ухода от синхронизации циклов донора и реципиентки [26].

Известным фактом является наступление синдрома преждевременного истощения яичников у женщин, подвергающихся гонадотоксической терапии (химиотерапия, лучевая терапия) по поводу онкологических заболеваний [1]. К тому же, некоторым пациентам производится удаление или резекция яичников по поводу доброкачественных и злокачественных новообразований. Криоконсервация зрелых ооцитов в криобанке с целью сохранения генетического материала сегодня является необходимой процедурой у женщин постпубертатного периода, у которых нет партнера, а также при отказе от донации сперматозоида для криоконсервации эмбриона.

Методика с указанной целью еще не имеет обширных данных о частоте наступления клинических беременностей и рождения детей, необходимых для статистической оценки результатов. Тем не менее, криоконсервация ооцитов остается одной из трех опций сохранения фертильности, рекомендуемых специалистами ВРТ онкологическим пациенткам.

Полиморфные варианты некоторых генов, в частности BRCA ½ мутации, ассоциированы с высоким риском развития рака яичников. После 35 лет в европейских странах рекомендуют проводить профилактическую сальпингоофорэктомию. Идеально выполнить указанную операцию после рождения ребенка, что из социальных соображений современной женщине не всегда представляется возможным. Рекомендация криоконсервации ооцитов – рациональная тактика ведения таких пациенток.

Вовремя диагностированные генетические нарушения, несущие высокий риск формирования синдрома преждевременного истощения яичников (мозаичная форма синдрома Шерешевского-Тернера, делеции X-хромосомы, премутация X-ломкой хромосомы и др.), благодаря современным криотехнологиям и молекулярно-генетическим методам предимплантационной генетической диагностики позволяют сохранить ооциты таких женщин и в дальнейшем провести селекцию эмбриона для рождения здорового ребенка [1].

Эндометриоз является известной проблемой при лечении бесплодия. По данным исследования Muzii [38], выяснен механизм воздействия эндометриозом на овариальный резерв. Вокруг кисты формируется так называемый «перикистозный фиброз», что приводит к гибели фолликулярного аппарата коркового слоя яичника. Рецидивирующие эндометриозные кисты, неоднократные оперативные вмешательства по этому поводу приводят к значительному снижению овариального резерва, что в итоге может привести женщину к необходимости донации ооцитов. Криоконсервация яйцеклеток пациенток, страдающих эндометриозом, – оптимальное решение проблемы.

В практике ВРТ встречаются случаи отсутствия сперматозоидов на день оплодотворения полученных ооцитов после трансвагинальной пункции. Криоконсервация ооцитов в указанных случаях позволяет добиться положительного результата программы ЭКО с процентом эффективности, аналогичным такому при использовании нативных [29,38] ооцитов и наличия спермы мужа.

С возрастом (после 35 лет) происходит критическое снижение овариального резерва, повышение частоты привычного невынашивания беременности, хромосомных аномалий гамет. Криоконсервация ооцитов позволяет отложить наступление беременности и рождение ребенка по поздний репродуктивный период, что сегодня стало возможно благодаря развитию криотехнологий [31]. Данная процедура сохранения ооцитов – альтернатива лечению бесплодия в позднем репродуктивном периоде.

Успех в криоконсервации яйцеклеток получил широкое распространение [29] и высокую эффективность за последние 5 лет. Акушерские и перинатальные исходы после криоконсервации ооцитов не отличаются от таковых в группе нативных ооцитов.

Доказанная частота оплодотворяемости и наступления клинической беременности, отсутствие увеличения хромосомных аномалий, врожденных пороков развития, указывает на высокие результаты, достигнутые в криоконсервации ооцитов. Сегодня эту методику не считают экспериментальной.

Криоконсервация овариальной ткани

Успехи современного лечения онкологических заболеваний привели к значительному улучшению результатов лечения, что обусловило увеличение выживаемости и уменьшение частоты рецидивов заболевания у пациентов. Но, к сожалению, проблема стерилизации женщин репродуктивного периода после лечения осталась нерешенной [1,5]. Так, неотъемлемой частью лечения онкологических заболеваний в США, странах Западной Европы, Израиле, России (с 2011 г.) является процедура сохранения фертильности перед химио- и лучевой терапией по поводу онкологических заболеваний.

Программы сохранения фертильности с использованием криоконсервации овариальной ткани после определения тактики ведения пациентки включают забор коркового слоя яичника оперативным путем. Существует

2 варианта: удаление яичника и резекция коркового слоя, в котором, собственно, и сосредоточен фолликулярный аппарат яичника. Оптимальным является второй вариант, затем следует криоконсервация фрагментов препарированного коркового слоя яичника. После прохождения лечения, заключения врача-онколога и принятия пациенткой решения о восстановлении фертильности криоконсервированный материал размораживают и производят трансплантацию.

Известны 2 места трансплантации коркового слоя яичника: ортотопически (в мозговой слой яичника) и гетеротопически (в подкожно-жировую клетчатку передней брюшной стенки, предплечья, в прямые мышцы живота).

Методы криоконсервации ткани яичника, применяемые сегодня в клинической практике – медленное программное замораживание, витрификация. Используют также быстрое замораживание (в парах азота), но этот метод для овариальной ткани не используется в клинической практике.

Для криоконсервации овариальной ткани используют 2 группы криопротекторов: проникающие (диметилсульфоксид, этиленгликоль, пропиленгликоль, глицерол) и непроникающие (сахароза, поливинилпирролидон, полиэтиленоксид и др.). Процесс заморозки заключается в препарировании коркового слоя яичника, помещении его в раствор криопротекторов и, собственно, замораживании в зависимости от выбранной методики.

В специализированной литературе описаны 20 случаев рождения детей после трансплантации криоконсервированной ткани яичника. Количество проведенных трансплантаций при этом не известно. Во всех случаях использован метод медленного программного замораживания с использованием ДМСО, программой, предложенной R. Gosgen, проведена ортотопическая трансплантация.

Описано множество работ о сравнении методов замораживания овариальной ткани. По данным В. Керос, S. Silber, сохранность фолликулов была статистически значимо выше после витрификации коркового слоя овариальной ткани в сравнении с результатами медленного программного замораживания. Работа Amorim подтвердила результаты предыдущих исследователей о сохранности и потенциальной жизнеспособности витрифицированной человеческой овариальной ткани. Но для внедрения витрификации в клиническую практику полученных результатов *in vitro* недостаточно, появилась необходимость в исследовании выживаемости витрифицированной овариальной ткани *in vivo*.

В 2013 г. на конференции Российской ассоциации репродукции человека харьковской группой исследователей сделан доклад об успешной ксенотрансплантации коркового слоя яичников женщины после витрификации и размораживания в брюшную полость четверым лабораторным животным; через 3,5 месяца во время контрольной лапаротомии обнаружен рост фолликулов размерами от 3 мм до 11 мм.

Криоконсервация овариальной ткани позволяет со-

хранить примордиальные и первичные фолликулы с содержащимися в них ооцитами ранних стадий развития (ооциты 1-го порядка), что из-за высокой закладки фолликулов имеет большой потенциал для реализации репродуктивной функции. Криотехнологии, направленные на сохранение овариальной ткани, по данным С.А. Amorim приводят к потере 7–15% жизнеспособных фолликулов. Ишемический период (т.е. время после трансплантации до формирования реваскуляризации) может привести к потере от 20% до 60% фолликулов, по данным S. Silber. Исследования Kagawa в области витрификации и медленного замораживания ткани яичника обнаружили различия в степени повреждения ооцитов ранних стадий развития, значительно отличающуюся в группе последнего в худшую сторону. Это привело к еще более интенсивным разработкам витрификации как метода сохранения коркового слоя яичников.

С точки зрения криобиологии задача ученых состоит в повышении выживаемости овариальной ткани после криоконсервации. Для уменьшения ишемического периода после трансплантации разработаны методы препарирования перед замораживанием, что приводит к ускорению процессов реваскуляризации и формирования фолликулогенеза. Пионерам в клиническом применении витрификации в качестве метода криоконсервации овариальной ткани являются США, Япония (Kagawa N., Kuwayama M.), с 2013 г. методы применяют в Украине.

Выводы

Современные программы вспомогательных репродуктивных технологий не представляются возможными без криотехнологий.

С появлением витрификации значительно выросла эффективность сохранения эмбрионов, благодаря чему результативность циклов ЭКО/ИКСИ значительно увеличилась. Развитие сред, техники криоконсервации привело к новому направлению – витрификации ооцитов, что еще в 1980 г. было предметом дальних перспектив. Сегодня существует множество коммерческих сред для витрификации репродуктивных клеток, что делает этот метод рутинным.

Успехи смежных направлений медицины, в частности онкологии, стали диктовать перед ВРТ новые задачи – решение вопроса о реабилитации пациенток после гонадотоксического лечения. Так, сегодня криотехнологии дают возможность восстановить и реализовать репродуктивную функцию при помощи криоконсервации ткани яичника.

Благодаря тому, что криоконсервация спермы, эмбрионов и ооцитов стала рутинной практикой, человечеству открылись новые горизонты в лечении бесплодия, сохранении фертильности, а также планировании реализации репродуктивного потенциала в течение жизни.

Список литературы

1. Male infertility in cancer patients: Review of the literature / Gert R. Dohle, Erasmus M.C. // International Journal of Urology. – 2010. – № 17. – P. 327–331.
2. Faten F. Abdel Hafez Slow freezing, vitrification and ultra-rapid freezing of human embryos: a systematic review and

- meta-analysis / Faten F. Abdel Hafez, Nina Desai et al. // Reproductive BioMedicine Online. – 2010. – Vol. 20. – Iss. 2. – P. 209–222.
3. Matheus Roque Fresh embryo transfer versus frozen embryo transfer in in vitro fertilization cycles: a systematic review and meta-analysis / Matheus Roque, Karinna Lattes, Sandra Serra, Ivan Sola et al. // Fertility and Sterility. – 2013. – Vol. 99. – Iss. 1. – P. 156–162.
4. Kalliopi E. Loutradi Venetis Unit for Human Reproduction, 1st Department of Obstetrics and Gynaecology, Papageorgiou General Hospital, Thessaloniki, Greece. Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: a systematic review and meta-analysis / Kalliopi E. Loutradi, Efstratios M. Kolibianakis, Christos A. Venetis // Fertility and Sterility. – 2008. – Vol. 90. – P. 186–193.
5. Fertility preservation in patients undergoing gonadotoxic therapy or gonadectomy: a committee opinion. The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine American Society for Reproductive Medicine // Fertility and Sterility. – Birmingham, Alabama, 2013. – Vol. 100. – Iss. 5. – P. 1214–1223.
6. Liebermann J. Vitrifying and warming of human oocytes, embryos, and blastocysts: vitrification procedures as an alternative to conventional cryopreservation / J. Liebermann, M.J. Tucker // Methods Mol Biol. – 2004. – Vol. 254. – P. 345–364.
7. McKinney S.L. Elective cryopreservation of embryos at the blastocyst stage to prevent OHSS – High success rate and accurate patient management / S.L. McKinney, G.A. Weitzman, M.R. Freeman, C.M. Whitworth [et al.] // Fertility and Sterility. – Vol. 82. – Supplement 2. – P. S157.
8. Pegg D.E. The role of vitrification techniques of cryopreservation in reproductive medicine / D.E. Pegg // Hum. Fertil. (Camb.). – 2005. – Vol. 8 (4). – P. 231–239.
9. Huddleston H.G. Coasting vs cryopreservation of all embryos for prevention of ovarian hyperstimulation syndrome in in vitro fertilization / H.G. Huddleston, C. Racowsky, K.V. Jackson, J.H. Fox [et al.] // Fertility and Sterility. – Vol. 90. – Issue 4. – P. 1259–1262.
10. OPINION The pathophysiology of ovarian hyperstimulation syndrome – views and ideas // Human Reproduction. – Vol. 2. – №6. – P. 1129–1137.
11. Rajneesh S. Mathur Distinction between early and late ovarian hyperstimulation syndrome / Rajneesh S. Mathur, A. Valentine Akande, Stephen D. Keay, Linda P. Hunt [et al.] // Fertility and Sterility. – Vol. 73. – Issue 5. – P. 901–907.
12. Child T. A randomized controlled trial of natural versus GnRH-agonist/HRT regimes for frozen embryo replacement / T. Child, E. McVeigh, K. Turner // Fertility and Sterility. – Vol. 100. – Issue 3. – Supplement. – P. S146.
13. Schlenker T. Blastocyst vitrification following trophectoderm biopsy yields excellent survival rates / T. Schlenker, J.M. Stevens, M. Rawlins, S. McCormick [et al.] // Fertility and Sterility. – Vol. 90. – Supplement. – P. S78.
14. Bulent Urman Impact of fresh-cycle variables on the implantation potential of cryopreserved-thawed human embryos / Bulent Urman, Basak Balaban, Kayhan Yakin // Fertility and Sterility. – Vol. 87. – Issue 2. – P. 310–315.
15. Fanchin R. Computerized assessment of endometrial echogenicity: clues to the endometrial effects of premature progesterone elevation / R. Fanchin, C. Righini [et al.] // Fertility and Sterility. – Vol. 71. – Issue 1. – P. 174–181.
16. Acosta A.A. Endometrial dating and determination of the window of implantation in healthy fertile women / A.A. Acosta, L. Elberger, M. Borghi, J.C. Calamera [et al.] // Fertility and Sterility. – Vol. 73. – Issue 4. – P. 788–798.
17. Politsky A.J. Serum progesterone on the day of human chorionic gonadotropin administration predicts clinical pregnancy of sibling frozen embryos / A.J. Politsky, J.L. Daif, S. Jindal, H.J. Lieman [et al.] // Fertility and Sterility. – Vol. 92. – Issue 6. – P. 1880–1885.

18. *Al-Azemi M.* Elevated progesterone during ovarian stimulation for IVF / M. Al-Azemi, D. Kyrou, E.M. Kolibianakis, P. Humaidan // Reproductive Biomedicine Online. – 2012. – Vol. 24. – Issue 4. – P. 381–388.
19. *Achache H.* Endometrial receptivity markers, they journey to successful embryo implantation / H. Achache, A. Revel // Hum Reprod Update. – 2006. – Vol. 12. – P. 731–746.
20. *Alan H. Handyside* 24-chromosome copy number analysis: a comparison of available technologies / Alan H. Handyside. // Fertility and Sterility. – 2013. – September. – Vol. 100. – № 3. – P. 595–602.
21. *William B. Schoolcraft* Comprehensive chromosome screening of trophectoderm with vitrification facilitates elective single-embryo transfer for infertile women with advanced maternal age / William B. Schoolcraft, Mandy G. Katz-Jaffe // Fertil Steril. – 2013. – Vol. 100. – Iss. 3. – P. 615–619.
22. *Ortega-Hrepich C. A* «freeze-all» embryo strategy after in vitro maturation: a novel approach in women with polycystic ovary syndrome? / C. Ortega-Hrepich, Dominic stoop, L. Guzman, L. Van Landuyt [et al.] // Fertil Steril. – 2013. – Vol. 100. – Iss. 4. – P. 1002–1007.
23. *Wenhao Shi.* Perinatal and neonatal outcomes of 494 babies delivered from 972 vitrified embryo transfers / Wenhao Shi, Xia Xue, Silin Zhang, Wanqiu Zhao [et al.] // Fertility and Sterility. – Vol. 97. – Iss. 6. – P. 1338–1342.
24. *Annick Schreurs* Increased frequency of chromosomal abnormalities in female partners of couples undergoing in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection / Annick Schreur, Eric Legius, Christel Meuleman, Jean-Pierre Fryns, Thomas M D'Hooghe. // Fertil Steril. – 2000. – Vol. 74. – Iss. 1. – P. 94–96.
25. *Holly B. Ford* Recurrent Pregnancy Loss: Etiology, Diagnosis, and Therapy / Holly B. Ford, Danny J. Schust // Rev Obstet Gynecol. – 2009. – Vol. 2 (2). – P. 76–83.
26. *Gérard Chaouat* Immunological Similarities between Implantation and Pre-eclampsia / Gérard Chaouat, Nathalie Ledée-Bataille, Sylvie Dubanchet // American Journal of Reproductive Immunology. – 2005. – Vol. 53. – Iss. 5. – P. 222–229.
27. *Vanneste E.* PGD for a complex chromosomal rearrangement by array comparative genomic hybridization / E. Vanneste, C. Melotte // Human Reproduction. – 2011. – Vol. 26. – № 4. – P. 941–949.
28. *Hellani A.* Successful pregnancies after application of array-comparative genomic hybridization in PGS-aneuploidy screening / A. Hellani, K. Abu-Amero, J. Azouri, S. El-Akoum // Reprod Biomed Online. – 2008. – Vol. 17. – P. 841–847.
29. *Chen C.* Pregnancy after human oocyte cryopreservation / C. Chen // Lancet. – 1986. – Vol. 1. – P. 884–886.
30. *Chang L.J.* Blastocyst biopsy and vitrification are effective for preimplantation genetic diagnosis of monogenic diseases / L.J. Chang // Hum. Reprod. first published online. – 2013. – Vol. 25. – Iss. 5. – P. 1435–1444.
31. *Hodes-Wertz B.* Retrospective analysis of outcomes following transfer of previously cryopreserved oocytes, pronuclear zygotes and supernumerary blastocysts / B. Hodes-Wertz, N. Noyes, C. Mullin, C. McCaffrey, J.A. Grifo // Reprod Biomed Online. – 2011. – Vol. 23. – P. 118–123.
32. *Eid J.* Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules / J. Eid, A. Fehr, J. Gray, K. Luong, J. Lyle, G. Otto [et al.] // Science. – 2009. – Vol. 323. – P. 133–138.
33. *Kim T.J.* Vitrification of oocytes produces high pregnancy rates when carried out in fertile women / T.J. Kim, L.R. Laufer, S.W. Hong // Fertil Steril. – 2010. – Vol. 93. – P. 467–474.
34. *Rienzi L.* Consistent and predictable delivery rates after oocyte vitrification: an observational longitudinal cohort multicentric study / L. Rienzi, A. Cobo, A. Paffoni, C. Scarduelli, A. Capalbo, G. Vajta [et al.] // Hum Reprod. – 2012. – Vol. 27. – P. 1606–1612.
35. *Garcia-Velasco J.A.* Five years' experience using oocytes vitrification to preserve fertility for medical and nonmedical indications / J.A. Garcia-Velasco, J. Domingo, A. Cobo, M. Martínez [et al.] // Fertility and Sterility. – 2011. – Vol. 99. – Iss. 7. – P. 1994–1999.
36. *Son W.Y.* Pregnancy outcome following transfer of human blastocysts vitrified on electron microscopy grids after induced collapse of the blastocoele / Son W.Y., Yoon S.H., Yoon H.J., Lee S.M., Lim J.H. // Hum. Reprod. – 2003. – Vol. 18 (1). – P. 137–139.
37. *Kuwayama M.* Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination / Kuwayama M., Vajta G., Ieda S., Kato O. // Reprod. Biomed. Online. – 2005. – Vol. 11 (5). – P. 608–614.
38. *Muzii L.* The impact of preoperative gonadotrophin releasing hormone agonist treatment on laparoscopic excision of ovarian endometriotic cysts / Muzii L., Marana R., Caruana P., Mancuso S. // Fertil Steril. – 1996. – Vol. 65. – P. 1235–1237.

Сведения об авторе:

Авраменко Н.В., д. н. гос. упр., зав. каф. акушерства, гинекологии и репродуктивной медицины факультета последипломного образования, Запорожский государственный медицинский университет, заслуженный врач Украины, врач акушер-гинеколог высшей категории, E-mail: zocrrfs@mail.ru.

Надійшла в редакцію 08.10.2013 р.