

## Витрификация овариальной ткани

В.А. Феськов<sup>1</sup>, Н.Н. Сотник<sup>1</sup>, Е.В. Сомова<sup>1</sup>, А.А. Тищенко<sup>1</sup>, В.Ю. Прокопюк<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Центр репродукции человека «Клиника проф. Феськова», г. Харьков

<sup>2</sup>Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

### Ovarian Tissue Vitrification

V.A. Feskov<sup>1</sup>, N.N. Sotnik<sup>1</sup>, O.V. Somova<sup>1</sup>, A.A. Tischenko<sup>1</sup>, V.Yu. Prokopuk<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Human Reproduction Center 'Clinic of Professor Feskov', Kharkov, Ukraine

<sup>2</sup>Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine  
of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Причиной потери детородной функции в репродуктивном возрасте являются хирургические вмешательства и гонадотоксическая терапия. Сохранение репродуктивного потенциала молодых женщин – актуальная задача репродуктивной медицины.

Цель исследования – разработать методику витрификации овариальной ткани с последующим контролем ее эффективности на лабораторных животных.

Было витрифицировано 14 фрагментов коркового слоя яичника женщин в возрасте от 21 до 30 лет с нормальным овариальным резервом и диагнозами онкогинекологической патологии. Для витрификации использовались проникающие и непроникающие криопротекторы, белковый заменитель, буферный раствор («Sigma Aldrich», США). Было проведено гистологическое исследование с окраской гематоксилин-эозином до витрификации и после отогрева; культивирование овариальной ткани после размораживания с исследованием уровня эстрадиола в культуральной среде через 24 и 72 ч. Четырех самок кроля с исходным уровнем эстрадиола ( $40 \pm 5$ ) пг/мл, после двухсторонней овариэктомии уровень эстрадиола составил менее 1,5 пг/мл, что стало признаком артифициальной менопаузы. Далее животным была проведена гетеротопическая (в широкую связку матки, брюшину передней брюшной стенки, в карманы подкожно-жировой клетчатки) ксенотрансплантация размо-роженных фрагментов коркового слоя овариальной ткани женщин. Животным проводился мониторинг уровня эстрадиола и прогестерона.

При гистологическом исследовании суммарное количество преантральных фолликулов составило 155, из них 146 фолликулов (93,5%) – нормальной морфологии; 9 (6,5%) – с признаками повреждения (разрыв фолликула, сморщивание ооцита). Характеристики стромы были идентичны образцам до витрификации. Уровень эстрадиола в культуральной среде через 24 и 72 ч составил ( $32,4 \pm 5,4$ ) и ( $240,7 \pm 30,5$ ) пг/мл соответственно. Стабильные показатели эстрадиола у животных установились через 3,5 месяца. Животным была проведена стимуляция роста фолликулов гонадотропинами (25 ЕД в течение 6 дней, 50 ЕД в течение 4 дней, суммарная доза составила 350 ЕД Пурегона). При лапаротомии на брюшине передней брюшной стенки констатируется факт роста фолликулов размерами от 3 до 11 мм. В других местах рост фолликулов не обнаружен.

Таким образом, ксенотрансплантация девитрифицированной овариальной ткани лабораторным животным показала сохранность полноценности фолликулярного аппарата коркового слоя яичника после витрификации.

Surgeries and gonadotoxic therapy during cancer and non-cancer treatment result in loss of fertility in reproductive age. Preservation of fertility potential in young women is an urgent task for reproductive medicine today.

The research objective was to develop the procedure for ovarian tissue vitrification with the subsequent control of its efficiency by xenotransplantation to laboratory animals.

There were vitrified 14 fragments of ovarian cortical layers of women aged of 21 to 30 years with normal ovarian reserve who underwent the surgeries due to oncogynecological pathologies. Penetrating and non-penetrating cryoprotectants, protein substitute, buffer solution (Sigma Aldrich, USA) were used for vitrification. Histological examination using haematoxylin eosin staining was performed before vitrification and after warming; ovarian tissue was cultured after warming and estradiol content was measured in culture medium after 24 and 72 hrs. In 4 female rabbits with baseline estradiol of  $40 \pm 5$  pg/ml; following surgical ovariectomy the estradiol level was less than 1.5 pg/ml, and this was considered as a sign of simulated menopause. Post surgery the animals were heterotopically xenotransplanted with frozen-thawed cortical fragments of women ovarian tissue (to broad ligament of uterus, peritoneum of anterior abdominal wall, and into subcutaneous fat pockets). Hormonal monitoring in animals included assessment of estradiol and progesterone levels.

Total number of preantral follicles assessed histologically was 155: 146 follicles (93.5%) with normal morphology; 9 (6.5%) with signs of damage (rupture of the follicle, oocyte shrinkage). Characteristics of stroma were similar as in ovarian cortical samples before vitrification. Estradiol level in the culture medium after 24 and 72 hrs was ( $32.4 \pm 5.4$ ) and ( $240.7 \pm 30.5$ ) pg/ml, respectively. Stable estradiol indices were found in animals after 3.5 months. Animals underwent a 10-day treatment with Puregon gonadotropin (6 days with 25 IU, 4 days with 50 IU, totally 350 IU). Laparotomy on the peritoneum of anterior abdominal wall revealed the growth of follicles, which were of 3 to 11 mm. No follicle growth was found in other sites of ovarian tissue grafting.

Thus, the xenotransplantation of devitrified ovarian tissue to laboratory animals allowed to preserve the function of follicles survived during ovarian cortical layer vitrification.

