

ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЕ РЕПРОДУКТИВНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В СОХРАНЕНИИ РЕПРОДУКТИВНОЙ ФУНКЦИИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ

М.В. Киселёва, Е.В. Абакушина, А.Ф. Цыб

ГУ МРНЦ РАМН, Обнинск

ASSISTED REPRODUCTIVE TECHNOLOGIES FOR FERTILITY PRESERVATION OF CANCER PATIENTS

M.V. Kiseleva, E.V. Abakushina, A.F. Tsyb

Medical Radiology Research Centre of Russian Academy of Medical Science, Obninsk

Over the past years the number of young people diagnosed with cancer has been increasing. Aggressive chemotherapy and radiotherapy have resulted in an increased number of long-term cancer survivors of young cancer patients, but major side effects of these treatments are ovarian failure and subsequently lead to a loss of fertility. When cancer is diagnosed, patients and oncologists generally focus on treating the disease, and as a result, critical questions about fertility can go unasked or unanswered. If this happens, cancer patients may miss the only opportunity they have to preserve their ability to have a biological child. Fertility preservation should be an integral part of improving the quality of life in cancer survivors.

Key words: cryopreservation, in-vitro fertilization, oocysts, intracytoplasmic spermatozoon injection, cryoprotectant

В настоящее время число пациентов, перенесших какое-либо онкологическое заболевание, достигает 10 млн. Доля молодых людей с вновь выявленным онкологическим заболеванием ежегодно возрастает. К 2010 г. ожидается, что одним из 250 взрослых пациентов будет тот, кто перенес онкологическое заболевание в детстве [1]. В России к 2006 г. насчитывалось около 1730,9 случая онкологических заболеваний на 100 тыс. населения, или 2,466 млн жителей, т.е. 1,7% популяции России. Среди всех онкологических диагнозов 15% приходится на пациентов моложе 40 лет.

Применение агрессивной химио- (ХТ) и радиотерапии у молодых онкологических пациентов привело к увеличению продолжительности их жизни, но, с другой стороны, это лечение часто вызывает бесплодие из-за массивного повреждения клеток гаметогенеза, что ведет к истощению овариального резерва и преждевременной менопаузе у женщин [2] и нарушению сперматогенеза у мужчин. По данным статистики, 60% пациентов хотели бы иметь собственных детей в будущем [3].

Ионизирующая радиация оказывает негативное воздействие на функцию гонад у пациентов всех возрастных групп. Степень и распространенность повреждения зависят от полученной дозы, области облучения и возраста пациента. Показано, что чем старше женщина, тем более высокий риск повреждения фолликулов у нее наблюдается [4]. Это можно объяснить наличием исходно большего овариального резерва у молодых пациентов, который уменьшается с возрастом вследствие атрезии примордиальных фолликулов.

Действие всех ХТ-препаратов основано на прерывании жизненных процессов клетки и задержке нормальной клеточной пролиферации. Часто ХТ-средства используются в комбинации из-за их синергических эффектов, но это приводит и к дополнительному увеличению их неблагоприятных эффектов на организм, в частности на фолликулярный резерв яичников. В экспериментах на животных D. Meigow и соавт. [5] продемонстрировали, что наличие регулярных менструаций и беременности после проведенной ХТ не всегда является показателем сохранного овариально-фолликулярного резерва. Авторы также выявили, что пациенткам с истощением яичников вследствие применения высокодозной ХТ или лучевой терапии (ЛТ) не следует откладывать рождение ребенка на долгие годы. Такие больные должны задумываться о беременности через несколько лет после лечения в период стабилизации процесса, но не раньше чем через 6—12 мес из-за возможных токсических эффектов терапии на растущие ооциты [6].

В настоящее время во всем мире в онкологию активно внедряются различные методы и новшества вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), которые могут предоставить пациенту выбор и возможность сохранения фертильности. Эти технологии устойчиво привлекают внимание онкологов, все больше увеличивая их интерес, однако в каждодневной работе большое значение имеет междисциплинарное сотрудничество между онкологами, гинекологами, педиатрами, хирургами, репродуктологами, иммунологами и эндокринологами. Оно необходи-

мо для того, чтобы выбрать индивидуальный вариант сохранения репродуктивной функции для конкретного пациента перед началом лечения основного заболевания.

Для сохранения репродуктивной функции у женщин существует несколько способов [7, 8]: транспозиция яичников из зоны облучения, гормональная супрессия функции яичников с использованием агонистов гонадотропинвысвобождающего гормона (GnRH-a), применение ингибиторов апоптоза, криоконсервация эмбрионов, криоконсервация ооцитов со стимуляцией или в естественном цикле, криоконсервация ткани яичника, а также создание искусственных ооцитов с помощью клонирования, т.е. пересадка ядра соматической клетки в донорский ооцит.

У пациенток, подвергающихся гонадотоксической радиотерапии, транспозиция яичников из области облучения может частично поддерживать овариальную функцию. Это показано при лимфомах Ходжкина, раке шейки матки, влагалища, прямой кишки и саркоме малого таза. Доза облучения, приходящаяся на яичники после транспозиции, уменьшается приблизительно на 5–10% от той, которая была бы получена для яичников *in situ* [9].

В экспериментах было установлено, что назначение известного ингибитора апоптоза — сфингозин-1-фосфата мышам, леченным доксорубицином, привело к защите ооцитов от апоптоза [10], а также сохраняло фертильность у облученных мышей женского пола и не вызывало каких-либо повреждений генома у потомства [11]. Исследования показывают, что ингибиторы апоптоза — это многообещающие агенты, но они все еще находятся в очень ранней экспериментальной стадии. Также известно, что большинство цитостатических препаратов действует путем активации апоптоза у опухолевых клеток, а следовательно, использование ингибиторов апоптоза может отрицательно отразиться на редукции опухолевой массы. В дальнейших исследованиях должен быть разъяснен отрицательный эффект применения ингибиторов апоптоза в сочетании с традиционными химиопрепаратами.

Криоконсервация эмбрионов является самым успешным и отработанным на сегодняшний день подходом к сохранению фертильности. Человеческий эмбрион очень устойчив к повреждающему воздействию криопротекторов. Обычные нормы выживания эмбрионов после оттаивания находятся в диапазоне 35–90%, в то время как нормы их имплантации оцениваются в среднем между 8 и 30%. Если криоконсервации подвергаются несколько эмбрионов, то со-

вокупный показатель беременностей может быть больше, чем в 60% случаев [12]. Частота пересадки одного замороженного эмбриона в среднем оценивается как успешная только в 18–20% наблюдений [12]. Если от одной пациентки удалось получить много зрелых ооцитов, то существует возможность выполнить несколько попыток переноса эмбрионов. Однако этот подход требует оплодотворения яйцеклетки *in vitro* и наличия партнера. Также метод криоконсервации эмбрионов не приемлем для юных девочек и противопоказан пациенткам с гормонозависимыми формами рака, так как для индукции овуляции, созревания и последующего забора ооцитов требуется гормональная стимуляция яичников. Сегодня благодаря использованию современных возможностей методов ВРТ мужской фактор бесплодия является проблемой только в очень редких случаях, когда имеет место полная необструктивная азооспермия, и даже в этих случаях можно использовать замороженную сперму донора.

Сбор и консервация ооцитов более проблематичны, чем криоконсервация спермы или эмбрионов. Первое препятствие — это высокая чувствительность ооцитов к охлаждению, вероятно, из-за большого содержания липидов в цитоплазме и раннего хромосомного аппарата. Второе — охлаждение, образование внутрицитоплазматических кристаллов льда и добавление криопротекторов повреждают цитоскелет ооцита и могут увеличить число анеуплоидий в человеческих ооцитах [13]. Инкубация с криопротекторами также вызывает затвердевание блестящей оболочки ооцита, поэтому все протоколы криоконсервации и оттаивания включают последующее введение единичного сперматозоида в яйцеклетку, т.е. внутрицитоплазматическую инъекцию спермы, или так называемую процедуру ИКСИ (ICSI — intracytoplasmic sperm injection) как меру предосторожности и перестраховки. Оплодотворение в этих случаях должно быть выполнено в интервале от 3 до 5 ч после размораживания, в то время пока ооцит остается способным к оплодотворению.

Дальнейшие недостатки этого метода заключаются в том, что онкологические больные имеют только единственную возможность для забора ооцитов перед началом потенциально стерилизующего лечения, так как цикл индукции стимуляции яичников требует нескольких недель и задерживает начало лечения основного заболевания на несколько месяцев, что подчас тоже является критичным. Успех метода также зависит от общего числа собранных ооцитов. Если количество ооцитов <10, то это означает низкую вероятность наступления бе-

ременности. Общая доля зарегистрированной рождаемости детей из замороженных ооцитов равна приблизительно 2% — это намного ниже, чем для методов экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) с использованием свежих ооцитов [14].

Несмотря на все трудности забора, заморозки и оплодотворения ооцитов, в последние годы был достигнут успех в области криоконсервации ооцитов человека. В настоящее время в результате применения замороженных ооцитов в мире уже рождено около 200 младенцев. Выживание ооцитов после процесса замораживания/размораживания находится в пределах 70–95%, что сопоставимо с криоконсервацией эмбрионов и зависит от используемых методов. Благодаря изменению среды результаты криоконсервации ооцитов улучшились. После того как была разработана прогрессивная методика мгновенного замораживания биологического материала — витрификация (vitrification), ученые стали получать гораздо лучшие результаты выживания ооцитов без потребности в использовании сложного и дорогостоящего оборудования [15].

Обычный процент оплодотворения замороженных ооцитов с использованием метода ИКСИ равен приблизительно 70–90, что сопоставимо с процентом оплодотворенных свежих ооцитов. Однако число беременностей, полученных из замороженных ооцитов, варьирует от 10 до 40%. Главные причины переменного успеха — различия в технике криоконсервации и использование токсичных криопротекторов. Клинически криоконсервация ооцитов может быть показана для сохранения фертильности у женщин, перенесших онкологическое заболевание, чтобы отложить рождение ребенка и сохранить ооциты для дальнейшего использования в программах ЭКО. Заморозка ооцитов может также быть выполнена как метод альтернативный криоконсервации эмбрионов из-за этических предпосылок. Но не всем онкологическим пациентам показана гормональная стимуляция в связи с возможностью прогрессии опухолевого роста, а забор единственного ооцита в естественном цикле абсурден. Таким образом, альтернативным методом сохранения фертильности является криоконсервация ткани яичника.

Метод криоконсервации ткани яичников появился относительно недавно, в начале 1950-х годов, и охарактеризовал себя как легкий, быстрый и недорогой. Идея относительно замораживания овариальной ткани основана на том, что кортикальный слой яичника, содержащий огромное число фолликулов, является за-

щитной оболочкой для незрелых ооцитов, а они более устойчивы к криопротекторам, чем зрелые, потому что имеют неактивный метаболизм [16]. Клинические показания для криоконсервации ткани яичника почти не отличаются от таковых для криоконсервации ооцитов, но имеют меньше ограничений (любая фаза менструального цикла, детский возраст) и больший потенциал для фертильности [17], поскольку ткань яичника содержит 1000 примордиальных фолликулов (у девочек до 10 лет — в 3 мм³, в возрасте 10–15 лет — в 15 мм³, от 15 до 34 лет — в 50 мм³) и продемонстрирована жизнеспособность фолликулов после замораживания и оттаивания [18]. Тем не менее остается множество нерешенных вопросов, касающихся выбора криопротектора, наименее токсичного для незрелых ооцитов, условий замораживания и оттаивания, а также проблем аутотрансплантации ткани яичника и гормональной стимуляции онкологических больных. Необходимы дальнейшее изучение и методики культивирования незрелых ооцитов *in vitro* после размораживания ткани яичника. На сегодняшний день в мире известно только 2 случая рождения детей в результате использования криоконсервированной ткани яичника [19, 20]. Методика криоконсервации все еще остается экспериментальной и требует проведения дальнейших испытаний на животных моделях.

Метод криоконсервации ткани яичников доступен как для половозрелых пациенток, так и для больных детского возраста. Овариальная ткань может быть получена также во время любого другого оперативного вмешательства вне зависимости от менструального цикла. Применение прогрессивного и высокоэффективного метода витрификации ткани яичников, т.е. прямого и мгновенного погружения ткани после пропитывания ее криораствором в жидкий азот, позволяет максимизировать замораживание и предотвратить образование кристаллов льда, которые повреждают клетки и ткани в процессе медленной заморозки. Выбор невысокой доли криопротектора в замораживающем растворе минимизирует токсическое действие этого химического агента на фолликулы и окружающие их клетки и ткани.

В настоящее время использование методов ВРТ, в частности криоконсервации овариальной ткани, дает онкологическим больным реальный шанс на сохранение фертильности, что также чрезвычайно важно для пациентов и по психологическим причинам [21].

В связи с видимым прогрессом в лечении онкозаболеваний увеличивается и продолжительность жизни онкологических больных. Ос-

новная задача врачей состоит в улучшении качества жизни таких пациентов. Особенно это касается онкологических больных репродуктивного возраста. Хорошо известно, что комплексное лечение онкологического заболевания — комбинация агрессивной ХТ и ЛТ — приводит к стерилизации как женского, так и мужского организма. Следовательно, первоочередной задачей является сохранение половых клеток и тканей, их содержащих, до начала лечения на стадии постановки диагноза. Перед ХТ и ЛТ, которые потенциально могут привести к потере фертильности, необходимо забирать, криоконсервировать и хранить материал (яйцеклетки, сперматозоиды, овариальную ткань), чтобы использовать его в дальнейшем при наступлении стадии ремиссии. Специальное оборудование позволяет хранить замороженный материал в течение 15–25 лет при температуре -196°C , чего нельзя достичь в обычной жизни. Для онкологических больных репродуктивного возраста необходимо активнее создавать банки половых клеток и тканей. Использование современных методов ВРТ позволит пациентам обрести радость материнства и отцовства.

Однако первоначальной целью любого врача должно быть повышение уровня выживаемости онкологических больных, а уже вторично необхо-

димо улучшать качество жизни пациентов и заботиться об их воспроизводстве.

Молодые женщины и мужчины с вновь диагностированным раком, а также родители детей, которые будут подвергнуты ХТ или облучению для лечения онкологического заболевания, должны знать о возможном негативном действии терапии на репродуктивную функцию. Информирование пациентов необходимо для того, чтобы каждый больной имел возможность сохранить функцию гонад или гаметы (сперматозоиды, яйцеклетки или эмбрионы) до начала агрессивной терапии. Следует также учитывать, что большинство онкологов не знакомы с этими вопросами или не затрагивают их. В таких случаях целесообразно прибегать к консультации со специалистами в области репродукции и бесплодия.

Сохранение фертильности должно быть неотъемлемой частью улучшения качества жизни пациентов, перенесших онкологическое заболевание. Тем не менее по многим причинам невозможно и неэтично рекомендовать всем пациентам один и тот же метод сохранения фертильности. Бесспорно, что первая и основная цель любого врача состоит в том, чтобы вылечить рак, даже если это лечение станет причиной бесплодия.

ЛИТЕРАТУРА

1. Maltaris T., Seufert R., Fischl F. et al. The effect of cancer treatment on female fertility and strategies for preserving fertility. *Eur J Obstet Gynecol and Reprod Biol* 2007;130:148–55.
2. Donnez J., Godin P.A., Qu J., Nisolle M. Gonadal cryopreservation in the young patient with gynaecological malignancy. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2000;12:1–9.
3. Carter J. Cancer-related infertility. *Gynecol Oncol* 2005;99:122–3.
4. Meirow D., Nugent D. The effects of radiotherapy and chemotherapy on female reproduction. *Hum Reprod Update* 2001;7:535–43.
5. Meirow D., Epstein M., Lewis H. et al. Administration of cyclophosphamide at different stages of follicular maturation in mice: effects on reproductive performance and fetal malformations. *Hum Reprod* 2001;16:632–7.
6. Meirow D. Ovarian injury and modern options to preserve fertility in female cancer patients treated with high dose radio-chemotherapy for hemato-oncological neoplasias and other cancers. *Leuk Lymphoma* 1999;33:65–76.
7. Sonmezer M., Oktay K. Fertility preservation in female patients. *Hum Reprod Update* 2004;10:251–66.
8. Donnez J., Martinez-Madrid B., Jadoul P. et al. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: a review. *Hum Reprod Update* 2006;12(5):519–35.
9. Morice P., Juncker L., Rey A. et al. Ovarian transposition for patients with cervical carcinoma treated by radiosurgical combination. *Fertil Steril* 2000;74:743–8.
10. Morita Y., Perez G.I., Paris F. et al. Oocyte apoptosis is suppressed by disruption of the acid sphingomyelinase gene or by sphingosine-1-phosphate therapy. *Nat Med* 2000;6:1109–14.
11. Paris F., Perez G.I., Fuks Z. et al. Sphingosine 1-phosphate preserves fertility in irradiated female mice without propagating genomic damage in offspring. *Nat Med* 2002;9:901–2.
12. Seli E., Tangir J. Fertility preservation options for female patients with malignancies. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2005;173:299–308.
13. Pickering S.J., Braude P.R., Johnson M.H. et al. Transient cooling to room temperature can cause irreversible disruption of the meiotic spindle in the human oocyte. *Fertil Steril* 1990;54:102–8.
14. Gosden R.G. Prospects for oocyte banking and in vitro maturation. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2005;34:60–3.
15. Eroglu A., Toner M., Toth T.L. Beneficial effect of microinjected trehalose on the cryosurvival of human oocytes. *Fertil Steril* 2002;77:152–8.
16. Oktay K., Newton H., Aubard Y. et al. Cryopreservation of immature human oocytes and ovarian tissue: an emerging technology? *Fertil Steril* 2003;69:1–7.
17. Feigin E., Abir R., Fisch B. et al. Laparoscopic ovarian tissue preservation in young patients at risk for ovarian failure as a result of chemotherapy/irradiation for primary malignancy. *J Pediatr Surg* 2007;42:862–4.
18. Sonmezer M., Shamonki M.I., Oktay K. Ovarian tissue cryopreservation: benefits and risks. *Cell Tissue Res* 2005;322:125–32.
19. Donnez J., Dolmans M.M., Demylle D. et al. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet* 2004;364:1405–10.
20. Meirow 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;353:318–21.
21. Hovatta O. Methods for cryopreservation of human ovarian tissue. *Reprod BioMed Online* 2005;10(6):729–34.