

РОЛЬ IN VITRO-ТЕХНОЛОГИЙ В ПРОГРАММАХ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ФЕРТИЛЬНОСТИ ПАЦИЕНТОК С ОНКОПАТОЛОГИЕЙ

Е.Г. Тырсина, В.В. Баринов, Ю.Г. Паяниди, К.И. Жордания

ФГБУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Возможность сохранения фертильности у женщин после лечения онкозаболеваний сегодня становится все более реальной благодаря прогрессу в области вспомогательной репродукции. Все известные способы восстановления фертильности в той или иной мере включают использование in vitro-технологий, а самый обсуждаемый в мировой литературе и считающийся наиболее перспективным из них — метод созревания примордиальных фолликулов вне организма — полностью осуществляется в лабораторных условиях. Практические запросы применения вспомогательных репродуктивных технологий в программах по восстановлению фертильности онкобольных требуют дальнейших фундаментальных исследований по совершенствованию прикладных методов in vitro.

Ключевые слова: онкология, вспомогательные репродуктивные технологии, созревание ооцитов in vitro.

THE ROLE OF IN VITRO TECHNOLOGIES IN THE PROGRAMS OF THE RECOVERY OF FERTILITY IN PATIENTS WITH ONCOPATHOLOGY

E.G. Tyrsina, V.V. Barinov, Ju. G. Payanidi, K.I. Zhordania

Federal Budgetary State Institution N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center
of the Russian Academy of Medical Sciences

The possibility of the fertility preservation in women after the treatment of oncological diseases is becoming more realistic nowadays thanks to the advances in the field of assisted reproduction. All known ways to restore fertility to a greater or lesser degree include the use of in vitro technologies with the most discussed issue in the world literature and considered to be the most promising of them being the method of maturation of primordial follicles ex vivo which is accomplished completely in vitro. Practical needs for the use of assisted reproductive technologies in the programs on the recovery of fertility of oncological patients require further fundamental research regarding the improvement of the applied in vitro methods.

Key words: oncology, assisted reproductive technologies, in vitro maturation of oocytes.

Качество жизни после успешного лечения онкологического заболевания многие молодые женщины связывают с возможностью будущего материнства. По данным Американского общества онкологов, около 25% больных раком женщин или еще не успели родить, или отложили следующую беременность. Поэтому вопрос сохранения фертильности для них крайне важен. Применение современных химио- и радиотерапевтических протоколов позволяет многим больным надеяться на излечение. Однако химиопрепараты и радиация крайне губительны для чувствительных клеток гаметогенеза; в результате такого лечения опустошается овариальный резерв, что приводит к бесплодию и преждевременной менопаузе у женщин [1]. Именно поэтому общим принципом большинства методов сохранения репродуктивной функции онкобольных является забор клеток гаметогенеза до начала агрессивного лечения. В отличие

от обычного ЭКО полученный материал подвергают глубокой заморозке, а манипуляции с ним проводят только после излечения основного заболевания.

Сегодня для пациенток онкологических клиник доступны три способа сохранения фертильности: криоконсервация эмбрионов, ооцитов и овариальной ткани. Они заимствованы из области репродуктивной медицины и принадлежат к вспомогательным репродуктивным технологиям (ВРТ). Однако с учетом специфики самой патологии и методов ее лечения ВРТ в онкологии имеют ряд существенных ограничений, поэтому требуют дополнительных исследований, а также решения целого ряда правовых и этических проблем. Выбор оптимальной стратегии по восстановлению женской фертильности индивидуален для каждой пациентки и зависит от типа и стадии заболевания, протокола лечения, возраста больной и других факторов.

На сегодня единственной отработанной и одобренной онкологами процедурой для сохранения фертильности онкобольных признана лишь криоконсервация эмбрионов. Однако использование этого метода возможно только для пациенток репродуктивного возраста, требует наличия партнера и ограничено такими существенными факторами, как смещение сроков противоопухолевой терапии, вызванное необходимостью овариальной стимуляции, которая нежелательна при любых злокачественных новообразованиях и категорически противопоказана при гормонозависимых опухолях. По этой же причине для многих женщин невозможна и криоконсервация зрелых яйцеклеток. Некоторые женщины не могут согласиться на криоконсервацию эмбрионов по личностным, религиозным или моральным соображениям. Таким образом, по физиологическим и этическим причинам этот метод неприменим среди значительной части пациенток.

Снять многие из перечисленных ограничений, а главное, избежать нежелательной овариальной стимуляции, позволяют два других метода ВРТ — криоконсервация дозревших *in vitro* ооцитов и овариальной ткани. Вначале также изучалась возможность криоконсервации незрелых ооцитов (стадия метафазы I мейоза) сразу после их получения из аспирированных в естественном цикле антральных фолликулов. Они, казалось, должны лучше сохраняться при заморозке, чем зрелые клетки, поскольку их хроматин находится в диффузном состоянии, что позволяло бы при криоконсервации избежать деполимеризации клеточного веретена и теоретически исключить риск возникновения анеу- и полиплоидии.

На практике выяснилось, что после оттаивания незрелые ооциты плохо дозревают и оказываются функционально непригодными для последующих процессов оплодотворения и эмбрионального развития [2]. Поэтому была разработана методика их созревания вне организма — *in vitro maturation* (IVM), при которой незрелые ооциты культивируют до перехода в зрелое состояние (стадию метафазы II мейоза), а затем замораживают. Наряду с медленным способом криоконсервации сейчас применяют более сохраненный метод сверхбыстрой заморозки — витрификацию. Исследования на животных показали, что витрифицированные IVM-ооциты после разморозки сохраняли нормальное мейотическое веретено с правильно расположенными хромосомами и содержали эуплоидное число хромосом [3]. С конца прошлого века технология IVM успешно применяется при синдроме поликистозных яични-

ков. Несмотря на то, что основные процедуры метода неплохо отработаны, и в ряде стран из статуса экспериментального IVM переведен в обычные методы ЭКО, в разных лабораториях продолжают пользоваться своими протоколами. И пока эффективность витрификации IVM-ооцитов, частота имплантации эмбрионов и наступления беременностей после IVM ниже, чем у нативных ооцитов.

Актуален метод IVM и для сохранения фертильности пациенток с онкопатологией. Он позволяет получить не поврежденные предстоящей химиолучевой терапией гаметы, не откладывая противоопухолевое лечение, исключить гормональную стимуляцию и риск переноса злокачественных клеток. Вместе с тем применение метода IVM имеет естественное ограничение, так как в нестимулированных яичниках содержание вторичных и антральных фолликулов составляет лишь около 7% от всей фолликулярной популяции, что определяет низкую эффективность метода [4].

Более 90% фолликулярного пула яичников представлено примордиальными и первичными фолликулами. При рождении их численность составляет более 200 тысяч, у молодых женщин — десятков тысяч, а у женщин старше 40 лет — в пределах нескольких тысяч. Максимально сохранить фолликулярный резерв пациенток, которым предстоит гонадотоксичная терапия, можно лишь путем криоконсервации их овариальной ткани; а для девочек это единственный способ сохранения гамет. Хотя метод еще относительно молод и пока экспериментальный, криоконсервацию ткани яичника уже проводят во многих странах мира, считая этот способ сохранения женских гамет наиболее приемлемым для онкопациентов [5].

Замороженная ткань яичника может храниться в криобанке длительное время до наступления детородного возраста и ремиссии основного заболевания. В отличие от криоконсервации эмбрионов и ооцитов, эта процедура не требует стимуляции овуляции, вынужденной отсрочки в противоопухолевой терапии и наличия партнера, а кортикальный слой яичника — потенциально богатый источник получения женских гамет. Ооциты из примордиальных фолликулов в составе кортекса хорошо переносят заморозку, поскольку находятся в состоянии метаболического покоя и отличаются малым объемом цитоплазмы, низким содержанием холодочувствительных липидов, воды и отсутствием зоны пеллюцида. Однако сложноорганизованные вторичные и антральные фолликулы не выдерживают этой процедуры. Чтобы их сохранить, из антральных

фолликулов свежей ткани сначала выделяют незрелые ооциты и проводят их IVМ-дозревание, а затем замораживают по отдельности IVМ-ооциты и оставшуюся овариальную ткань [6].

Для оплодотворения примордиальным фолликулом после разморозки ткани необходимо пройти дозревание. Оно возможно как в организме, так и *in vitro*. В организме наилучшее дозревание фолликулов дает ортотопическая аутотрансплантация, при которой овариальную ткань имплантируют пациентке обратно в яичник для возобновления ее репродуктивной и эндокринной функций, обходясь таким образом без гормонозаместительной терапии и избегая иммуносупрессию. Интерес к методу значительно возрос после успешных исследований на животных. Gosden et al. впервые опубликовали данные о естественном зачатии и родах у овцы после имплантации в яичник ее криоконсервированной овариальной ткани [7].

Первые пересадки овариальной ткани у женщин показали, что размороженные фрагменты, имплантированные в атрофированный яичник, восстанавливали свою функцию: в них наблюдался рост фолликулов при достижении нормального уровня эстрадиола в крови [8]. Позднее реимплантация ткани яичника привела к естественной беременности и рождению детей у женщин после лечения онкозаболеваний, в числе которых лимфомы Ходжкина, неходжкинские лимфомы и саркомы Юинга [9]. Появились сообщения об успешных попытках гетеротопной аутотрансплантации у людей — переноса овариальной ткани для дозревания фолликулов в другой, обычно хорошо васкуляризированный орган.

Главная опасность аутотрансплантации для онкобольных — потенциальный риск переноса опухолевых клеток с тканью обратно в яичник. В экспериментах на мышах показано, что метастазы в составе замороженных овариальных фрагментов при трансплантации от больного лимфомой животного вызывали заболевание у здорового реципиента [10]. Поэтому аутотрансплантация противопоказана пациенткам, заболевания которых имеют высокий риск метастазирования в яичники. Но даже в случаях, где такой риск считается минимальным, злокачественные клетки могут попасть в яичники с током крови.

Сегодня для идентификации скрытых метастазов, которые не выявляются с помощью традиционной диагностики, в практику внедряются такие чувствительные методы молекулярной биологии как ПЦР в реальном времени, вестерн блот анализ,

иммуноцитохимия и т.п. Поиски надежного метода, способного определять в ткани единичные злокачественные клетки, успехом пока не увенчались. Silasi et al., используя методы лазерной микродиссекции, иммуноцитохимии и вестерн блот анализа, определили, что опухолеассоциированные белки выявляются в популяции численностью не менее 1000 клеток [11]. Это означает, что полная безопасность ортотопической аутотрансплантации для онкобольных пока не гарантирована.

Избежать передачи с тканью яичника опухолевых клеток позволяют разрабатываемые методы ксенотрансплантации и созревания изолированных примордиальных фолликулов *in vitro*. Их применение в перспективе открывает новые пути восстановления фертильности онкобольных, однако такая возможность еще изучается в научных лабораториях. При ксенотрансплантации овариальную ткань человека переносят в яичник иммунодефицитного животного. Этот дорогостоящий, но эффективный метод позволяет одновременно выявлять в ткани наличие опухолевых клеток и восстанавливать ее эндокринную функцию и фолликулогенез. В будущем ксенотрансплантация может быть рекомендована для повышения безопасности и эффективности последующей аутотрансплантации. Вместе с тем до конца не изучено влияние чужеродного организма на ооциты человека. Есть сообщения о том, что в процессе созревания структурная организация хроматина и микротрубочек ооцита нарушается [12].

Технология выделения из овариальной ткани примордиальных фолликулов и их последующее созревание в условиях *in vitro* до стадии зрелых, пригодных к оплодотворению ооцитов, представляются идеальным способом восстановления репродуктивной функции онкобольных. Метод полностью исключает опасность переноса неопластических клеток, а еще привлекателен тем, что теоретически позволит получать большее количество зрелых ооцитов, чем при аутотрансплантации ткани, после которой из-за ишемии до 2/3 фолликулов гибнет. Техника длительного культивирования фолликулов вне организма (*in vitro follicular maturation* — IVFM) пока находится на начальной стадии своего развития. Основное требование к методу — обеспечение на всех его этапах максимальной морфофункциональной и генетической сохранности ооцитов.

Весь процесс IVFM полностью реализуется в условиях *in vitro* и включает процедуры криоконсервации, оттаивания и культивирования овариальной ткани, выделения примордиальных фолликулов

и их созревания *in vitro*. Учитывая, что каждая из процедур требует «контроля качества» ооцитов, осуществить который можно лишь с помощью высокотехнологичных методов, становится понятно, насколько это методически сложная задача. Для ее успешного решения необходимы дальнейшие исследования процессов оо- и фолликулогенеза, регуляторные механизмы которых остаются слабо изученными. Новая информация необходима и для оптимизации основных манипуляций, которые при своей эффективности должны быть достаточно простыми при рутинном использовании метода.

К настоящему времени развитие фолликулов в условиях *in vitro* лучше всего изучено на мышинных моделях. Авторы работы [13], исследуя взаимодействие половых и соматических клеток в процессе роста и созревания примордиальных фолликулов *in vitro*, получили подтверждение о том, что критически важное условие полноценного развития ооцита — сохранность его межклеточных коммуникаций. Контакты так называемого щелевого типа формируются в процессе фолликулогенеза, на этапе образования первичного фолликула. Прозрачную зону ооцита пронизывают каналы, в которых отростки фолликулярных клеток проходят к микроворсинкам мембраны ооцита и обеспечивают полноценную трофику половой клетки.

Остановимся на экспериментальных разработках основных процедур IVFM.

При том, что технология **криоконсервации** овариальной ткани считается отработанной и в организме после аутотрансплантации в размороженной ткани наблюдается рост фолликулов и формирование способных к овуляции яйцеклеток, в условиях *in vitro* добиться такого успеха до сих пор не удается. Сбои в развитии ооцита должны происходить на этапе культивирования, уже после разморозки ткани. Вместе с тем сейчас известно, что повреждения в примордиальных фолликулах возникают и при криоконсервации: только в «физиологических» условиях они, по-видимому, не критичны для созревания ооцита, а в искусственной системе *in vitro* препятствуют его нормальному развитию.

Процедура заморозки тканевых фрагментов гораздо сложнее, чем одиночных клеток. Гетерогенные по биологическим свойствам клеточные компоненты ткани обладают различной проницаемостью к криопротекторам и чувствительностью к негативным факторам криоконсервации. Несмотря на методические приемы по обеспечению лучшей сохранности ткани, оказалось, что при криоконсервации нарушается проницаемость контактов

ооцита с фолликулярными клетками, хотя примордиальные фолликулы при этом и сохраняют видимую нормальную морфологию.

Исследования показали, что любое прерывание межклеточных коммуникаций в структуре фолликула в случае его дозревания *in vitro* приводит к специфическим молекулярным повреждениям в половых клетках: в хроматине ооцита перед мейозом возникают конформационные дефекты, которые или непосредственно, или через экспрессию соответствующих генов приводят к нарушению регуляции процессов созревания ооцита и падению его мейотического потенциала [14]. Это подтвердили наблюдения за первичными фолликулами овцы: хотя после выделения из размороженной ткани ооциты в культуре *in vitro* хорошо росли, функционально они оказались неспособными к мейотическому делению [15].

Таким образом, процедура криоконсервации овариальной ткани как составная часть метода IVFM нуждается в дальнейшем совершенствовании. При **оттаивании** угрозу сохранности ооцита представляет процесс рекристаллизации. В исследованиях по поиску средств, предотвращающих формирование кристаллов льда, положительное влияние на сохранность ооцитов оказывало применение электромагнитного отогрева ткани, а также введение в криозащитную смесь некоторых антифризов белковой природы или синтетических блокаторов льдообразования.

Данные, полученные в экспериментальных исследованиях, служат теоретической базой для оптимизации методов дальнейшей работы с размороженным материалом и указывают, что необходимым условием для получения сохраненных ооцитов при проведении любых *in vivo/in vitro* манипуляций является поддержание и координация взаимодействия ооцита с окружающими клетками. Кроме того, они дают основание проводить оценку качества ооцита, ориентируясь на состояние его контактов с фолликулярными клетками. Поэтому целостность межклеточных контактов можно использовать как биологический критерий эффективности проводимых процедур или воздействия каких-либо веществ. Степень сохранности контактов позволяет регистрировать методика, основанная на определении плотности актиновых филаментов, участвующих в транзональных процессах взаимодействия ооцита с гранулезными клетками [16].

Потенциал развития примордиальных фолликулов *in vitro* во многом определяется «аккуратностью» их **выделения из овариальной ткани**, которое

может быть механическим или ферментативным. Рост примордиальных фолликулов возможен и в составе культивируемых органных эксплантов до стадии образования комплексов ооцит-гранулеза, которые затем изолируют и переводят *in vitro*. В последнее время для получения примордиальных фолликулов вместо традиционной коллагеназы предложено применять более щадящую обработку ткани высокоочищенной ферментной смесью — либеразой. Выделенные с ее помощью фолликулы человека отличались морфологической и ультраструктурной сохранностью и показывали высокую жизнеспособность и хороший рост при ксенографтинге [17].

Сегодня основное внимание экспериментаторов направлено на разработку методов *культуральной работы с изолированными фолликулами*, цель которых — получение качественных ооцитов, пригодных к использованию в технологиях ВРТ. В исследовании [18] на культуре первичных фолликулов мыши был подобран состав среды, который стимулировал переход покоящегося фолликула к росту. Отмечено, что процедура криоконсервации не влияла на экспрессию фактора дифференцировки GDF-9 и анти-Мюллеровского гормона: их уровень не различался в культуре фолликулов из оттаявшей и свежей ткани. В работе [19] впервые удалось довести в культуре рост и созревание примордиальных фолликулов мыши до стадии зрелых ооцитов, которые далее прошли оплодотворение *in vitro*. Эмбрионы были перенесены в матку мыши и в результате получен потомок. Однако из-за врожденных аномалий он преждевременно погиб, а остальные 9 из 10 имплантированных эмбрионов так и не развились. Эти негативные последствия вызывают естественное беспокойство относительно генетической безопасности метода IVFM, заставляя биологов более критично взглянуть на каждый из его этапов, но сам факт получения потомства демонстрирует принципиальную возможность реализовать эту идею.

Важнейшую роль в сохранении биологической полноценности ооцита играет *выбор системы in vitro*. В идеале она должна соответствовать «физиологическим» условиям, среди которых ключевые — пространственное окружение и обеспеченность питательными веществами. В трехмерном пространстве яичника растущий фолликул имеет форму сферы и состоит из слоев специализированных клеток, которые посредством паракриной сигнализации (от клетки к клетке) обеспечивают его созревание. В процессе традиционного культивирования на двумерном субстрате велика вероятность повреж-

дения «архитектуры» фолликула и, как следствие, изменения взаимной ориентации составляющих его клеток; в этом случае их паракринные сигналы могут пройти мимо и не достигнуть клеток-мишеней. Поэтому сейчас создают системы *in vitro* для роста фолликулов в трехмерном пространстве. Применение такой технологии уже позволило получить из мышинных фолликулов, созревающих в 3D-культуре, жизнеспособного фертильного потомка [20].

Тканеподобные субстраты, в которые инкапсулируют изолированные примордиальные фолликулы или комплексы ооцит-гранулеза, механически поддерживают их «естественную» морфологию на протяжении всего культивирования. Это дает возможность получить наиболее объективные данные о факторах, регулирующих рост и созревание ооцита. В трехмерном субстрате также удобно изучать процесс взаимодействия внешних слоев фолликулярных клеток с внеклеточным матриксом. Такое углубленное исследование физиологии фолликулов поможет исследователям подбирать состав среды адекватно стадии их развития [21].

Особенно актуальным представляется использование 3D-системы для культивирования примордиальных фолликулов человека, которым для созревания требуется не менее четырех месяцев. Хотя в общебиологическом аспекте фолликулы млекопитающих всех видов и на всех стадиях развития похожи между собой, процесс их созревания у каждого вида индивидуален. Например, у грызунов развитие примордиального фолликула до стадии графова пузырька занимает всего несколько недель, а у крупных животных — месяцы. Поэтому те оптимальные условия *in vitro*, что были созданы для успешного получения зрелых ооцитов мыши, не могут быть полностью экстраполированы на фолликулы других млекопитающих.

Технология культивирования примордиальных фолликулов человека пока далека от успеха. В культуре их плохо удается стимулировать к дальнейшему поступательному развитию для получения на финальных этапах зрелых, здоровых и пригодных к оплодотворению ооцитов. У человека переход от стадии примордиального фолликула к первичному занимает около 120 дней и сопровождается известными морфологическими изменениями. Удивительно, что *in vitro* эти изменения наблюдали уже через несколько суток — в разы быстрее, чем в организме [22]. У домашних животных завершающих этапов дозревания удалось добиться лишь в культуре больших преантральных фолликулов,

содержащих практически выросшие ооциты, однако их способность к мейотическому делению оставалась низкой [23].

Приведенные результаты указывают на необходимость совершенствовать техники *in vitro*. Очевидно, культуральная система или питательная среда в этих работах не соответствовали физиологическим потребностям фолликулов. Для стимуляции примордиальных фолликулов к росту культуральная среда, кроме основных питательных веществ, должна содержать множество дополнительных видоспецифичных факторов. Так, добавленные в среду ФСГ инсулин и GDF-9 стимулировали рост и повышали выживаемость фолликулов человека. Однако следует признать, что подобные исследования пока имеют скорее эмпирический характер, так как многие факторы, регулирующие рост, гибель и пополнение фолликулов, еще полностью не изучены. Поэтому сегодня любая система *in vitro* всегда будет лишь приближением к оптимальной модели.

Особенно важно разгадать регуляцию перехода в развитии фолликула от стадии примордиального к первичному. Для этого необходимо изучить неизвестные на сегодня механизмы, координирующие рост ооцита и деление окружающих его фолликулярных клеток. Полученная информация поможет открыть доступ к почти неограниченному источнику получения ооцитов для биомедицинских целей [24].

Кроме того, еще предстоит выяснить влияние длительного культивирования и отдельных компонентов среды на созревание ядра и цитоплазмы ооцита, от качества которых зависят дальнейшие процессы оплодотворения и развития эмбриона.

Получение полноценных ооцитов человека *in vitro* станет реальным, когда для каждого этапа развития фолликулов будет подобран свой оптимальный состав среды [20]. Научный подход к решению этой проблемы требует фундаментальных исследований в области генетики и биохимии фолликулогенеза.

Определить стадию роста ооцита и картировать ее основные биохимические детерминанты позволяют новейшие методы микрочипирования, метаболомики и протеомики. Поэтому только при сотрудничестве специалистов по клеточным культурам с молекулярными биологами можно ожидать прогресса в технологии IVFM. И хотя возможность получать полноценные ооциты из примордиальных фолликулов в искусственной системе *in vitro* сейчас кажется фантастической, в будущем эта идея благодаря активным исследованиям и применению высоких технологий вполне может реализоваться.

Современные технологии дают возможность получить обширную молекулярную информацию об исследуемом материале. Так, метод микрочипирования позволяет получить полный профиль экспрессии генов в клетках и тканях, а масс-спектрометрический метод MALDITOF-MS (активированная матрицей лазерная десорбция/ионизация) — проанализировать их белковый состав. Практические запросы вспомогательной репродукции для онкобольных требуют дальнейшего совершенствования *in vitro*-технологий с привлечением таких высокоинформативных методов. Их более широкое применение в будущих исследованиях позволит преодолеть многие нерешенные проблемы, что дает надежду женщинам на будущее материнство осуществимой.

ЛИТЕРАТУРА

1. Meiorow D., Nugent D. The effect of radiotherapy and chemotherapy on female reproduction. Hum Reprod Update 2001; 7(6): 535–43.
2. Son W.Y., Park S.E., Lee K.A. et al. Effects of 1,2-propanediol and freezing on the *in vitro* developmental capacity of human immature oocytes. Fertil Steril 1996; 66: 996–99.
3. Huang J.Y., Chen H.Y., Wang Y. et al. Meiotic spindle and chromosome alignment of *in-vitro* matured oocytes following vitrification [abst.]. Fertil Steril 2006; 86 (Suppl. 1): S66.
4. Lass A., Silye R., Abrams D.C. et al. Follicular density in ovarian biopsy of infertile women : a new method to assess ovarian reserve. Hum Reprod 1997; 12: 1028–31.
5. von Wolff M., Donnez J., Hovatta O. et al. Cryopreservation and autotransplantation of human ovarian tissue prior to cytotoxic therapy — A technique in its infancy but already successful in fertility preservation. Eur J Cancer 2009; doi:10.1016/j.ejca.2009.01.029.
6. Huang J.Y.J., Tulandi T., Holzer H. et al. Combining ovarian tissue cryobanking with retrieval of immature oocytes followed by *in vitro* maturation and vitrification: an additional strategy of fertility preservation. Fertil Steril 2008; 89(3): 567–72.
7. Gosden R., Baird D., Wade J., Webb R. Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at -196°C. Hum Reprod 1994; 9: 597–603.

8. Radford J.A., Lieberman B.A., Brison D.R. et al. Orthotopic reimplantation of cryopreserved ovarian cortical strips after high-dose chemotherapy for Hodgkin's lymphoma. *Lancet* 2001; 357: 1172–5.
9. Anderson C.Y., Rosendahl M., Byskov A.G. et al. Two successful pregnancies following autotransplantation of frozen/thawed ovarian tissue. *Hum Reprod* 2008; 23: 2266–72.
10. Shaw J.M., Bowies J., Koopman P. et al. Fresh and cryopreserved ovarian tissue samples from donors with lymphoma transmit the cancer to graft recruitments. *Hum Reprod* 1996; 11: 1668–73.
11. Silasi D.A., Alvero A.B., Mor J. et al. Detection of cancer-related proteins in fresh-frozen ovarian cancer samples using laser capture microdissection. *Methods Mol Biol* 2008; 414: 35–45.
12. Kim S.S., Battaglia D.E., Soules M.R. The future of human ovarian cryopreservation and transplantation: fertility and beyond *Fertil Steril*. 2001; 75: 1049–56.
13. Spears N., Boland N.I., Murray A.A., Gosden R.G. Mouse oocytes derived from in vitro grown primary ovarian follicles are fertile. *Hum Reprod* 1994; 9: 527–32.
14. Albertini D.F., Sanfins A., Combelles C.M. Origins and manifestations of oocyte maturation competencies. *Reprod Biomed Online* 2003; 6: 410–5.
15. Cecconi S., Capacchietti G., Russo V. et al. In vitro growth of preantral follicles isolated from cryopreserved ovine ovarian tissue. *Biol Reprod* 2004; 70: 12–7.
16. 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; 20: 1607–14.
17. Dolmans M.M., Martinez-Madrid B., Gadisseux Eguiot Y. et al. Short-term transplantation of isolated human ovarian follicles and cortical tissue into nude mice. *Reproduction* 2007; 134: 253–62.
18. Sadeu J.C., Adriaenssens T., Smits J. Expression of growth differential factor 9, bone morphogenetic protein 15, and anti-Mullerian hormone in cultured mouse primary follicles. *Reproduction* 2008; 136: 195–203.
19. O'Brien M.J., Pendola J.K., Eppig J.J. A revised protocol for in vitro development of mouse oocytes from primordial follicles dramatically improves their developmental competence. *Biol Reprod* 2003; 68: 1682–86.
20. Xu M., Kreeger P.K., Shea L.D., Woodruff T.K. Tissue-engineered follicles produce life, fertile offspring. *Tissue Eng* 2006; 12: 2739–46.
21. Kreeger P.K., Fernandes N.N., Woodruff T.K., Shea L.D. Regulation of mouse follicle development by follicle-stimulating hormone in a three-dimensional in vitro culture system is dependent on follicle stage and dose. *Biol Reprod* 2005; 73: 942–50.
22. Fortune J.E., Cushman R.A., Wahl C.M., Kito S. The primordial to primary follicle transition. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 163: 53–60.
23. Wu J., Emery B.R., Carrell D.T. In vitro growth, maturation, fertilization and embryonic development of oocytes from porcine preantral follicles. *Biol Reprod* 2001; 64: 375–81.
24. Varghese A.C., du Plessis S.S., Falcone T., Agarwal A. Cryopreservation/transplantation of ovarian tissue and in vitro maturation of follicles and oocytes: Challenges for fertility preservation. *Reprod Biol Endocrinol* 2008; 6: 47–56.
25. Abir R., Nitke S., Ben-Haroush A., Fish B. In vitro maturation of human primordial follicles: clinical significance, progress in mammals, and methods for growth evaluation. *Histol Histopathol* 2006; 21: 887–98.