

© Коллектив авторов, 2022

Е.С. БУНЯЕВА¹, А.О. КИРИЛЛОВА², Т.А. НАЗАРЕНКО¹, Л.Г. ДЖАНАШВИЛИ¹,
К.К. ГАДЖИМАГОМЕДОВА¹, Г.Н. ХАБАС¹, А.М. БИРЮКОВА¹, А.А. ГАВИСОВА¹

ПОКАЗАНИЯ И ЭФФЕКТИВНОСТЬ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ НЕЗРЕЛЫХ ООЦИТ-КУМУЛЮСНЫХ КОМПЛЕКСОВ ИЗ ТКАНИ ЯИЧНИКА С ПОСЛЕДУЮЩИМ ИХ ДОЗРЕВАНИЕМ *IN VITRO*

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии

имени академика В.И. Кулакова» Минздрава России, Москва, Россия

²Сколковский институт науки и технологий (Сколтех), Москва, Россия

Цель: Разработать тактику сохранения генетического материала у пациенток со злокачественными новообразованиями яичников с помощью выделения из ткани яичника незрелых ооцитов, их дозревания *in vitro* (Ovarian Tissue Oocyte In Vitro Maturation, OTO IVM) и криоконсервации. Определить показания и ограничения метода OTO IVM.

Материалы и методы: Перед оперативным лечением, по направлению онкогинекологов, были проконсультированы 72 пациентки с диагнозом рака яичников или пограничных опухолей яичников. При обращении оценивали клинико-anamnestические характеристики пациенток, репродуктивную функцию и овариальный резерв, характеристики онкологического процесса, определяли факторы риска, способные оказать влияние на исход программы OTO IVM. У каждой пациентки проводили забор одного или двух яичников с последующей идентификацией ооцит-кумулясных комплексов (ОКК) и дозреванием *in vitro*. В зависимости от желания пациентки полученные ооциты подвергали криоконсервации или оплодотворяли биологическим материалом супруга/полового партнера.

Результаты: В ходе данного исследования пациентки были разделены на 2 группы в зависимости от исхода программы OTO IVM. 1-ю группу составили 17 пациенток, у которых программу расценили как успешную, было консервировано не менее 5 зрелых ооцитов и/или 1 и более эмбрионов, 2-ю группу — 55 пациенток с безуспешным исходом. Были определены основные факторы, влияющие на исход программы OTO IVM.

Заключение: Проведенное исследование позволило определить критерии отбора пациенток для использования метода OTO IVM. Показано, что программа OTO IVM может обеспечивать получение достаточного количества ОКК у больных молодого возраста, имеющих хорошие показатели овариального резерва, не подвергающихся предварительной резекции яичников, при направлении в лабораторию эмбриологии достаточного объема ткани яичника без опухолевого поражения. Следует отметить, что метод продолжает оставаться экспериментальным, при достаточном успехе извлечения ОКК и доразививании незрелых ооцитов *in vitro* качественные бластоцисты образуются с гораздо меньшей частотой, чем в общей практике ВРТ, что может ограничивать конечный результат лечения, достижение беременности у этого контингента больных.

Ключевые слова: онкофертильность, *in vitro* дозревание, *in vitro* maturation, IVM, ovarian tissue IVM, OTO IVM, сохранение фертильности, рак яичника, овариэктомия, пограничные опухоли яичников.

Вклад авторов: Буняева Е.С., Кириллова А.О., Назаренко Т.А., Джанашвили Л.Г., Гаджимагомедова К.К., Хабас Г.Н., Бирюкова А.М., Гависова А.А. — разработка дизайна исследования, получение данных для анализа, обзор публикаций по теме статьи, анализ полученных данных, написание текста рукописи.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Одобрение Этического комитета: Исследование одобрено Этическим комитетом НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова Минздрава РФ (протокол № 11 от 13.12.2018 г.).

Согласие пациентов на публикацию: Пациенты подписали информированное согласие на публикацию своих данных и изображений.

Обмен исследовательскими данными: Данные, подтверждающие выводы этого исследования, доступны по запросу автора, ответственного за переписку, после одобрения ведущим исследователем.

Для цитирования: Буняева Е.С., Кириллова А.О., Назаренко Т.А., Джанашвили Л.Г., Гаджимагомедова К.К., Хабас Г.Н., Бирюкова А.М., Гависова А.А. Показания и эффективность технологии получения незрелых ооцит-кумулясных комплексов из ткани яичника с последующим их дозреванием *in vitro*.

Акушерство и гинекология. 2022; 6: 75–82
<https://dx.doi.org/10.18565/aig.2022.6.75-82>

©A group of authors, 2022

E.S. BUNYAEVA¹, A.O. KIRILLOVA², T.A. NAZARENKO¹, L.G. DZHANASHVILI¹,
K.K. GADZHIMAGOMEDOVA¹, G.N. KHABAS¹, A.M. BIRYUKOVA¹, A.A. GAVISOVA¹**INDICATIONS AND EFFECTIVENESS OF TECHNIQUE FOR IMMATURE OOCYTE-CUMULUS COMPLEXES RETRIEVAL FROM OVARIAN TISSUE FOLLOWED BY THEIR *IN VITRO* MATURATION**¹Academician V.I. Kulakov National Medical Research Centre for Obstetrics, Gynecology and Perinatology,
Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia²Skoltech, Moscow, Russia**Objective:** To develop tactics for preserving genetic material in patients with malignant ovarian neoplasms using the technique for immature oocyte retrieval from ovarian tissue, ovarian tissue oocyte *in vitro* maturation (OTO IVM) and cryopreservation; to identify the indications and limitations of OTO IVM.**Materials and methods:** Seventy-two patients diagnosed with ovarian cancer or borderline ovarian tumors were examined prior to surgical treatment. The patients were evaluated for clinical and anamnestic characteristics, reproductive function and ovarian reserve, and characteristics of the oncological process; risk factors that could influence OTO IVM outcome were determined as well. Each patient underwent retrieval of oocyte-cumulus complexes (OCC) from one or two ovaries, followed by their identification and *in vitro* maturation. Depending on the patient's desire, the obtained oocytes were cryopreserved or fertilized with biological material of the partner.**Results:** The patients were divided into two groups depending on the outcome of the OTO IVM program. Group 1 consisted of 17 patients who had a successful outcome of the program, namely, at least five mature oocytes and/or one or more embryos were preserved. Group 2 included 55 patients with an unsuccessful outcome. The main factors that could influence OTO IVM outcome were identified.**Conclusion:** It was possible to determine the criteria for the selection of patients for using the OTO IVM technique. The results of the study showed that the use of OTO IVM can provide a sufficient number of OCC in young patients in case of good indicators of ovarian reserve, no preliminary resection of the ovaries, and if sufficient amount of ovarian tissue not affected by tumor was sent to the laboratory of embryology. This technique continues to be experimental: in spite of successful retrieval of OCC and oocyte *in vitro* maturation, high-quality blastocysts are cultivated less frequently than in assisted reproductive technologies and this may affect negatively the result of the treatment, namely, establishing pregnancy in this cohort of patients.**Keywords:** oncofertility, *in vitro* maturation, IVM, ovarian tissue IVM, OTO IVM, fertility preservation, ovarian cancer, ovariectomy, borderline ovarian tumors.**Authors' contributions:** Bunyaeva E.S., Kirillova A.O., Nazarenko T.A., Dzhanchashvili L.G., Gadzhimagomedova K.K., Khabas G.N., Biryukova A.M., Gavisova A.A. — developing research design, obtaining data for analysis, review of publications on the topic of the article, analysis of the obtained findings, writing the text of the manuscript.**Conflicts of interest:** The authors declare that they have no competing interests.**Funding:** The study was performed without external funding.**Ethical Approval:** The study was approved by the Ethical Review Board of Academician V.I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russia (Ref. No. 11 dated 13.12.2018).**Patient Consent for Publication:** All patients provided informed consent for the publication of their data and associated images.**Authors' Data Sharing Statement:** The data supporting the findings of this study are available on request from the corresponding author after approval from the principal investigator.

For citation: Bunyaeva E.S., Kirillova A.O., Nazarenko T.A., Dzhanchashvili L.G., Gadzhimagomedova K.K., Khabas G.N., Biryukova A.M., Gavisova A.A. Indications and effectiveness of technique for immature oocyte-cumulus complexes retrieval from ovarian tissue followed by their *in vitro* maturation. *Akusherstvo i Ginekologiya/Obstetrics and Gynecology*. 2022; 6: 75-82 (in Russian) <https://dx.doi.org/10.18565/aig.2022.6.75-82>

За последние несколько лет наблюдается растущий интерес к методам сохранения фертильности онкологических больных, что связано с улучшением показателей выживаемости при раке, повышением внимания к качеству жизни онкологических больных в ремиссии, постоянным прогрессом в области вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), а также большей осведомленностью врачей и больных о возможностях сохранения репродуктивного материала [1].

Из 100 000 случаев гинекологических злокачественных новообразований, диагностируемых каждый

год, 15–20% обнаруживается у женщин до 40 лет [2]. Раннее выявление и улучшение протоколов лечения значительно увеличило выживаемость. Так, 5-летняя выживаемость при онкозаболеваниях всех типов и локализаций у женщин в репродуктивном и пубертатном периодах достигает 75% [3]. Вместе с тем откладывание деторождения на поздний репродуктивный возраст, что характерно для современного общества, привело к тому, что у значительной части женщин рак диагностируется раньше, чем рождается первый ребенок, и эта тенденция, к сожалению, усугубляется.

В этой связи сохранение репродуктивного материала молодых женщин для отсроченного материнства является актуальной и крайне сложной проблемой современной медицины.

Сегодня в мире используют и апробируют ряд методик, призванных сохранить репродуктивный материал и защитить репродуктивную функцию пациентов от негативного влияния гонадотоксичной терапии [4]. Некоторые из них все еще носят экспериментальный характер, другие, несомненно, клинически эффективны [5].

Используемые методы можно представить в виде:

- предварительная криоконсервация ооцитов/эмбрионов (клинический метод с доказанной эффективностью);
- предварительная криоконсервация сперматозоидов (клинический метод с доказанной эффективностью);
- криоконсервация ткани яичников/яичек с последующей аутотрансплантацией (метод недостаточно разработан);
- получение незрелых ооцитов при трансвагинальной пункции в нестимулированном цикле, дозревание *in vitro*, криоконсервация ооцитов/эмбрионов (не продемонстрировал достаточную клиническую эффективность);
- получение незрелых ооцитов из ткани удаленного яичника или его части, дозревание *in vitro*, криоконсервация ооцитов/эмбрионов (экспериментальный метод);
- медикаментозная защита яичников назначением аГнРГ (клинический метод, эффективность недостаточно ясна);
- транспозиция яичников при хирургическом вмешательстве (клинический метод, неясна эффективность в плане реализации репродуктивной функции);
- комбинация методов (используется индивидуально).

Указанная градация в значительной степени является условной, т.к. в каждом индивидуальном случае в рамках междисциплинарного консилиума решается вопрос о возможности и способах сохранения репродуктивного материала у конкретной пациентки. Тем не менее вектор принятия решения базируется на первостепенном использовании клинических методов, если это возможно, и поиске альтернативных, часто экспериментальных, при невозможности применения клинических методик.

Рядом публикаций определены основные показания проведения стимуляции яичников для забора и криоконсервации ооцитов/эмбрионов перед гонадотоксичным лечением [6]. Это молодые женщины с любой локализацией рака I стадии, кроме рака и рецидивирующих пограничных опухолей яичников. Условиями являются заключение онколога о возможности проведения стимуляции яичников, сохраненные показатели овариального резерва, добровольное информированное согласие пациентки. Методика: индивидуальные модифицированные программы, сочетание эффективности (достаточное число ооцитов/эмбрионов), снижение уровня половых стероидов в процессе стимуляции,

длительность лечения не более 14–16 дней [7–9]. Таким образом, злокачественные новообразования яичников являются противопоказанием к стимуляции и пункции яичников, так же как и для криоконсервации ткани яичников, что обосновало необходимость разработки новой методики ОТО IVM (Ovarian Tissue Oocyte In Vitro Maturation) – выделение ооцит-кумулясных комплексов (ОКК) из ткани яичника после овариэктомии с последующим их дозреванием *in vitro*. Технология ОТО IVM подразумевает выделение и работу с ОКК экстракорпорально, она не несет дополнительных рисков для пациенток в плане переноса атипических клеток, что не исключено при аутотрансплантации ткани яичника [10, 11]. Методика является экспериментальной и выполняется в тех случаях, когда отсутствует возможность использовать другие методы, в основном при раке яичников, который, согласно данным Национального института здоровья США, диагностируется в 12% случаев у женщин репродуктивного возраста [12]. Публикаций, оценивающих эффективность метода по получению и криоконсервации ооцитов/эмбрионов в результате ОТО IVM, немного [10, 11]. Закономерно единичными являются сообщения о рождении детей после использования методики ОТО IVM [13].

Имея определенный опыт применения методики ОТО IVM, мы хотели бы определить показания, ограничения, методику выполнения и эффективность указанного метода, что явилось целью настоящей работы.

Материалы и методы

Данное исследование одобрено этическим комитетом «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава РФ (протокол № 11 от 13.12.2018 г.). Все пациентки подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании и обработку персональных данных. Метод ОТО IVM применен у 72 пациенток, которым проведено хирургическое лечение по поводу: рака яичников – у 60/72 (83,3%) больных, пограничных опухолей яичника – у 12/72 (16,7%) пациенток. В лабораторию эмбриологии было доставлено 89 удаленных яичников и 3 биоптата яичников.

Яичники доставляли из операционной в стерильных контейнерах, ОКК выделяли из ткани яичника путем аспирации при помощи 21G иглы, подсоединенной к 10 мл шприцу, или путем измельчения овариальной ткани при помощи скальпелей.

Полученные ОКК дозревали в условиях *in vitro* в течение 30–48 ч в среде для дозревания ооцитов. В стандартном протоколе IVM дозревание незрелых ОКК проводили в среде IVM (Origio, Дания) с добавлением человеческого альбумина (Албурекс, Германия), гормонов ФСГ и ЛГ в течение 48 ч. Проводили идентификацию зрелости и качества полученных ооцитов, зрелые ооциты криоконсервировали по общепринятой методике методом витрификации. В случае желания пациентов оплодотворить полученные ооциты проводили оплодотворение методом ИКСИ, оценивали оплодотворение

по наличию двух пронуклеусов, культивировали эмбрионы до стадии бластоцисты в одношаговой среде GTL (Vitrolife), покрытой маслом Ovoil (Vitrolife), в инкубаторе при 37°C, 6% CO₂ и 5% O₂ до 5-х суток развития. Оценивали наличие и качество полученных бластоцист по критериям Гарднера, витрифицировали бластоцисты, пригодные для криоконсервации. Всего криоконсервировано 92/141 (65,2%) ооцита стадии МП у 26/72 (36,1) больных и 11 эмбрионов у 6/72 (8,3%) пациенток.

Работа эмбриолога складывалась из нескольких этапов, первым из которых являлась заблаговременная подготовка сред и расходных материалов до планируемой работы с яичником. Препарирование макропрепарата, поиск и извлечение из яичника ОКК занимают приблизительно 1,5 ч и требуют определенных навыков. Культивирование в среде дозревания в среднем занимает 35 ч, тогда как идентификация ооцитов, отбор зрелых и последующая их криоконсервация занимают не более 1 ч. Далее по желанию пациентки проводится оплодотворение зрелых ооцитов биологическим материалом мужа, партнера или донора методом ИКСИ и культивирование эмбрионов в течение 5 суток. Указанные сведения приведены для того, чтобы подчеркнуть трудоемкость работы высококвалифицированного эмбриолога.

Статистический анализ

Статистическую обработку данных проводили в программной среде R [14]. Для нахождения связи между двумя количественными переменными использовали коэффициент корреляции Спирмена (Rs). Для нахождения связи между двумя качест-

венными переменными использовали точный тест Фишера. Для количественных переменных проверяли нормальность распределения с помощью теста Колмогорова–Смирнова. В случае ненормального распределения для сравнения групп использовали непараметрические критерии Манна–Уитни (для сравнения двух групп) или Краскела–Уоллиса (для сравнения более двух групп). Для сравнения групп с нормально распределенными признаками использовали двухвыборочный *t*-критерий Стьюдента. В случае нормального распределения данные представлены как среднее (SD), в случае ненормального распределения указана медиана (Q1; Q3).

Результаты и обсуждение

Исходя из цели исследования, предполагающей определение показаний для проведения программы ОТО IVF, пациентки были разделены на 2 группы. 1-ю группу составили 17/72 (23,6%) женщин, у которых программу расценили как успешную, было консервировано не менее 5 зрелых ооцитов или 1 и более эмбриона хорошего качества, во 2-ю группу вошли 55/72 (76,4%) пациенток с безуспешной попыткой получения и криоконсервации ооцитов, когда яйцеклетки не были получены, не дозрели или же для криоконсервации были пригодны лишь 1–2 ооцита.

Подобное разделение обусловлено трудоемкостью метода, о чем было сказано выше, и целью предотвращения возможной дискредитации этого направления, когда неполучение необходимого материала чаще всего связано не с дефектами метода, а с неправильным подбором больных.

Таблица. Анамнестические и клиничко-лабораторные характеристики пациенток

	Успешная программа	Безуспешная программа	<i>p</i> -значение
Анамнестические данные			
Наследственная предрасположенность к онкологическим заболеваниям	5/17 (29,4%)	21/55 (38,2%)	0,787 (точный тест Фишера)
Беременности до оперативного лечения	2/17 (13,3%)	19/55 (34,5%)	0,224 (точный тест Фишера)
Резекции яичников в анамнезе	7/17 (41,2%)	23/55 (41,8%)	1,000 (точный тест Фишера)
Химиотерапия до овариэктомии	1/17 (5,9%)	10/55 (18,2%)	0,442 (точный тест Фишера)
Клинические данные			
Индекс массы тела	22,62 (4,15) N=16 min–max 18,00–34,00	23,11 (4,89) N=51 min–max 18,00–38,00	0,697 (<i>t</i> -критерий Стьюдента)
Уровень АМГ в сыворотке крови, нг/мл	3,06 (1,59) N=7 min–max 1,66–5,54	1,20 (1,50) N=20 min–max 0,04–6,50	0,022 (<i>t</i> -критерий Стьюдента)
Количество антральных фолликулов в день овариэктомии	9,50 (7,00; 13,25) N=16 min–max 1–17	1,00 (0,50; 4,50) N=55 min–max 0–20	<0,001* (критерий Манна–Уитни)
Уровень маркера крови СА-125, Ед/мл	58,39 (27,45; 93,37) N=10 min–max 10,70–581,60	41,85 (24,73; 117,22) N=36 min–max 5,00–700,00	0,842 (критерий Манна–Уитни)

Примечание. Для качественных признаков указаны абсолютные и относительные частоты. Для качественных признаков указаны среднее (SD) в случае нормального распределения и медиана (Q1; Q2) в случае ненормального распределения, а также разброс min–max. * отмечены значимые различия на уровне значимости $p=0,05/8$ (поправка Бонферрони на множественные сравнения). АМГ – антимюллеров гормон; СА-125 – углеводный антиген-125, онкомаркер рака яичника.

Из общей группы пациенток, вошедших в исследование, у 60/72 (83,3%) женщин диагностирован рак яичника, у 12/72 (16,7%) – пограничные опухоли яичников. Возраст пациенток колебался от 14 до 43 лет, составив в среднем 33 (6,25) года. В таблице представлено сравнение анамнестических и клинико-лабораторных характеристик пациенток с успешной и безуспешной программой ОТО IVM.

Из данных анамнеза выявлена наследственная предрасположенность к онкологическим заболеваниям у 26/72 (36,1%) опрошенных пациенток. Беременности до диагностики заболевания были у 21/72 (29,1%) женщины, и 13/72 (18%) из них родили ребенка. Корреляция между ИМТ и ОКК оказалась незначимой ($R_s=-0,160$; $p=0,196$).

У 31/72 (43%) пациентки проведена резекция яичников, при этом у 19/72 (26,4%) из них первоначальным диагнозом было наличие образования в яичнике, при гистологическом исследовании которого диагностирована злокачественная или пограничная опухоль, что потребовало повторной радикальной операции.

Средний возраст пациенток составил 33 (6,25) года, что соответствует активному репродуктивному периоду, но диапазон возраста варьировался от 14 до 43 лет. То же относится к уровням АМГ в сыворотке крови, который составил в среднем 1,68 (1,7) нг/мл со значениями от 0 до 6,5 нг/мл соответственно, среднее количество антральных фолликулов составило 4,52 (4,88) с диапазоном колебаний от 0 до 20.

Как следует из представленных данных, группа больных была весьма неоднородной по анамнестическим и клиническим характеристикам. Для оценки успеха/неуспеха программы ОТО IVM мы определили криоконсервацию 5 и более ооцитов стадии МП и/или 1 и более эмбриона как успех программы. По нашим данным, эти показатели были достигнуты лишь у 17/72 (23,6%) женщин, у остальных 55/72 (76,4) программа была неудачной. Мы попытались определить предикторы положительного результата и, соответственно, те факторы, которые ограничивают использование методики ОТО IVM.

Возраст пациенток, уровень АМГ, число антральных фолликулов

Группы с успешной и безуспешной программой значимо различались по возрасту ($p=0,008$; t -критерий Стьюдента): средний возраст пациенток с полученными ОКК был значимо ниже и составил 28,9 (6,9) года по сравнению с 34,3 (5,5) года у пациенток с неблагоприятным исходом.

Также у пациенток с успешным исходом было значимо выше ($p=0,022$; t -критерий Стьюдента) среднее значение АМГ, которое составило 3,06 (1,59) по сравнению с 1,20 (1,50) нг/мл у пациенток с неудачным исходом программы.

Группы с успешной и безуспешной программами значимо различались по числу антральных фолликулов ($p<0,001$; критерий Манна–Уитни): медиана (Q1; Q3) числа антральных фолликулов у пациенток с успешным исходом была выше и составила 9,50 (7,00; 13,25) против 1,00 (0,50; 4,50) у больных с безуспешной программой.

Таким образом, возраст пациентки, сопряженные с ним показатели овариального резерва обнаружили сильную связь с исходом программы ОТО IVM, что закономерно. Обнаружена значимая отрицательная корреляция средней силы между количеством полученных ОКК и возрастом ($R_s=-0,442$; $p<0,001$): чем старше пациентка, тем меньше ОКК. Также количество полученных из ткани яичника ОКК значимо коррелирует с АМГ ($R_s=0,822$; $p<0,001$): чем выше уровень АМГ, тем больше ОКК.

Резекция яичников и химиотерапия в анамнезе

Известно, что как резекция яичников, так и химиотерапевтическое лечение негативно влияют на состояние овариального резерва и возможность получения достаточного количества ооцитов [15–17].

В проведенном нами исследовании не установлена значимая связь между успехом программы ОТО IVM и между успехом/неуспехом программы ОТО IVM и наличием/отсутствием резекции яичников в анамнезе ($p=1$; точный тест Фишера). Между группами пациенток с резекцией 1 яичника, 2 яичников и отсутствием резекций нет значимых различий по количеству ОКК ($p=0,458$; критерий Краскела–Уоллиса).

Однако обнаружена слабая, но значимая отрицательная корреляция между полученными ОКК и проведением химиотерапевтического лечения в анамнезе ($R_s=-0,340$; $p=0,003$): чем больше проведенных курсов химиотерапии, тем меньше полученных ОКК (было всего 11/72 (15,3%) пациенток, подвергавшихся химиотерапии).

Выявлены значимые различия ($p=0,004$; критерий Манна–Уитни) между пациентками с проведенным лечением в анамнезе, где медиана (Q1; Q3) количества полученных ОКК составила 0,6 (1,5), и пациентками без гонадотоксичного лечения – 3,0 (0,0; 8,0).

День менструального цикла

В некоторых публикациях имеются сведения о том, что эффективность получения ОКК и последующее дозревание незрелых ооцитов не зависят от дня менструального цикла [18]. Мы попытались сравнить результаты лечения у пациенток в зависимости от дня цикла, в который проведен забор яичника.

Все пациентки оперировались в различные фазы цикла, из них 42/72 (58,3%) – в фолликулярную, 20/72 (27,8%) – в овуляторную и 10/72 (13,9%) – в лютеиновую фазы. Между успехом программы ОТО IVM и фазой цикла нет значимой зависимости ($p=0,720$; точный тест Фишера). Мы не выявили значимых различий по числу полученных ОКК между тремя группами пациенток, у которых забор яичника был произведен в разные фазы цикла ($p=0,885$; критерий Краскела–Уоллиса), а также не обнаружено влияния фазы цикла на количество МП ($p=0,779$; критерий Краскела–Уоллиса).

Неблагоприятные факторы, ограничивающие возможность получения ОКК

В ходе проведения работы были определены факторы, неблагоприятные для проведения программы ОТО IVM.

К сожалению, зачастую при овариэктомии используется значительная коагуляция яичника, в том числе монополярным током. Естественно, это обусловлено хирургической ситуацией, кровотечением и трудностями выделения яичника, однако коагуляция яичника фатально влияет на возможность получения яйцеклеток (рис. 1).

В 3 случаях в лабораторию ЭКО была доставлена ткань яичника размерами 0,5×0,5 см после резекции яичника. Ни в одном случае не удалось получить ОКК, т.к. функциональная ткань была замещена фиброзной и склерозированной. Также ни в одном случае не удалось получить клетки из биоптатов яичника.

В предыдущем изложении показано, что не установлена значимая связь между успехом программы ОТО IVМ и резекциями яичников в анамнезе ($p=1$ в точном тесте Фишера). Однако дальнейший анализ убедительно доказал связь между размером доставленного образца яичника и возможностью выделения ОКК. Соответственно, чем меньше ткань яичника, тем меньше вероятность получения ооцитов, и, хотя сам факт резекции не показал достоверной корреляции с возможностью получения ооцитов, объем яичника после резекции играет решающую роль.

При наличии в обоих или в единственном яичнике опухоли больше 4 см (рис. 2 и 3) также не удалось выделить ОКК, т.к. функциональная ткань яичника была поражена опухолью.

Всего было криоконсервировано 92/141 (65,2%) зрелых ооцитов у 26/72 (36,1%) больных. Дозревание незрелых клеток произошло в 47,96% случаев.

Хорошо известно, что эмбрионы 5-го дня культивирования лучше переживают криоконсервацию и последующее размораживание, имея большие шансы обеспечить наступление беременности [19]. В настоящем исследовании 14/72 (19,4%) пациенток выразили желание оплодотворить полученные ооциты спермой мужа/партнера.

Проведено оплодотворение 49/141 (34,7%) зрелых ооцитов методом ИКСИ. Сперма партнеров была фертильной или имела незначительную степень патозооспермии. Оплодотворение диагностировано в 27,6% случаев, однако формирование бластоцист наблюдали лишь у 17,95% из оплодотворенных

эмбрионов. Полученные в данном исследовании результаты были значительно ниже, чем общепринятые показатели в программах ЭКО [20].

На рисунке 4 представлены макропрепарат больной раком яичника стадии T3cNxM1b согласно классификации FIGO и полученная у данной супружеской пары эуплоидная бластоциста после проведения программы ОТО IVМ.

Представленные данные показали, что, несмотря на эффективность этапов выделения и дозревания незрелых ооцитов, полученных из ткани удаленного яичника, неудовлетворительными являются процессы оплодотворения, раннего эмбриогенеза, количество и качество бластоцист. Это может быть связано с генетическими факторами, например, анеуплоидией, нарушающей развитие эмбриона, и, что более вероятно, с эпигенетическими причинами, ведущими к аресту раннего эмбриогенеза.

В любом случае первый и очень важный шаг в развитии метода ОТО IVМ сделан, но предстоит большая работа, оценивающая эффективность

Рис. 2. Макропрепарат пациентки 29 лет, серозная аденокарцинома яичников стадии T2bNxM0 low grade с неинвазивным имплантом в тазовой брюшине

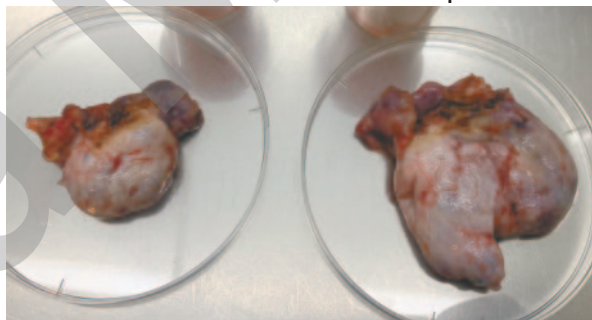


Рис. 3. Макропрепарат пациентки 28 лет с клинико-морфологической картиной рецидива заболевания в виде очагов серозной карциномы левого яичника, низкой степени злокачественности (до 1 см), развившейся на фоне пограничной серозной опухоли, микропапиллярного варианта, с поражением всех слоев органа и его наружного покрова

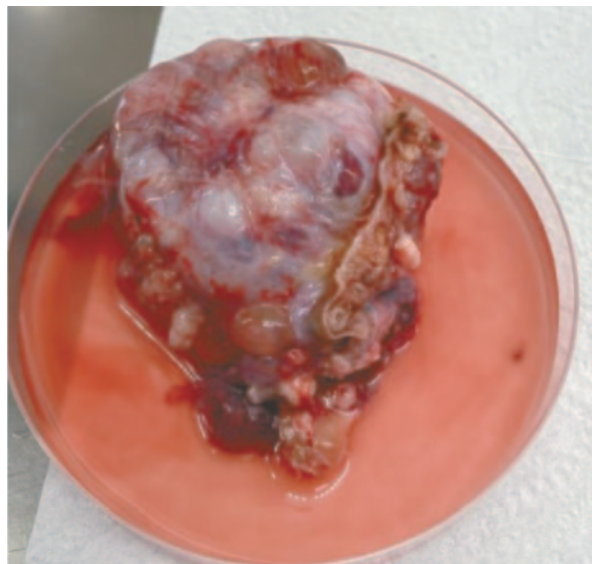


Рис. 1. Макропрепарат пациентки 28 лет, рак яичников стадии T1aNxM0 с признаками некроза от применения электрокоагулятора в предыдущее оперативное лечение

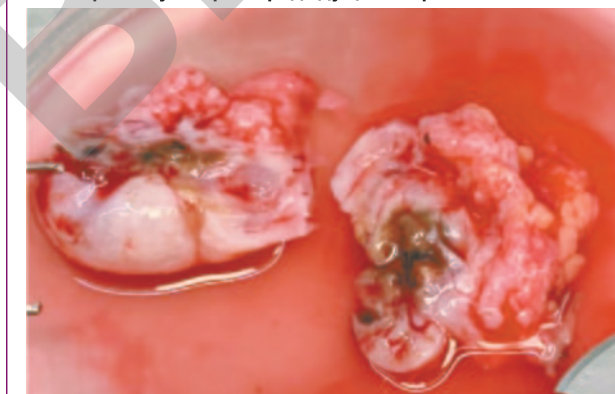
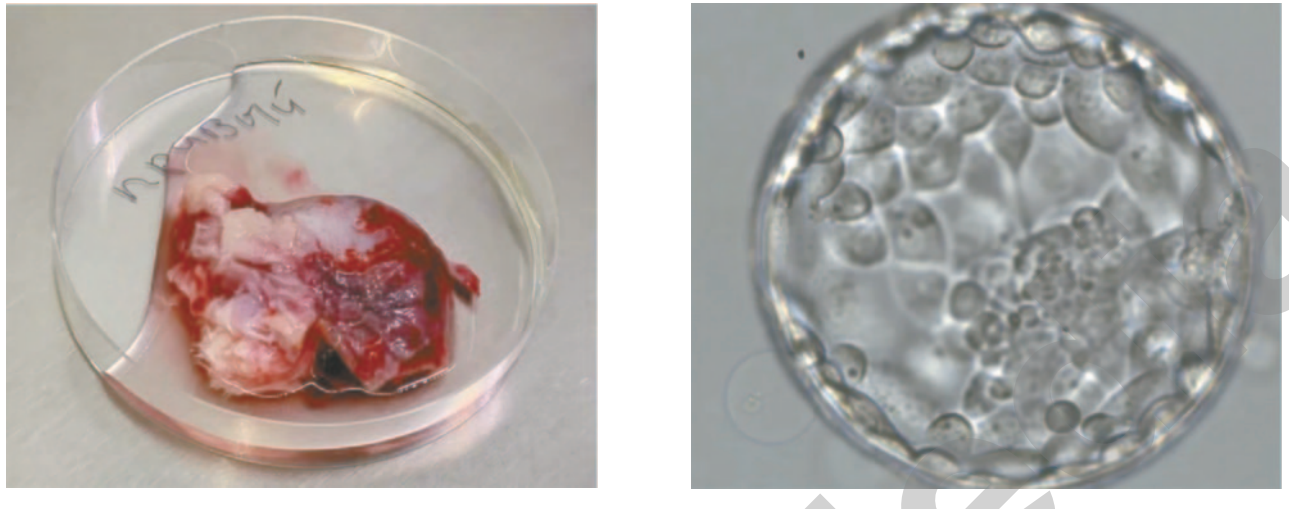


Рис. 4. Макропрепарат больной раком яичника стадии Т3сNxM1b согласно классификации FIGO и полученная у данной супружеской пары эуплоидная бластоциста после проведения программы ОТО IVM



и безопасность метода. Согласно рекомендациям Европейского общества репродуктивной медицины (ESHRE), требуются дальнейшие исследования, посвященные изучению качества ооцитов после IVM, а также долгосрочные наблюдения за детьми, рожденными после применения указанной технологии [10, 13]. Кроме того, требуются дальнейшая разработка и стандартизация протоколов дозревания и криоконсервации ооцитов для повышения эффективности программы IVM.

Несомненно, технология дозревания незрелых ОКК *in vitro* имеет большие перспективы применения в клинической практике как метод сохранения фертильности у онкологических пациенток. Следует еще раз подчеркнуть тот факт, что метод используется в тех случаях, когда нет альтернативных вариантов иметь генетически родного ребенка, прежде всего у молодых женщин, имеющих рак яичников. Этот метод – их единственная надежда, и несомненно необходимость дальнейшей работы в этом направлении.

В этой связи важно определить критерии отбора пациентов с перспективным прогнозом использования метода ОТО IVM. К сожалению, на данном этапе целесообразно исключить неперспективных больных, что необходимо для дальнейшего совершенствования метода.

Заключение

Проведенное исследование позволило определить критерии отбора пациенток для использования метода ОТО IVM. Неперспективными следует считать женщин старше 40 лет с уровнем АМГ ниже 1,0 нг/мл, наличие резекции яичников и полихимиотерапии в анамнезе, использование коагуляции яичника при его удалении, направление в лабораторию ЭКО биоптата яичника и ткани размерами меньше 3 см. Также при наличии опухоли больше 4 см в обоих или единственном яичнике получить ОКК затруднительно. Благоприятной ситуацией следует считать те случаи, когда овариэктомия производится у молодых

женщин с хорошими показателями овариального резерва, размеры опухоли не превышают 2–3 см, желательно не использовать коагуляцию яичника. Следует сказать, что метод продолжает оставаться экспериментальным, при достаточном успехе извлечения ОКК и дорастивании незрелых ооцитов *in vitro* качественные бластоцисты образуются с гораздо меньшей частотой, чем в общей практике ВРТ, что может ограничивать конечный результат лечения, достижение беременности у этого контингента больных. Но, как было сказано выше, это единственная возможность у многих молодых женщин надеяться на деторождение в будущем.

Литература/References

1. Santos M.L., Pais A.S., Almeida Santos T. Fertility preservation in ovarian cancer patients. *Gynecol. Endocrinol.* 2021; 37(6): 483-9. <https://dx.doi.org/10.1080/09513590.2021.1872534>.
2. Ferlay J., Ervik M., Lam F., Colombet M., Mery L., Piñeros M. et al. Global cancer observatory: cancer today. Lyon: IARC; 2020.
3. Xu Y., Zhang M., Zhang J., Ng D.M., Chen X., Si Y. et al. Neoadjuvant chemotherapy increases the 5-year overall survival of patients with resectable cervical cancer: A systematic review and meta-analysis. *Taiwan. J. Obstet. Gy-necol.* 2021; 60(3): 433-41. <https://dx.doi.org/10.1016/j.tjog.2021.03.008>.
4. Alexander V.M., Martin C.E., Schelble A.P., Laufer A.B., Hardi A., McKenzie L.J. et al. Ovarian stimulation for fertility preservation in women with cancer: A systematic review and meta-analysis comparing random and conventional starts. *J. Gynecol. Obstet. Hum. Reprod.* 2021; 50(8): 102080. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jogoh.2021.102080>.
5. Massarotti C., Kohlhepp F., Liperis G., Ammar O.F., Mincheva M.N., Ali Z.E. et al. #ESHREjc report: Is OTO-IVM the future fertility preservation alternative for urgent cancer patients? *Hum. Reprod.* 2021; 36(9): 2631-3. <https://dx.doi.org/10.1093/humrep/deab180>.
6. Chen C.N., Chang L.T., Chen C.H., Tam K.W. Fertility preservation for women with breast cancer before chemotherapy: a systematic review and meta-analysis. *Reprod. Biomed. Online.* 2022; 44(2): 357-69. <https://dx.doi.org/10.1016/j.rbmo.2021.08.003>.
7. Fatemi H.M., Kyrou D., Al-Azemi M., Stoop D., De Sutter P., Bourgain C., Devroey P. Ex-vivo oocyte retrieval for fertility preservation. *Fertil. Steril.* 2011; 95(5): 1787.e15-1787.e17. <https://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.11.023>.

8. Moragón S., Di Liello R., Bermejo B., Hernando C., Olcina E., Chirivella I. et al. Fertility and breast cancer: A literature review of counseling, preservation options and outcomes. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2021; 166: 103461. <https://dx.doi.org/10.1016/j.critrevonc.2021.103461>.
9. Kappy M., Lieman H.J., Pollack S., Buyuk E. Fertility preservation for cancer patients: treatment gaps and considerations in patients' choices. *Arch. Gynecol. Obstet.* 2021; 303(6): 1617-23. <https://dx.doi.org/10.1007/s00404-021-05985-0>.
10. Ковальская Е.В., Кириллова А.О., Буняева Е.С., Хабас Г.Н., Камалетдинов Н.С., Назаренко Т.А., Абубакиров А.Н. Эффективность дозревания ооцитов, полученных в ходе овариэктомии, у онкологических пациенток. *Акушерство и гинекология.* 2019; 9: 87-91. [Kovalskaya E.V., Kirillova A.O., Bunyaeva E.S., Khabas G.N., Kamaletdinov N.S., Nazarenko T.A., Abubakirov A.N. Efficiency of maturation of oocytes obtained from cancer patients during ovariectomy. *Obstetrics and Gynecology.* 2019; 9: 87-91. (in Russian)]. <https://dx.doi.org/10.18565/aig.2019.9.87-91>.
11. Kirillova A., Bunyaeva E., Van Ranst H., Khabas G., Farmakovskaya M., Kamaletdinov N., Nazarenko T., Abubakirov A., Sukhikh G., Smitz J.E.J. Improved maturation competence of ovarian tissue oocytes using a biphasic in vitro maturation system for patients with gynecological malignancy: a study on sibling oocytes. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2021; 38(6): 1331-40. <https://dx.doi.org/10.1007/s10815-021-02118-z>.
12. Howlader N., Noone A.M., Krapcho M., Miller D., Brest A., Yu M. et al.; eds. *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2018.* Bethesda, MD: National Cancer Institute. Available at: https://seer.cancer.gov/csr/1975_2018/, based on November 2020 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2021.
13. Назаренко Т.А., Ашрафян Л.А., Бирюкова А.М., Кириллова А.О., Мартirosян Я.О., Джанашивили Л.Г., Буняева Е.С. Характеристики и тактика ведения онкологических больных, нуждающихся в сохранении репродуктивного материала. *Акушерство и гинекология.* 2020; 11: 93-9. [Nazarenko T.A., Ashrafyan L.A., Biryukova A.M., Kirillova A.O., Martirosyan Ya.O., Dzhanaashvili L.G., Bunyaeva E.S. Characteristics and management of cancer patients who wish to preserve their reproductive capacity. *Obstetrics and Gynecology.* 2020; 11: 93-9. (in Russian)]. <https://dx.doi.org/10.18565/aig.2020.11.93-99>.
14. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria; 2020.
15. Berjeb K.K., Debbabi L., Braham M., Zemni Z., Chtourou S., Hannachi H. et al. Evaluation of ovarian reserve before and after chemotherapy. *J. Gynecol. Obstet. Hum. Reprod.* 2021; 50(5):102035. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jogoh.2020.102035>.
16. Romito A., Bove S., Romito I., Zacc D., Raimondo I., Fragomeni S.M. et al. Ovarian reserve after chemotherapy in breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *J. Pers. Med.* 2021; 11(8): 704. <https://dx.doi.org/10.3390/jpm11080704>.
17. Hopeman M.M., Cameron K.E., Prewitt M., Barnhart K., Ginsberg J.P., Sammel M.D., Gracia C.R. A predictive model for chemotherapy-related diminished ovarian reserve in reproductive-age women. *Fertil. Steril.* 2021; 115(2): 431-7. <https://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2020.08.003>.
18. Cakmak H., Rosen M.P. Random-start ovarian stimulation in patients with cancer. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 2015; 27(3): 215-21. <https://dx.doi.org/10.1097/GCO.0000000000000180>.
19. Wang N., Zhao X., Ma M., Zhu Q., Wang Y. Effect of Day 3 and Day 5/6 embryo quality on the reproductive outcomes in the single vitrified embryo transfer cycles. *Front. Endocrinol. (Lausanne).* 2021; 12: 641623. <https://dx.doi.org/10.3389/fendo.2021.641623>.
20. Anderson R.A., Amant F., Braat D., D'Angelo A., de Sousa Lopes S.M.C., Demeestere I., Dwek S. et al.; ESHRE Guideline Group on Female Fertility Preservation. ESHRE guideline: female fertility preservation. *Hum. Reprod. Open.* 2020; 2020(4): hoaa052. <https://dx.doi.org/10.1093/hropen/hoaa052>.

Поступила 25.05.2022

Принята в печать 14.06.2022

Received 25.05.2022

Accepted 14.06.2022

Сведения об авторах:

Буняева Екатерина Святославовна, врач акушер-гинеколог I-го гинекологического отделения, НМИЦ АГиП им. академика В.И. Кулакова Минздрава РФ, +7(495)531-44-44, e_bunyaeva@oparina4.ru, es_bunyaeva@mail.ru, 117997, Россия, Москва, ул. Академика Опарина, д. 4.

Кириллова Анастасия Олеговна, к.б.н., с.н.с. Центра наук о жизни, Сколковский институт науки и технологий, +7(495)280-14-81, stasia.kozyreva@gmail.com, 121205, Россия, Москва, улица Нобеля, д. 1.

Назаренко Татьяна Алексеевна, профессор, д.м.н., директор института репродуктивной медицины, НМИЦ АГиП им. академика В.И. Кулакова Минздрава РФ, +7(495)531-4444 E-mail: t_nazarenko@oparina4.ru, 117997, Россия, Москва, ул. Академика Опарина, д. 4.

Джанашивили Лана Георгиевна, к.м.н., врач акушер-гинеколог НКО ВРТ им. Ф. Паулсена, НМИЦ АГиП им. академика В.И. Кулакова Минздрава РФ, +7(495)531-44-44, l_dzanashvili@oparina4.ru, 117997, Россия, Москва, ул. Академика Опарина, д. 4.

Гаджимгомедова Карина Керимовна, эмбриолог НКО ВРТ им. Ф. Паулсена, НМИЦ АГиП им. академика В.И. Кулакова Минздрава РФ, +7(495)531-44-44, k_gadzhimagomedova@oparina4.ru, 117997, Россия, Москва, ул. Академика Опарина, д. 4.

Хабас Григорий Николаевич, к.м.н., заведующий отделением инновационной онкологии и гинекологии, НМИЦ АГиП им. академика В.И. Кулакова Минздрава РФ, +7(495)531-44-44, khabas@list.ru, 117997, Россия, Москва, ул. Академика Опарина, д. 4.

Бирюкова Альмина Михайловна, к.м.н., врач акушер-гинеколог НКО ВРТ им. Ф. Паулсена, НМИЦ АГиП им. академика В.И. Кулакова Минздрава РФ, +7(495)531-44-44, a_birukova@oparina4.ru, 117997, Россия, Москва, ул. Академика Опарина, д. 4.

Гависова Алла Анатольевна, к.м.н., и.о. заведующего I-м гинекологическим отделением, НМИЦ АГиП им. академика В.И. Кулакова Минздрава РФ, +7(495)531-44-44, a_gavisova@oparina4.ru, 117997, Россия, Москва, ул. Академика Опарина, д. 4.

Authors' information:

Ekaterina S. Bunyaeva, gynecologist, 1st Gynecology Department, V.I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology, and Perinatology, Ministry of Health of Russia, +7(495)531-44-44, e_bunyaeva@oparina4.ru, es_bunyaeva@mail.ru, 117997, Russia, Moscow, Ac. Oparina str., 4.

Anastasia O. Kirillova, PhD, Senior Researcher, Skoltech Center of Life Sciences, +7(495)280-14-81, stasia.kozyreva@gmail.com, 121205, Russia, Moscow, Nobelya str, 1.

Tatiana A. Nazarenko, Dr. Med. Sci., Professor, Director of Institute of Reproductive Medicine, V.I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology, and Perinatology, Ministry of Health of Russia, +7(495)531-44-44, t_nazarenko@oparina4.ru, 117997, Russia, Moscow, Ac. Oparina str., 4.

Lana G. Dzhanaashvili, PhD, obstetrician-gynecologist at Scientific and Clinical Department of ART named after F. Paulsen, V.I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology, and Perinatology, Ministry of Health of Russia, +7(495)531-44-44, l_dzanashvili@oparina4.ru, 117997, Russia, Moscow, Ac. Oparina str., 4.

Karina K. Gadzhimagomedova, embryologist at Scientific and Clinical Department of ART named after F. Paulsen, V.I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology, and Perinatology, Ministry of Health of Russia, +7(495)531-44-44, k_gadzhimagomedova@oparina4.ru, 117997, Russia, Moscow, Ac. Oparina str., 4.

Grigory N. Khabas, PhD, Head of the Department of Innovative Oncology and Gynecology, V.I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology, and Perinatology, Ministry of Health of Russia, +7(495)531-44-44, khabas@list.ru, 117997, Russia, Moscow, Ac. Oparina str., 4.

Almina M. Biryukova, PhD, gynecologist at Scientific and Clinical Department of ART named after F. Paulsen, V.I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology, and Perinatology, Ministry of Health of Russia, +7(495)531-44-44, a_birukova@oparina4.ru, 117997, Russia, Moscow, Ac. Oparina str., 4.

Alla A. Gavisova, PhD, Acting Head of the 1st Gynecology Department, V.I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology, and Perinatology, Ministry of Health of Russia, +7(495)531-44-44, a_gavisova@oparina4.ru, 117997, Russia, Moscow, Ac. Oparina str., 4.