

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«НАУЧНЫЙ ЦЕНТР АКУШЕРСТВА, ГИНЕКОЛОГИИ И  
ПЕРИНАТОЛОГИИ ИМЕНИ АКАДЕМИКА В.И. КУЛАКОВА»**

**БУНЯЕВА  
ЕКАТЕРИНА СВЯТОСЛАВОВНА**

**СОХРАНЕНИЕ ФЕРТИЛЬНОСТИ У ПАЦИЕНТОК С  
ОНКОЛОГИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ОРГАНОВ  
РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМЫ ПУТЕМ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ  
ТЕХНОЛОГИИ IN VITRO ДОЗРЕВАНИЯ ООЦИТОВ, ПОЛУЧЕННЫХ  
ПРИ ОВАРИЭКТОМИИ**

3.1.4. Акушерство и гинекология

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Научный руководитель: д.м.н. Гависова А.А.

Москва 2023 год

**ОГЛАВЛЕНИЕ**

<b>ОГЛАВЛЕНИЕ</b>	<b>2</b>
<b>ВВЕДЕНИЕ</b>	<b>4</b>
Актуальность темы исследования	4
Цель исследования	6
Задачи исследования	7
Научная новизна исследования	8
Практическая значимость исследования	8
Положения, выносимые на защиту	8
Личный вклад автора	9
Соответствие диссертации паспорту полученной специальности	9
Апробация работы	10
Внедрение результатов исследования в практику	10
Структура и объем диссертации	10
<b>ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ СОХРАНЕНИЯ ФЕРТИЛЬНОСТИ У ПАЦИЕНТОК С ОНКОЛОГИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ОРГАНОВ РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМЫ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)</b>	<b>11</b>
1.1. Эпидемиология неопластических пролиферативных заболеваний органов малого таза	15
1.2. Современные подходы к терапии гинекологических типах рака и опухолей яичников	16
1.3. Транспозиция яичников, как метод сохранения функции яичников	18
1.4. Контролируемая стимуляция суперовуляции	19
1.5. Криоконсервация и аутотрансплантация овариальной ткани	22
1.6. Дозревание ооцит-кумулюсных комплексов <i>in vitro</i> , выделенных из ткани яичников	25
<b>ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ</b>	<b>31</b>
2.1. Материалы исследования	31
2.2. Методы исследования	39

2.2.1. Общеклинический этап	39
2.2.2. Хирургический этап	40
2.2.3. Эмбриологический этап	42
2.2.4. Гистологический этап	45
2.3. Статистическая обработка полученных данных	47
<b>Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ</b>	<b>49</b>
3.1. Изучение особенностей репродуктивного анамнеза и овариального резерва, влияющих на получение ОКК из ткани удаленного яичника	49
3.2. Выделение ооцит-кумулюсных комплексов из ткани удаленного яичника	57
3.3. Влияние клинико-anamнестических факторов, влияющих на исходы программы ОТО IVМ	64
3.4. Эмбриологические исходы программы ОТО IVМ	73
3.5. Прогностические модели успеха/неуспеха программы ОТО IVМ	80
3.6. Оценка зависимости пула яичников от клинико-anamнестических данных	81
3.7. Влияние химиолучевой терапии на исходы программы ОТО IVМ	84
3.8. Ведение пациенток после лечения основного заболевания и методы реализации репродуктивной функции	85
<b>ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ</b>	<b>87</b>
<b>ВЫВОДЫ</b>	<b>96</b>
<b>ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ</b>	<b>98</b>
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ</b>	<b>99</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ</b>	<b>100</b>
<b>Приложение 1. Алгоритм реализации репродуктивной функции у пациенток с гинекологическим раком</b>	<b>110</b>

## **ВВЕДЕНИЕ**

### **Актуальность темы исследования**

В настоящее время благодаря ранней диагностике и эффективному лечению большая доля женщин репродуктивного возраста излечивается от онкологических заболеваний, и частота пятилетней выживаемости после лечения увеличилась с 60% в 1975 году до 82–86%. Тем не менее, последствия лечения онкологических заболеваний зачастую приводят к снижению овариального резерва, преждевременному выключению функции яичников или менопаузе [1-3]. Повреждение фолликулярного аппарата яичников приводит к бесплодию у женщин, перенесших онкологическое заболевание, а также негативно влияет на качество их последующей жизни.

Онкологические заболевания внутренних половых органов девушек и у женщин репродуктивного возраста составляют значительную часть в структуре онкологических заболеваний. Так, известно, что в структуре заболеваемости раком, у 8% женщин рак эндометрия развивается в репродуктивном возрасте, у 12% рака яичников, у 40% рак шейки матки диагностируется в репродуктивном периоде.

В связи с этим, крайне актуальным представляется вопрос о сохранении фертильности у пациенток с онкологическими заболеваниями до проведения хирургического, химиотерапевтического и/или радиологического лечения.

Основной тактикой сохранения фертильности в настоящее время до проведения гонадотоксичной терапии является криоконсервация ооцитов и/или эмбрионов, полученных после овариальной [4,8]. К сожалению, такой подход не может быть использован у пациенток, которым показана неотложная химиотерапия, а также девочкам препубертатного возраста. Также проведение стимуляции яичников ограничено в большинстве случаев злокачественных заболеваний яичников, тела и местно распространенных стадий шейки матки [70].

Для этой когорты пациенток активно используется органосохраняющая тактика во время хирургического этапа лечения. Она возможна в случаях ранних стадий карциномы шейки матки, аденокарциномы эндометрия, в случаях пограничных опухолей, односторонних цистаденом яичников с низкой злокачественностью (стадия IA). Консервативный подход, направленный на сохранение фертильности, заключается в сохранении матки и/или одного из яичников во время операции. Тем не менее, в большинстве случаев онкогинекологических заболеваний важнейшие органы репродуктивной сферы, а именно матка и яичники радикально удаляются во время оперативного вмешательства. Принятие решения об оптимальном объеме операции у молодых женщин с нереализованной репродуктивной функцией является крайне сложным, так как удаление репродуктивных органов лишает их этой возможности в будущем. После гистерэктомии единственная возможность реализации репродуктивной функции связана с программой суррогатного материнства, а при овариэктомии – только с использованием донорских ооцитов. С другой стороны, при излишне консервативном подходе повышается риск рецидива заболевания.

Другая стратегия сохранения фертильности построена на возможности криоконсервации, трансплантации и других манипуляций с овариальной тканью. Ауто трансплантация размороженных фрагментов кортикального слоя овариальной ткани после достижения ремиссии онкологического заболевания привело к рождению с 2004 года до настоящего времени около 160 детей по всему миру [2,8,59,76]. Ограничение широкого применения ауто трансплантации яичниковой ткани прежде всего связано с высоким риском метастазирования опухолевых клеток в яичники, имеющего место при большинстве онкологических заболеваний, в том числе органов репродуктивной системы [1,5-9]. Так, исследования овариальной ткани у пациенток с острой формой лейкоза методом ПЦР показали, что раковые клетки обнаруживаются до 50% образцов ткани яичника, что может привести к рецидиву заболевания [1,11].

Для пациенток с онкологическими заболеваниями органов репродуктивной системы единственным эффективным способом сохранения фертильности могут служить методы, основанные на дозревании ооцит-кумулюсных комплексов в условиях *in vitro* (IVM), полученных в результате овариэктомии. В настоящее время в мировой практике описаны всего три случая наступления беременности с применением технологии IVM после овариэктомии [71-73]. Во всех трех случаях беременности наступили после переносов эмбрионов, криоконсервированных на стадии 6-8 бластомеров на 3 сутки развития. Данные исследования указывают на то, что ооциты, полученные после овариэктомии, дозревшие и оплодотворенные *in vitro*, способны к развитию и могут привести к беременности. Тем не менее, клиническая эффективность и воспроизводимость метода остаются крайне низкими, не изучены многие клинические и эмбриологические аспекты применения метода у пациенток с онкологическими заболеваниями, в том числе органов репродуктивной системы, не изучены цитогенетические особенности полученных эмбрионов, что диктует необходимость дальнейшего изучения возможности получения полноценных ооцитов и эмбрионов при извлечении незрелых ооцитов из ткани яичника.

### **Цель исследования**

Разработать тактику ведения пациенток с онкологическими заболеваниями органов репродуктивной системы, желающих сохранить генетический материал и реализовать репродуктивный потенциал в будущем, а также клинико-эмбриологические этапы программы *in vitro* дозревания ооцитов, полученных в результате овариэктомии.

## Задачи исследования

1. Изучить особенности репродуктивного анамнеза у пациенток с онкологическими заболеваниями органов репродуктивной системы и оценить овариальный резерв до хирургического лечения на основании клинических, гормональных и инструментальных методов исследования в зависимости от локализации и распространенности неопластического процесса.

2. Оценить морфологически пул фолликулов, присутствующих в ткани яичника, а также зависимость параметров пула фолликулов от клинико-анамнестических характеристик пациенток (возраст, уровень АМГ в сыворотке крови, количество антральных фолликулов (КАФ) в яичнике, тип онкологического заболевания, его распространенность).

3. Определить особенности *in vitro* дозревания ооцитов, полученных из ткани яичника, в зависимости от возраста, маркеров овариального резерва, типа онкологического заболевания (его распространенности).

4. Оценить эффективность исследуемой технологии IVМ путем анализа эмбриологических параметров полученных эмбрионов.

5. Определить клинико-анамнестические параметры, прогнозирующие эффективность методики IVМ ооцитов, полученных при овариэктомии.

6. На основании полученных данных разработать тактику сохранения фертильности у пациенток с онкологическими заболеваниями органов репродуктивной системы, с учетом возможностей исследуемой технологии.

## **Научная новизна исследования**

Впервые в рамках проведенного исследования разработана технология получения ооцит-кумулюсных комплексов из ткани удаленного яичника, методика дозревания незрелых ооцитов *in vitro*, оплодотворения, культивирования полученных эмбрионов. Оценено их качество по морфологическим и молекулярно-генетическим критериям. Определены критерии, прогнозирующие эффективность технологии IVМ, выделена группа больных, перспективная для использования разработанной методики в клинической практике. Установлено, что ведущими характеристиками, определяющими эффективность технологии ОТО IVМ, являются возраст пациентки, наличие в анамнезе резекции яичников, состояние овариального резерва, наличие опухоли яичника, ее размеры и морфотип, объем ткани яичника, предоставленной для выполнения технологии. Показано, что технология дозревания ооцитов, полученных из ткани яичника не влияет на ploидность эмбриона при условии его хороших морфологических характеристик.

## **Практическая значимость исследования**

Проведенное исследование позволит рекомендовать для клинического использования в профильных отделениях ВРТ программу IVМ ооцитов, полученных *ex vivo* из яичников после овариэктомии, что будет способствовать сохранению репродуктивного материала для отсроченного деторождения у молодых пациенток, заболевших раком.

## **Положения, выносимые на защиту**

1. Предикторами успеха получения у женщин незрелых ооцит-кумулюсных комплексов из ткани яичника являются возраст до 37 лет, уровень АМГ не менее 2,11 нг/мл, наличие антральных фолликулов в яичниках у пациенток с онкологическими заболеваниями органов репродуктивной системы без неопластических процессов в яичниках.



2. Дозревание незрелых ооцит-кумулюсных комплексов до стадии зрелых ооцитов происходит в 50% случаев, независимо от неопластических процессов в яичниках. Не выявлено зависимости исходов программы IVМ от используемых сред дозревания *in-vitro* ооцит-кумулюсных комплексов.

3. Методом сохранения репродуктивного материала при гинекологическом раке, имеющим противопоказания к гормональной стимуляции, является проведение программы ОТО IVМ. Качество дозревших ооцит-кумулюсных комплексов до стадии зрелых ооцитов и формирование бластоцист не зависит от нозологической формы онкологического заболевания, но резко снижается при предварительном проведении химиолучевой терапии.

### **Личный вклад автора**

Автор непосредственно участвовал в выборе научного исследования, постановке цели и задач исследования, разработке дизайна, в проведении систематизации литературных данных по теме диссертации, разработке индивидуальной анкеты для сбора анамнеза, изучении клинико-анамнестических данных и результатов обследования пациенток, включенных в исследование. Автор лично осуществлял консультирование пациенток в выборе тактики сохранения фертильности. Автор участвовал в сборе материала, анализе, обобщении и статистической обработке полученных данных.

### **Соответствие диссертации паспорту полученной специальности**

Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 3.1.4. – «акушерство и гинекология». Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пунктам 4 и 5 паспорта акушерства и гинекологии.

## **Апробация работы**

Работа обсуждена на заседании апробационной комиссии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава Российской Федерации (26.06.2023 г., протокол № 8).

## **Внедрение результатов исследования в практику**

Результаты исследования внедрены и используются в практической работе 1-го гинекологического отделения (руководитель отделения – д.м.н., Гависова А.А.) ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава Российской Федерации (директор - академик РАН Сухих Г.Т.).

Материалы и результаты исследования включены в лекции и практические занятия для клинических ординаторов и аспирантов ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России. По теме диссертации опубликовано 7 печатных работ, которые входят в перечень рецензируемых научных журналов и изданий, рекомендованных ВАК. Патент: «Способ выделения и дозревания незрелых ооцит-кумулюсных комплексов, выделенных из яичника после его удаления» (Авторы: Кириллова А.О., Буняева Е.С.).

## **Структура и объем диссертации**

Диссертация состоит из оглавления, списка сокращений, введения, обзора литературы, глав собственных исследований, обсуждения полученных результатов, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Работа представлена на 110 страницах машинописного текста, иллюстрирована 35 рисунками и 14 таблицами. Библиографический указатель включает 94 работ на русском и английском языке.

## **ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ СОХРАНЕНИЯ ФЕРТИЛЬНОСТИ У ПАЦИЕНТОК С ОНКОЛОГИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ОРГАНОВ РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМЫ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)**

Направление «онкофертильность» появилось в конце 90-х годов прошлого столетия и включает различные способы сохранения генетического материала у онкологических пациенток для реализации репродуктивной функции. Сохранение репродуктивного материала приводит к повышению качества жизни пациентов. Немаловажную роль играет желание иметь собственного генетически родного ребенка, в связи с чем психологическое расстройство от потери фертильности может быть сильнее и глубже, чем смирение с мыслью об онкологическом заболевании, предстоящей терапией и последующей за ней длительной реабилитацией. Вероятное бесплодие из-за лечения рака у женщин может быть более разрушительным для сознания, чем само принятие диагноза рак, и возможность иметь ребенка после излечения может быть важным стимулом в предстоящей терапии и реабилитации [12-14].

Несмотря на то, что средний возраст пациенток с гинекологическим раком составляет 50 лет и старше, число молодых женщин, у которых диагностируют онкологические заболевания органов репродуктивной системы продолжает увеличиваться и в среднем этот возраст до 37 лет, что соответствует активному репродуктивному возрасту. В связи с современной тенденцией отсроченного деторождения, возрастает число женщин, у которых рак диагностируют раньше, чем наступает их первая беременность. Зачастую, многие женщины, больные раком, выбирают менее инвазивную или гонадотоксичную терапию для снижения риска развития будущего бесплодия [15]. Но такая тактика может привести к менее эффективным результатам проведенного лечения. Исходя из этого, сохранение фертильности является важной проблемой для онкологических пациентов

репродуктивного возраста и неотъемлемой составляющей в консультировании пациентов до гонадотоксичного или хирургического лечения рака. Американское сообщество клинической онкологии указывает на то, что онкологические пациенты обеспокоены вопросом сохранения фертильности [15]. Своевременная оценка и выбор доступных методов сохранения фертильности без препятствия лечению рака, стало важнейшим компонентом современной онкологической помощи женщинам, которую необходимо проводить до планирования основного лечения. В одном из опросов онкологов было показано, что 61% специалистов обсуждают с пациентами влияние потенциального гонадотоксичного лечения на будущую фертильность женщины, 45% опрошенных врачей никогда не задумывались о рекомендации пациентам консультации репродуктолога и лишь 15% направляли их к специалистам узкого профиля [16].

Некоторые авторы сосредоточили внимание на влиянии проблем с фертильностью на психосоциальные исходы [21,22,13]. Анализ данных психодиагностического тестирования анкет 51 пациентки с раком шейки матки показал, что репродуктивные проблемы были связаны с более низким качеством социальной жизни, низким духовным благополучием, меньшей социальной поддержкой, периодическими болями в области малого таза и угнетение сексуальной функции [21]. Кроме того, данные анкетирования также показали, что репродуктивные проблемы были связаны с угнетением состояния и отрицательными эмоциями по поводу неспособности иметь детей (31%), неспособностью открыто говорить о фертильности (30%), разочарование, связанное с неспособностью к деторождению (25%), и оплакивание утраты способности иметь детей (25%).

По сравнению с контрольной группой, выжившие после рака шейки матки выражали значительно больше беспокойства по поводу репродуктивной функции [22,24].

По мнению авторов, эмоциональное переживание о наличии бесплодия у женщин одинаково, независимо от причины бесплодия [19]. В ряде

исследований установлено, что значительная часть пациентов с гинекологическим раком не получали консультации по вопросам бесплодия или не обращались к репродуктологам. Отсутствие или недостаточность полученной информации по вопросам фертильности проводилось даже среди женщин, прошедших процедуры по сохранению фертильности. Некоторые из них сообщили, что они прибегли к данным методам, мало зная о последствиях, рисках и возможных репродуктивных исходах. Многие женщины, участвовавшие в исследованиях, выразили желание получить дополнительную поддержку фертильности [25,26].

Известно, что существуют этические проблемы, связанные с сохранением репродуктивного потенциала при гинекологическом раке, особенно при метастатическом заболевании. В то время как клинические рекомендации предлагают консультирование по вопросам бесплодия всем женщинам, независимо от типа или стадии заболевания, многие клиницисты не решаются обсуждать сохранение генетического материала с пациентками, у которых мало шансов на выживание по этическим соображениям [27]. Кроме того, поскольку значительной части пациенток может потребоваться гистерэктомия и вынашивание будущей беременности будет невозможным, потребуется применение программы суррогатного материнства. Данный способ рождения ребенка является финансово затруднительным для ряда женщин и незаконна в некоторых странах [23,26]. Однако, желание сохранить репродуктивную способность было одной из причин, по которым принимались решения о тактике лечения, например, такие как радикальная трахелэктомия вместо радикальной гистерэктомии у пациентов с раком шейки матки [20].

Эволюция вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) способствовала разработке методов и стратегий для сохранения фертильности у больных раком. Они включают в себя фармакологическую защиту яичника от гонадотоксического воздействия с применением агонистов гонадотропин-рилизинг гормона (аГнРГ), транспозицию яичников,

криоконсервацию ооцитов, эмбрионов или ткани яичника до начала противораковой терапии [17]. В 2013 году Американское Общество Клинических Онкологов разработало практическое руководство по оптимизации сохранения фертильности у онкологических больных, одной из рекомендаций которой, является, приступить к сохранению фертильности как можно быстрее, до начала химиолучевого лечения [15].

В связи с увеличением социально-демографического перехода к женщинам, рожаящим первый раз после 35 лет, репродуктивным старением и химиолучевой терапией в прошлом, проблемы фертильности стали более распространенными и сложными у женщин, больных раком [18]. Варианты сохранения фертильности у пациенток с онкологическими заболеваниями органов репродуктивной системы напрямую зависят от ряда факторов, таких как – возраст, вид и стадия онкологического заболевания, наличие полового партнера, метод и тактика лечения, а также возможность отсрочки химиолучевой терапии и ее дозы.

Очень часто пациенткам с гинекологическими типами рака показано проведение хирургических операций на внутренних половых органах. Принятие решения об оптимальном объеме операции у молодых женщин с нереализованной репродуктивной функцией является крайне сложным, так как удаление репродуктивных органов лишает их этой возможности в будущем. После гистерэктомии, единственная возможность реализации репродуктивной функции связана с программой суррогатного материнства, а при овариэктомии – только с использованием донорских ооцитов. С другой стороны, при излишне консервативном подходе повышается риск рецидива заболевания.

В настоящее время существует два стандартных варианта сохранения генетического материала, которые могут быть предложены пациентам: криоконсервация ооцитов и криоконсервация эмбрионов [19]. Однако, для выполнения этих методов требуется от 2 недель для проведения контролируемой стимуляции яичников. Эти требования не подходят для

пациентов с гормонозависимыми видами рака или когда требуется более раннее начало специфического лечения по витальным показаниям, например осложненное течение болезни. Более того, эти программы не могут быть использованы для пациенток препубертатного возраста. В связи с этим, особенно актуальным, является разработка новых, инновационных методов сохранения фертильности для пациенток с гинекологическим раком. Таким пациентам требуется персональная стратегия в выборе наиболее оптимального варианта терапии, которая будет определяться совместно с онкогинекологом и репродуктологом.

### **1.1. Эпидемиология неопластических пролиферативных заболеваний органов малого таза**

Ежегодно в мире диагностируется почти 100 000 новых случаев гинекологических злокачественных новообразований, и 15–20% этих случаев приходится на женщин в возрасте до 40 лет [20]. Таким образом, значительное число пациенток, страдающих гинекологическими опухолями, имеют детородный возраст на момент постановки диагноза и еще не выполнили свою репродуктивную функцию. Известно, что 8% рака эндометрия, 12% рака яичников и 40% рака шейки матки встречаются у женщин в репродуктивном периоде [21]. Достижения в области раннего выявления рака и улучшенные протоколы лечения значительно увеличили выживаемость пациентов за последние несколько лет. Так, среди всех видов рака яичников – 12% диагностируются у фертильных женщин, и средняя 5-летняя выживаемость при раке яичников составляет 47,4% [22], тогда как общая 5-летняя выживаемость у всех женщин с раком яичников на стадиях 1A и 1B (по FIGO)  $\leq 44$  лет составляет 91,2% [23]. Наиболее распространенным гистологическим типом злокачественных новообразований яичников является эпителиальный, на который приходится 90% случаев [24]. Приблизительно у 80% пациентов с диагнозом эпителиальный рак яичников случается рецидив после стандартного лечения

первой линии, которое включает в себя химиотерапию [25]. Не менее важную роль на состояние резерва яичников играют другие новообразования, такие как пограничные опухоли яичников и метастатические поражения.

Пограничные опухоли яичников (ПОЯ) составляют 10–20% всех эпителиальных опухолей яичников, причем треть случаев диагностируется в возрасте до 40 лет [26]. Кионо и соавторы [21] утверждают, что риск метастазирования в яичники от негинекологического рака, по-видимому, выше для рака желудка (55,8%), за которым следует рак толстой кишки (26,6%), рак молочной железы (24,2%), рак легких (23,4%) и лимфома (13,3%), в то время как частота случаев рака тела матки варьируется от 13,1 до 22%. Такой вывод был сформулирован после вскрытия 5571 женщин, у 22,4% из которых были обнаружены метастазы в яичники от негинекологического рака.

## **1.2. Современные подходы к терапии гинекологических типах рака и опухолей яичников**

В большинстве случаев онкогинекологических заболеваний важнейшие органы репродуктивной сферы, а именно матка и яичники радикально удаляются во время оперативного вмешательства [27]. Так, существующий стандарт медицинской помощи при раке яичников – гистерэктомия и двусторонняя сальпингоофорэктомия с тазовой и парааортальной лимфаденэктомией, что полностью исключает возможности женской фертильности [28].

Органосохраняющее хирургическое лечение, направленное на сохранение матки и, хотя бы одного яичника, все чаще находит свое место в лечении ранних стадий гинекологического рака у пациентов детородного возраста. Его цель – сохранить функциональность репродуктивных органов, уменьшив радикальность хирургической процедуры, тем самым допуская возможность будущей беременности. Стоит учитывать, что хирургические вмешательства увеличивают риск развития спаечного процесса с



вовлечением маточных труб, что также приводит к бесплодию. Кроме того, вариант хирургического лечения с сохранением фертильности подходит только для отдельных случаев, которые определяются стадией, гистологией, степенью и прогностическими факторами заболевания [29]. Органосохраняющая тактика во время хирургического этапа лечения возможна в случаях ранних стадий карциномы шейки матки, аденокарциномы эндометрия, в случаях пограничных опухолей, односторонних цистаденом яичников с низкой злокачественностью (стадия IA).

Сохранение фертильности при доброкачественных и пограничных опухолях яичников (ПОЯ) необходимо также учитывать как оперирующим хирургам, так и самим пациентам, поскольку эти опухоли возникают в более молодом возрасте, чем рак яичников [27]. При поражении яичников, сохранение фертильности представляет собой более сложную задачу, так как происхождение заболевания напрямую связано с источником образования ооцитов и овариальным резервом.

В подавляющем большинстве случаев пациентам с ПОЯ проводится органосохраняющая тактика лечения, однако их послеоперационное ведение осложняется высоким риском рецидивирования заболевания. Повторные операции могут неблагоприятно влиять на здоровую ткань яичника и резко уменьшить овариальный резерв. У пациентов с односторонней ПОЯ 1 стадии, которым проводится односторонняя сальпингоофорэктомия, частота рецидивов на оставшемся яичнике составляет 5-10%. Этот показатель увеличивается (30–45%) при лечении пациентов с цистэктомией [30]. ПОЯ могут рецидивировать через несколько лет (до 10) после первичного диагноза, и заболевание может проявляться различными признаками, такими как перитонеальная инвазия и злокачественная трансформация [31].

При многих типах гинекологического рака женщинам показано проведение химио- и лучевой терапии. После такого лечения, женщины подвергаются повышенному риску преждевременной яичниковой

недостаточности и ранней менопаузы, а также повреждению сосудов внутренних половых органов на фоне влияния токсинов [32]. У молодых женщин более «богатый» яичниковый резерв, что снижает риск аменореи, вызванной химиотерапией. Препараты Цисплатин и Карбоплатин, обычно используемые в схемах лечения гинекологических злокачественных новообразований, вызывают повреждение ДНК и влияют на ее репликацию. В исследованиях на животных было обнаружено, что препарат Паклитаксел, который также применяется в стандартных схемах лечения рака, повреждает зрелые ооциты и влияет на краткосрочный репродуктивный потенциал [33]. Облучение брюшной полости и малого таза может вызвать истощение фолликулярного аппарата, повреждение эндометрия и миометрия, которые на фоне излучения подвергаются фиброзу и атрофии [34].

Несколько международных исследований показали, что адекватное консультирование по поводу сохранения фертильности у онкологических больных связано с улучшением качества жизни женщин, переживших гинекологический рак [13,14,35,36]. Крайне важным является своевременное репродуктивное консультирование пациенток перед гонадотоксичным лечением, которое позволит выбрать наиболее подходящий метод сохранения фертильности.

### **1.3. Транспозиция яичников, как метод сохранения функции яичников**

Транспозиция яичников оказалась неоценимым методом сохранения функции яичников у пациентов с злокачественными новообразованиями малого таза, требующих облучение [37]. В 2003 г. была разработана хирургическая методика мобилизации сохраненных яичников в процессе комбинированного лечения у пациенток с раком шейки матки (Ю.С. Сидоренко и соавт., патент No 2254064) [38]. У пациенток с данным заболеванием, проходящих лучевую терапию на область малого таза, была описана транспозиция яичников. Из области малого таза в боковые каналы брюшной полости вне зоны облучения. Сообщается, что лапароскопическая

транспозиция яичников имеет успех в 88,6% в сохранении функции яичников и безусловно уменьшает прямое воздействие ионизирующего излучения, однако исследования показали, что защитная функция данного метода может ограничиваться из-за изменения кровотока и рассеянного излучения [39]. Причины неудач являются такие явления, как нарушение кровоснабжения вследствие механического (лучевого) повреждения питающих сосудов, образование функциональных кист и миграция яичников обратно в малый таз.

Если планируется лучевая терапия органов малого таза без химиотерапии, женщинам может быть предложена транспозиция яичников с целью предотвращения преждевременной недостаточности яичников [37,40]. Однако, женщины со сниженным овариальным резервом и с риском метастазирования яичника не подходят для данного метода [41].

Стейггард и соавт. сообщают, что индукция овуляции и извлечение ооцитов может успешно выполняться на мобилизованных яичниках [42]. В исследовании описывается случай успешной стимуляции функции яичников у пациентки с раком шейки матки, прошедшую гистерэктомию с транспозицией яичников. 31-летняя женщина прошла курс лучевой и химиотерапии, однако с помощью заместительной гормональной терапии, функция яичников восстановилась. Ей проводилась трансабдоминальная аспирация фолликулов с помощью вагинального датчика. Первые две стимуляции завершились неудачей, однако после третьей и четвертой стимуляции было криоконсервировано 4 эмбриона. Перенос в полость матки трех успешно размороженных эмбрионов было проведено суррогатной матери, в результате которого родились 2 здоровых мальчика.

#### **1.4. Контролируемая стимуляция суперовуляции**

На сегодняшний день, самым эффективным методом сохранения генетического материала является применение ВРТ (вспомогательные репродуктивные технологий) программ с криоконсервацией ооцитов и/или

эмбрионов [15]. Витрификация ооцитов была принята в качестве стандартного метода сохранения фертильности в обновленном руководстве Американского Общества Клинических Онкологов 2013 года [15]. Такой метод сохранения генетического материала является альтернативным вариантом для женщин, у которых нет надежного полового партнера или которые не желают воспользоваться услугами банка донорской спермы. С помощью применения размороженных ооцитов были получены высокие показатели выживаемости женских половых клеток и наступления беременности после их оплодотворения [43]. Так, выживаемость ооцитов после размораживания составила 94%, коэффициент имплантации – 20,4%, а показатели пролонгированной беременности – 46,7% [44]. Сообщается, что частота имплантации витрифицированных ооцитов составляет 40%, а частота клинической беременности – 55% [45]. Также, стоит информировать о том, что показатели успешной криоконсервации ооцитов у женщин с диагностированным онкологическим заболеванием ниже, чем у женщин без рака [41].

Гемелл и соавт. описывают тройную стимуляцию функции яичников у 31-летней пациентки с эндометриоидной аденокарциномой яичников стадии 1С перед проведением радикальной хирургии с последующей химиотерапией [46]. Через 3 недели после двусторонней цистэктомии проведена первая стимуляция функции яичников в начале лютеиновой фазы в протоколе с антагонистами гонадотропин-рилизинг-гормона в сочетании с антагонистами ароматазы (Летрозол). Через 6 дней после пункции началась вторая стимуляция яичников и через 6 дней после второй пункции проведена третья стимуляция. Несмотря на сниженный овариальный резерв (АМГ 0,39 нг/мл), в сумме было получено 16 ооцитов и криоконсервировано 9 эмбрионов на стадии 2pn. Данный подход к сохранению фертильности демонстрирует, что волны фолликулогенеза могут быть успешно использованы в последовательных стимуляциях яичников у пациенток с гинекологическим раком до радикального хирургического и гонадотоксичного лечения.

Филлипи и соавт. в своем исследовании утверждают, что стимулирование гонадотропинами в сочетании с Летрозолом возможно у женщин, с рецидивирующими ПОЯ перед оперативным лечением [47]. Исследование проводилось двум женщинам, и у обеих не было обнаружено роста опухоли и удалось успешно криоконсервировать 15 ооцитов в первом случае и 14 ооцитов - во втором, однако стоит дождаться результатов гистологического исследования перед окончательным решением дальнейшей тактики сохранения фертильности. Пограничные опухоли яичников в ряде случаев рецидивируют в виде рака низкой степени злокачественности, что является абсолютным противопоказанием к стимуляции функции яичников.

Среди двух случаев, о которых сообщили Филиппи и соавт., у одной пациентки был рецидив после первичного лечения в виде муцинозного рака яичника [48]. Пограничные опухоли яичников в сроки наблюдения более 5 лет рецидивируют до 50% [49] после органосохраняющего лечения, что не влияет на выживаемость, однако резко снижает репродуктивный потенциал в следствии повторных резекций яичников или овариэктомий. Таким образом, одновременное применение Летрозола для снижения уровней эстрогенов во время контролируемой стимуляции яичников при ПОЯ, является потенциально рациональным подходом для снижения риска развития рецидива, хотя убедительные доказательства его эффективности не представлены [50].

Применение протоколов (ВРТ) с использованием гонадотропных препаратов может являться основным противопоказанием у женщин с определенными видами и стадиями онкологического заболевания, в частности с эстрогензависимыми опухолями [51]. Кроме того, данный метод не подходит пациенткам со сниженным овариальным резервом и на фоне химиотерапии.

Эффективность протоколов ВРТ резко снижается даже после одного курса химиотерапии, поэтому следует проводить овариальную стимуляцию до начала гонадотоксичного лечения, если это позволяет вид и стадия

онкологического заболевания [51]. Гинсбург и соавторы в своём ретроспективном исследовании сообщают о 15 женщинах, прошедших программу ЭКО (экстракорпоральное оплодотворение) после химиолучевой терапии [52]. У данных пациенток оказался более низкий ответ на стимуляцию яичников гонадотропинами, чем у женщин до лечения рака. Известно, что гонадотоксичное лечение вызывает существенную потерю количества фолликулов. У одной из четырех пациенток из исследования Долманс с соавт., было получено 6 ооцитов и лишь 1 эмбрион хорошего качества [53]. Все они проходили по протоколу ВРТ между двумя курсами химиотерапии. Тогда как у семи женщин проведение программы ЭКО перед проведением химиотерапии было получено от 4 до 11 эмбрионов, большинство которых оказались пригодных к переносу в полость матки.

Также пациенты, которым выставлен диагноз генитальный рак, часто ограничены во времени для решения вопроса о сохранении своего генетического материала. Известно, что от начала применения протокола стимуляции функции яичников с первых дней менструального цикла и до предполагаемой криоконсервации эмбрионов или ооцитов требуется в среднем 10-14 дней. В ряде случаев, химиолучевую терапию необходимо начинать немедленно и этот факт является основным препятствием в проведении стимуляции функции яичников для получения большего количества зрелых ооцитов пациентам, которым возможен такой метод сохранения фертильности [54].

### **1.5. Криоконсервация и аутотрансплантация овариальной ткани**

В случае, когда пациентке требуется неотложное онкологическое лечение или противопоказана гормональная стимуляция функции яичников, для сохранения фертильности может быть применен метод криоконсервации овариальной ткани. Этот метод сохранения фертильности предполагает хирургическое извлечение ткани яичника и последующую криоконсервацию [55]. Криоконсервация яичниковой ткани и последующая

ауто трансплантация, в настоящее время, является единственным доступным способом сохранения фертильности у препубертатных девочек. Когда криоконсервация и хранение ткани яичника выполняется у препубертатных девочек, успешная последующая трансплантация может также привести к индуцированному половому созреванию [56].

Большим преимуществом этого метода является то, что при трансплантации яичниковой ткани восстанавливаются не только шансы на беременность, но и эндокринная функция яичника, а также возможен вариант достижения естественной беременности [57]. Кора яичника содержит преантральные фолликулы, которые более устойчивы к криоповреждению, чем антральные фолликулы, потому что они имеют относительно неактивный метаболизм и лишены метафазного веретена, блестящей оболочки ооцита и корковых гранул [58].

На сегодняшний день родилось несколько детей от женщин, зачатых *in vivo* или *in vitro* после реимплантации ткани яичника [59]. Ауто трансплантация размороженных фрагментов кортикального слоя овариальной ткани после достижения ремиссии онкологического заболевания привело к рождению с 2004 года около 160 детей по всему миру [60]. Продолжительность функционирования трансплантированной ткани яичника еще изучается, однако, Дженсен и др. сообщили о 53 трансплантрованных лоскутов яичниковой ткани, поддерживающих эндокринную функцию до 10 лет, и о частоте беременности в 31% (10 из 32) [61].

Метод криоконсервации овариальной ткани может быть применен и у пациенток с гинекологическими типами рака. Первый случай живорождения с помощью ауто трансплантации яичниковой ткани опубликовал Дитрих и соавт. в 2015 году [62]. У пациентки была диагностирована серозная аденокарцинома яичника. В возрасте 30 лет ей провели программу криоконсервации ткани яичника, а в возрасте 35 лет ткань была ортотопически трансплантирована. Впоследствии женщина зачала

естественным путем и родила здорового ребенка. Также, Кристенсен и соавт. описывают успешное живорождение у пациентки с раком яичника после аутотрансплантации кортикальной ткани [63]. В исследование включена 1 пациентка, у которой в 23 года была диагностирована муцинозная аденокарцинома яичника стадии 1С. После удаления пораженного яичника, было решено провести овариэктомия коллатерального яичника с сохранением его кортикального слоя. Через 9 лет после оперативного и химиотерапевтического лечения, пациентке произведена гетеротопическая трансплантация 9 кусочков размороженной кортикальной ткани. Через 14 недель восстановился менструальный цикл, после чего проведено 7 циклов стимуляции яичников в протоколах с антагонистами гонадотропин-рилизинг-гормона. Первая беременность завершилась самопроизвольным выкидышем на 8 неделе от зачатия. В результате переноса 2х эмбрионов в полость матки, наступила вторая беременность, которая привела к живорождению диамниотических двойняшек, а именно двух здоровых мальчиков с массой 2700 и 2600 грамм. Роды были индуцированы на 38-39 неделе из-за развития преэклампсии. О молекулярном кариотипе этих детей ничего не известно. Через 3 месяца после родоразрешения, пациентке произведено удаление пересаженной ткани яичника, часть которой была повторно криоконсервирована.

В настоящее время, криоконсервация яичника является экспериментальным методом сохранения фертильности в РФ, с рядом ограничений. Одним из основных ограничений применения технологии аутотрансплантации яичниковой ткани является высокий риск метастазирования опухолевых клеток в яичники, имеющий место при многих онкологических заболеваниях, в том числе органов репродуктивной системы [64]. Например, исследования овариальной ткани у пациенток с острой формой лейкоза методом ПЦР показали, что раковые клетки обнаруживаются до 50% образцов ткани яичника, что может привести к рецидиву заболевания.



## 1.6. Дозревание ооцит-кумулюсных комплексов *in vitro*, выделенных из ткани яичников

Технологию криоконсервации овариальной ткани можно использовать совместно с технологией дозревания ооцит-кумулюсных комплексов (ОКК) *in vitro*, выделенных из ткани яичников (ОТО IVM – *in vitro* maturation ovarian tissue oocytes). Незрелые ОКК можно извлекать из видимых антральных фолликулов ткани яичника, затем дозревать в условиях *in vitro* до стадии МII и криоконсервировать путем витрификации [47] или оплодотворить биологическим материалом партнера или донора. Технология дозревания ооцитов *in vitro* (IVM), полученных после овариэктомии у онкологических пациентов, является достаточно молодой. Программа IVM представляет собой вспомогательную репродуктивную технологию, во время которой происходит индукция мейотического созревания ооцитов от стадии профазы I до стадии метафазы II в условиях *in vitro* [65]. Первые данные об этой технологии были опубликованы в 2003 году, когда Ревел с соавторами получили антральные фолликулы из яичника «*ex vivo*» [65]. Последующие работы выявили, что из ткани яичника после овариэктомии можно получить достаточное количество незрелых ооцитов, которое может достигать 174 единиц [66,67]. Стандартные протоколы дозревания IVM основаны на культивировании ооцит-кумулюсных комплексов в среде, обогащенной гормонами ФСГ, ЛГ и/или ХГЧ, и не менялись за последние 25 лет [68].

Сбор яйцеклеток, полученных «*ex vivo*» является предпочтительным по сравнению со сбором «*in vivo*», чтобы избежать возможности миграции раковых клеток в прилежащие ткани. Витрифицированные ооциты могут быть непосредственно использованы позже для ЭКО и переноса эмбрионов без какого-либо риска передачи заболевания.

Существующие данные указывают на то, что дети, рожденные после процедуры IVM имеют нормальный кариотип, нормальный вес и развитие до 2 лет [65] и не имеют серьезных пороков развития [68]. Впервые *in vitro*

дозревание ооцитов из яичниковой ткани было зарегистрировано в 2003 году [69]. Данный метод сохранения фертильности может быть полезным для пациентов с гинекологическим раком, которым планируется проведение овариэктомии в ходе хирургического этапа лечения. Технология ОТО IVM является самым безопасным вариантом сохранения генетического материала для пациентов с раком яичников, поскольку пункция яичников при этом заболевании с любой целью запрещены и может привести к диссеминации и повышению стадии заболевания [70]. Первое живорождение после проведения *in vitro* дозревания ооцитов, полученных из ткани яичника, было зарегистрировано в 2013 году после переноса двухдневного эмбриона через 14 месяцев после проведения овариэктомии [71]. У 21-летней пациентки была диагностирована микропапиллярная серозная карцинома яичника и после рецидива, была проведена овариэктомия коллатерального яичника с проведением *in vitro* дозревания ооцитов, полученных *ex vivo*. В результате, из 4 незрелых ооцитов было криоконсервировано 3 двухдневных эмбриона. Через год было достигнуто еще 2 беременности с использованием программы IVM [72,73]. Эти случаи показывают эффективность проведения программы IVM у пациенток с онкологическими заболеваниями органов репродуктивной системы.

Немаловажно проводить биопсию трофэктодермы полученных эмбрионов для проведения преимплантационного генетического тестирования (ПГТ-А) методом NGS после *in vitro* дозревания ооцит-кумулюсных комплексов. Это возможно при формировании бластоцисты 5-7 суток развития. Так, мы опубликовали сообщение о формировании трех бластоцист у 30-летней пациентки с раком молочной железы стадии T1N1M0 без выявления патогенных BRCA-мутаций [74]. Программой сохранения фертильности была выбрана комбинация из проведения *in vitro* дозревания полученных ооцит-кумулюсных комплексов и криоконсервации ткани яичника перед проведением химиотерапии. Была проведена односторонняя овариэктомия и получено 33 незрелых ооцит-кумулюсных комплексов из

мозгового слоя яичника. После созревания было получено 12 ооцитов на стадии МП (36,4%), которые были оплодотворены спермой мужа методом ИКСИ. В результате, было получено 3 бластоцисты (5AA, 3CC, 5BB) и выполнена биопсия трофэктодермы с проведением ПГТ-А. Все 3 бластоцисты оказались эуплоидными и пригодными для переноса в полость матки. Это исследование является первым, которое демонстрирует возможность получения эуплоидных эмбрионов из незрелых ооцитов ткани яичника. Также, данное сообщение является первым о криоконсервации эуплоидных бластоцист, после *in vitro* созревания ооцитов, полученных *ex vivo*.

Технологию созревания ооцит-кумулюсных комплексов, выделенных из ткани яичников, в ряде случаев, возможно совмещать с методом криоконсервации овариальной ткани. Именно о такой комбинации сообщает Сегерс и соавт. в своем исследовании, демонстрирующее живорождения после проведения программ сохранения фертильности у онкологических пациенток, с помощью программ *in vitro* созревания ооцитов из ткани яичника в сочетании с криоконсервацией яичниковой ткани [75]. Программы проводились 77 пациенткам, каждой из которых была произведена односторонняя овариэктомия и лишь у двух ткань не была криоконсервирована в связи с поражением опухолью яичника. В результате, получено 1220 незрелых ооцит-кумулюсных комплексов, у 64 женщин криоконсервировано  $6,7 \pm 6,3$  ооцитов на каждую. У 13 пациенток произведено оплодотворение методом ИКСИ и у 10 криоконсервировано в среднем  $2,0 \pm 2,0$  эмбриона на каждую. В результате, 12 (17%) женщин вернулись в клинику для решения вопроса рождения ребенка после гонадотоксичного лечения, и у трех программа сохранения фертильности завершилось живорождением трех здоровых младенцев.

Таким образом, технология *in vitro* созревания ооцитов, полученных из ткани яичника может проводиться в качестве экспериментальной процедуры сохранения фертильности [41].

Важно принимать во внимание сохранение фертильности у женщин, страдающих онкологическими заболеваниями органов репродуктивной системы. Данная патология может привести таких пациентов к хирургическому бесплодию, преждевременному истощению фолликулярного аппарата яичников после лучевой или химиотерапии. В итоге, к невозможности реализовать свою репродуктивную функцию. Это зачастую приводит к психоэмоциональным расстройствам и нежеланию бороться за излечение заболевания, под названием «рак». Несомненно, в помощь онкологическим пациентам необходимо приложить совместные усилия специалистам из области онкологии, гинекологии и репродукции, с привлечением и других междисциплинарных специалистов.

Современные методы сохранения фертильности внушают чувство оптимизма и доверия на основе экспериментальных технологий, которые продолжают разрабатываться специалистами со всего мира. Золотым стандартом сохранения фертильности является криоконсервация ооцитов или эмбрионов после контролируемой стимуляции суперовуляции. Однако, такой подход не может быть предложен пациентам с эстроген зависимыми опухолями.

В случае, когда данный метод не может быть использован определенной группе пациентов, могут быть предложены программы ОТО IVМ и криоконсервации овариальной ткани. Данные методы в ряде стран уже не являются экспериментальными и вошли в стандартную клиническую практику.

Однако большое беспокойство вызывает вопрос безопасности последующей реимплантации фрагментов ткани яичника, в связи с этим, криоконсервация овариальной ткани подходит не всем пациентам с онкологическими заболеваниями. Альтернативным методом современного подхода к сохранению фертильности может являться технология *in vitro* дозревания ооцитов, а в ряде случаев, комбинация этих двух методов, что

может обеспечить не только реализацию репродуктивной функции, но и повысит дальнейшее качество социальной жизни молодых пациенток.

Сообщается о шести беременностях после проведения программы *in vitro* дозревания ооцитов из ткани яичника, 5 из которых закончились живорождением [71-75].

Доннез и соавт. сообщают о первом живорождении после аутотрансплантации яичниковой ткани в 2004 году [76] и с тех пор проведено множество исследований, в которых сообщалось об успешной беременности после трансплантации ткани яичника [76-80]. По данным на 2018 год, было зарегистрировано минимум 87 живорождений в результате криоконсервации и аутотрансплантации яичниковой ткани [63,81]. Частота наступления беременности после аутотрансплантации криоконсервированной ткани на ортотопических участках оценивается примерно в 30% [84]. Это показывает, что криоконсервация ткани яичника и последующая аутотрансплантация являются многообещающим методом сохранения фертильности, который позволяет женщинам, страдающим раком, родить здорового ребенка после выздоровления. Безопасность трансплантации ткани яичников имеет первостепенное значение для молодых онкологических больных, и необходимо соблюдать большую осторожность. Особенно это актуально при раке яичников, когда риск включает не только повторное внедрение злокачественных клеток, но и развитие основного заболевания в ткани после трансплантации [77]. В литературе сообщалось о двух беременностях после трансплантации размороженной ткани яичников у больных раком яичников [62,63]. В обоих случаях пересаженная ткань яичника была удалена вскоре после родов по соображениям безопасности. Та же стратегия может быть предложена пациентам с ПОЯ.

Помощь женщинам с онкологическими заболеваниями органов репродуктивной системы заключается в грамотном и персональном выборе методов сохранения фертильности для каждого индивидуального случая. Данный обзор литературы демонстрирует вариации методов сохранения

фертильности у женщин с гинекологическим раком. Каждый из этих методов потенциально может привести к рождению здорового ребенка. Для достижения сохранения генетического материала у онкологических пациентов требуется комплексная работа различных специалистов, в частности, в области онкологии, репродукции, а также психологии.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Материалы исследования

С целью исследования и поставленными для ее достижения задачами, на базе отделения инновационной онкологии и гинекологии (руководитель – Хабас Г.Н.) ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (директор – академик РАН Сухих Г.Т.), в период с сентября 2018 по декабрь 2021 гг. осуществлялся набор пациенток, которые желали реализовать репродуктивный потенциал после хирургического лечения основного онкологического заболевания. Клинико-анамнестический сбор данных и клинико-инструментальное обследование с дальнейшим наблюдением пациенток проводилось на базе 1-го гинекологического отделения Центра (руководитель отделения – д.м.н. Гависова А.А.).

Для решения вышеизложенных задач было проведено проспективное (для клинических и лабораторных исследований) и ретроспективное (для выявления факторов риска) исследование.

В соответствии с заданными критериями включения, с сентября 2018 по декабрь 2021 года в исследование были включены 120 пациенток, с различными видами и стадиями онкологических заболеваний органов репродуктивной системы, желающих реализовать репродуктивную функцию. Все пациентки подписали информированное добровольное согласие на участие в исследовании. Диссертационная работа была одобрена комиссией по этике биомедицинских исследований при ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» МЗ РФ (протокол № 11 от 13.12.2018).

Для решения задач 1,2 – изучить особенности репродуктивного анамнеза, овариального резерва у пациенток с онкологическими заболеваниями органов репродуктивной системы – было включено 120 пациенток.

Для решения задач 3,4 - пациентки были поделены на две группы для определения особенностей *in vitro* дозревания ооцитов, полученных из удаленного яичника и оценки эффективности и безопасности исследуемой технологии IVM путем анализа эмбриологических параметров IVF и оценки молекулярного кариотипа полученных эмбрионов.

- 1 группа – пациентки с пораженными яичниками (n=83)
- 2 группа – пациентки с яичниками без поражения (n=37)

В зависимости от полученных результатов, было выделено 2 группы пациентов: 1 – успешное завершение программы ОТО IVM с криоконсервацией зрелых ооцитов или эмбрионов, 2 – безуспешная программа ОТО IVM, в ходе которой, криоконсервация генетического материала не произведена.

На первом этапе были проанализированы клиничко-анамнестические данные 120 пациенток и их влияние на развитие онкологического заболевания. Все пациенты были направлены онкогинекологом на консультацию к врачу-репродуктологу с целью сохранения генетического материала и выбора тактики реализации репродуктивного потенциала перед оперативным лечением.

На втором этапе оценивалась прогностическая значимость плотности фолликулов на гистологических срезах в зависимости от клиничко-анамнестических особенностей пациенток.

На третьем этапе оценивались особенности *in vitro* дозревания ооцитов и предикторы программы IVF в зависимости от клиничко-анамнестических и клиничко-лабораторных показателей пациенток.

На четвертом этапе исследования, основываясь на полученные данные, были разработаны клиничческие рекомендации и алгоритм ведения пациенток с онкологическими заболеваниями, желающих реализовать репродуктивный потенциал после проведения основного лечения.



**Первичные конечные точки:**

- возраст
- индекс массы тела (ИМТ)
- локализация развития онкологического заболевания
- характеристика онкологического заболевания (стадия, степень распространения, гистологически верифицированный тип заболевания)
- гинекологические заболевания в анамнезе
- оперативные вмешательства на органах малого таза в анамнезе
- оперативные вмешательства на яичниках в анамнезе (овариэктомия, резекция яичников)
- уровень овариального резерва – количество антральных фолликулов (КАФ), уровень антимюллера гормона (АМГ)

**Анализируемые исходы программы IVМ:**

- число полученных ооцит-кумулюсных комплексов (ОКК)
- частота дозревания ооцитов до стадии МII
- частота оплодотворения
- частота дробления
- частота бластуляции
- число криоконсервированных ооцитов
- число криоконсервированных эмбрионов
- морфологическая оценка эмбрионов
- результаты ПГТ-а
- плотность фолликулов на гистологических образцах при криоконсервации ткани яичника

**Критерии включения в исследование:**

- Возраст: 15 – 43 года;

- Рак эндометрия I-IIIc стадий (классификация FIGO, TNM);
- Рак шейки матки I-IIIb стадий;
- Рак яичников I –IV стадий;
- Пограничные опухоли яичников: I – IIIc стадий или рецидивирующие;
- Саркомы матки: эндометриальная стромальная, лейомиосаркома;
- Информированное согласие на участие в исследовании;

#### **Критерии невключения в исследование:**

- Возраст > 43 лет
- Уровень ФСГ  $\geq 18$  МЕ/мл;
- Опухоли яичников больших размеров > 6 см в максимальном измерении;
- Преждевременная недостаточность яичников;
- Наличие хромосомных нарушений в кариотипе, генетические аномалии;

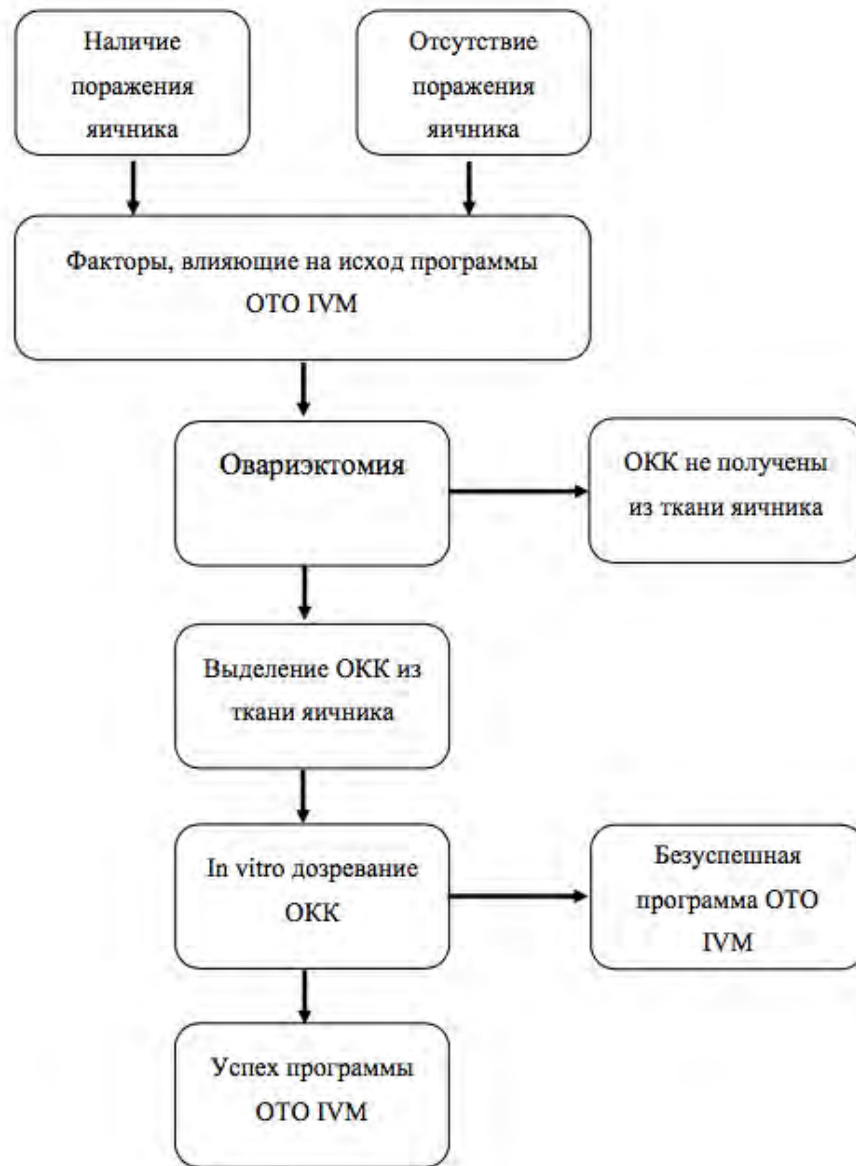
Пациентки с онкологическим заболеванием органов репродуктивной системы в соответствии с федеральными руководствами и алгоритмами, существующими в ФГБУ «НМИЦ АГП имени акад. В.И. Кулакова» МЗ РФ проходили стандартные методы клинико-лабораторного и инструментального обследования.

### **Дизайн исследования**

#### **Дизайн исследования для задачи №1**

Ретроспективное исследование случай-контроль.

Объем выборки в данном исследовании составляет 120 пациентов и определяется на основе изучаемых особенностей репродуктивного анамнеза, овариального резерва у пациенток с онкологическими заболеваниями органов репродуктивной системы.



**Рисунок 1.** Дизайн исследования для задачи №1

**Факторы, влияющие на исход программы ОТО IVМ:**

- Оперативные вмешательства на органах малого таза в анамнезе;
- Возраст пациенток (14-36 лет; 37-43 года);
- Уровень АМГ в сыворотке крови;
- Количество антральных фолликулов в яичниках;
- Хирургические вмешательства на яичниках в анамнезе;
- Индекс массы тела;
- Уровень СА-125 у пациенток с поражением яичников;

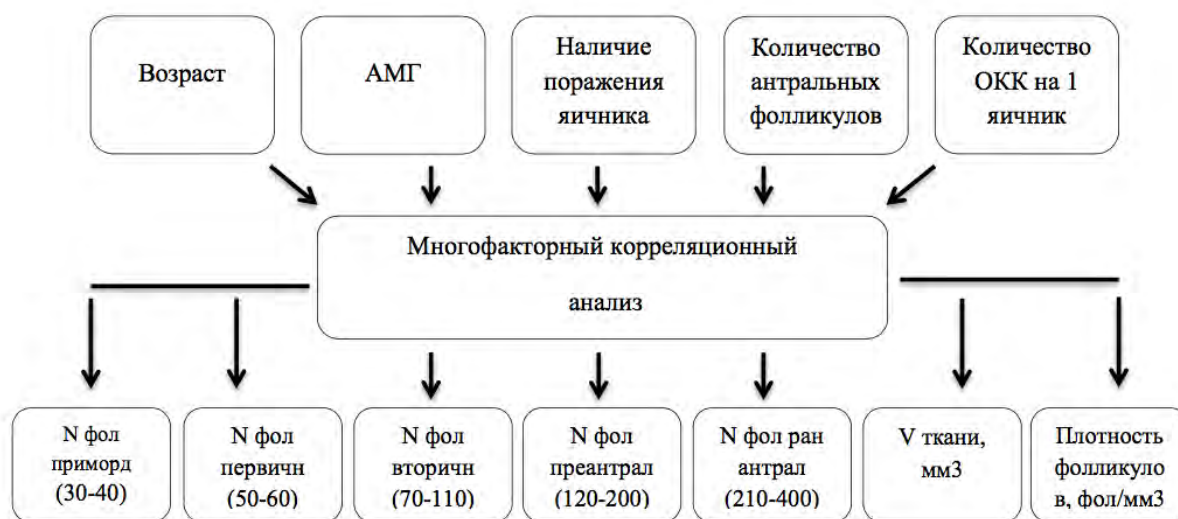
- Наследственная предрасположенность к онкологическим заболеваниям;
- Наличие беременностей и родов в анамнезе;
- Наличие бесплодия в анамнезе.

Конечная точка исследования: ОШ успеха программы ОТО IVF, а именно получение зрелых ооцитов (МП), в зависимости от факторов, влияющих на исход.

### Дизайн исследования для задачи №2

Проспективное исследование случай-контроль.

Оценить зависимость параметров пула фолликулов от клиничко-анамнестических особенностей пациентки.



**Рисунок 2.** Дизайн исследования для задачи №2

Конечная точка исследования: ОШ исходов программы IVF в зависимости параметров пула фолликулов от клиничко-анамнестических данных пациенток.

### Дизайн исследования для задачи №3.

Проспективное исследование случай-контроль.

Определить особенности *in vitro* дозревания ооцитов, полученных ткани удаленного яичника.



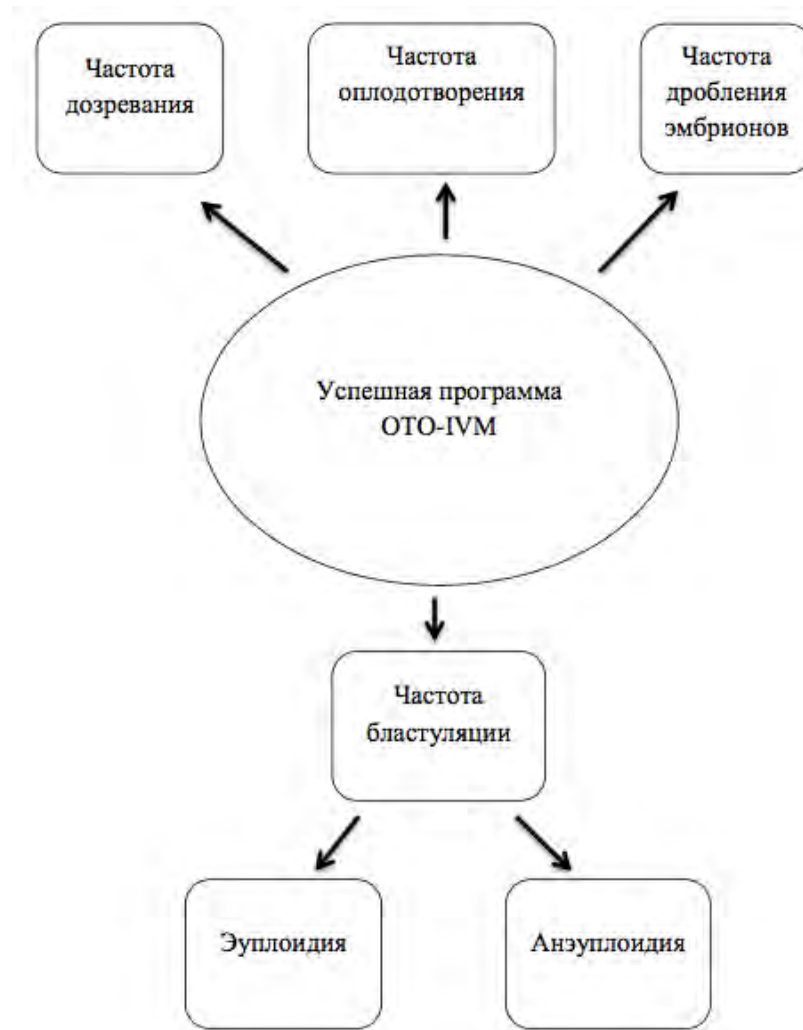
### Рисунок 3. Дизайн исследования для задачи №3

Конечная точка исследования: ОШ дозревания незрелых ооцит-кумулюсных комплексов, полученных из ткани яичника, в зависимости от клинико-anamнестических и клинико-лабораторных данных пациенток.

### Дизайн исследования для задачи №4.

Проспективное исследование случай-контроль.

Оценить эффективность исследуемой технологии IVМ путем анализа эмбриологических параметров полученных эмбрионов.



**Рисунок 4.** Дизайн исследования для задачи 4

\*Особенности оогенеза полученных ооцитов:

- частота дозревания ОКК до стадии МП
- частота оплодотворения

\*\*Особенности эмбриогенеза оплодотворенных ооцитов:

- частота дробления эмбрионов
- частота бластуляции
- процент эмбрионов хорошего и отличного качества
- процент эуплоидных бластоцист

Конечная точка исследования: ОШ криоконсервации генетического материала и развития эуплоидных бластоцист на основании эмбриологических параметров.

## **2.2. Методы исследования**

### **2.2.1. Общеклинический этап**

На первичном этапе пациенты были консультированы врачом-онкологом для определения тактики и метода лечения основного заболевания. Перед проведением основного лечения, пациентки были направлены на консультацию в врачу-репродуктологу для определения метода и целесообразности сохранения генетического материала. Пациенткам было проведено общее физикальное и гинекологическое обследование: выполнено УЗИ малого таза с морфометрией антральных фолликулов, выявлены значения половых гормонов (ЛГ, ФСГ, АМГ, эстрадиол).

#### **Обязательные исследования:**

- Общее и специальное гинекологическое обследование;
- Ультразвуковое исследование органов малого таза;
- Анализ крови на антитела к ВИЧ, HBsAg, анти-HCV, реакция Вассермана;
- Исследование на флору цервикального канала и степень чистоты влагалища;
- Цитологическое исследование мазов шейки матки;
- Группа крови, резус-фактор;
- Заключение терапевта о состоянии здоровья;
- Заключение онколога о предстоящем лечении.

#### **Исследования по показаниям:**

- Гормоны крови (на 2-3 день менструального цикла): ЛГ, ФСГ, эстрадиол;
- Анализ на онкомаркеры: РЭА, СА-19-9, СА 125, СА 72-4, SCC, антиген HE4;

- Кровь на мутации генов BRCA I, II;
- Исследование цервикального мазка на инфекции методом ПЦР: Chlamydia trachomatis, Mycoplasma hominis и genitalium, Ureaplasma urealyticum, HSV, CMV;
- Микробиологическое исследование отделяемого влагалища и цервикального канала;
- Анализ крови на IgG+IgM к HSV, CMV, Toxoplasma gondii, Rubella;
- УЗИ молочных желез;
- УЗИ щитовидной железы;
- МРТ органов малого таза;
- Заключение других специалистов.

#### **Специальные методы исследования**

- Оценка овариального резерва (уровень антимюллерового гормона (АМГ) в крови), КАФ в лечебном цикле;
- Преимплантационное генетическое тестирование эмбрионов на анеуплоидии (NGS, секвенирование высокого разрешения);
- Спермограмма супруга (партнера);
- Морфологическое исследование яичника для оценки плотности фолликулов на гистологических срезах.

#### **2.2.2. Хирургический этап**

Выбор оперативного доступа осуществлялся в зависимости от нозологической формы онкологического заболевания, предполагаемого объема оперативного вмешательства, определяемого гистологическим типом опухоли и распространенности процесса.

Так, при пограничных опухолях яичников проводилось органосохраняющее лечение в объеме резекции пораженного яичника (ультраконсервативное лечение), однако в ряде случаев проводилась



односторонняя аднексэктомия со стороны яичника, имеющего образование больших размеров, с резекцией или биопсией второго яичника.

В случае верификации начального рака яичников (муцинозного, эндометриодного, серозного, low grade гестатипов IA-IC1 ст. несветлоклеточного типа) при желании пациенток сохранить фертильность, при возможности проводилась органосохраняющее лечение согласно международным стандартам лечения (FSS) в объеме - односторонняя аднексэктомия с резекцией коллатерального яичника и проведением процедуры перитонеального и забрюшинного хирургического стадирования (мультифокальной биопсии брюшины, оментэктомии, тазовой и поясничной лимфаденэктомией). При двустороннем поражении обоих яичников злокачественными новообразованиями (IB ст.), выполнялось билатеральная аднексэктомия с сохранением матки для реализации в дальнейшем репродуктивной функции.

При распространенных стадиях заболевания (рак яичников, рак тела матки, рак шейки матки), в большинстве случаев, выполнение органосохраняющего лечения не представлялось возможным. Таким образом, проводились циторедуктивные операции в объеме гистерэктомии с придатками и хирургического стадирования, с взятием биологического материала на программу ОТО IVF.

Согласно нозологическим формам, всем пациенткам было проведено хирургическое лечение с одно- или двусторонней овариэктомией. Удаленный яичник извлекался через брюшную полость в случае лапаротомического хирургического доступа. Под контролем лапароскопии яичники извлекались через троакарное отверстие с помощью стерильного мешочка, либо через влагалище одномоментно с маткой в зависимости от объема операции (рак эндометрия, рак шейки матки).

### 2.2.3. Эмбриологический этап

Работа эмбриолога складывалась из нескольких этапов, первым из которых являлась заблаговременная подготовка сред (за 24 часа) и расходных материалов до планируемой работы с яичником.

В ходе лапароскопической операции производилась односторонняя или двусторонняя овариэктомия. Препарирование макропрепарата, поиск и извлечение из яичника ОКК занимают приблизительно 1,5 ч и требуют определенных навыков. Извлеченную овариальную ткань помещали в буферный раствор (Ооклин) и транспортировали в стерильном контейнере в эмбриологическую лабораторию в течение 15 мин (при 37°C). Все видимые антральные фолликулы (более 2 мм в диаметре) аспирировали при помощи одноразового стерильного шприца объемом 10 мл с размером иглы 21G. Фолликулярную жидкость помещали в чашку Петри со средой для манипуляций с гаметами Ооклин (Панэко, Россия) и оценивали на наличие ооцит-кумулюсных комплексов (ОКК) под стереомикроскопом в условиях подачи ламинарного потока воздуха и подогреваемой поверхности (37 С). Около 5% нативной овариальной ткани фиксировали с применением 3% раствора формалина для дальнейшего гистологического исследования. Яичник освобождали от связок, рассекали пополам с помощью скальпеля, после этого корковый слой яичника отделяли от мозгового. В процессе препарирования коркового слоя происходило выделение ОКК из антральных фолликулов. Мозговой слой дополнительно измельчали, большие кусочки ткани яичника удаляли из чашки Петри, а среду, в которой проводились манипуляции, оценивали на наличие ОКК. Строго документировалось время, прошедшее от овариэктомии до окончания выделения ОКК. Все полученные ОКК культивировали в четырех-луночных планшетах (до 7 ОКК в лунке) в среде для дозревания ооцитов (SAGE, CooperSurgical) с добавлением 0,75 МЕ/мл менопаузального гонадотропина человека (Менопур, Ферринг) и 20% сывороточного альбумина человека (Альбурекс, Беринг) при 37°C в

атмосфере 6% CO<sub>2</sub> и 5% O<sub>2</sub>. Через 48 ч культивирования ОКК помещали в 80 ЕД/мл раствор гиалуронидазы (Origio, CooperSurgical) и аккуратно пипетировали для удаления кумулюсных клеток. Зрелость яйцеклеток оценивали по морфологическим признакам, а именно наличие первого полярного тельца.

Полученные ооциты оценивались по следующей шкале:

МII ооцит – зрелая гаплоидная (n) яйцеклетка на стадии мейоза метафаза II. Четко различается одно полярное тельце;

MI ооцит – незрелый ооцит на стадии мейоза метафаза I. Не видно ни полярного тельца, ни ядра;

GV – герминальный везикул – незрелая диплоидная (2n) яйцеклетка. GV характеризуется наличием видимого большого ядра, содержащего 1-2 нуклеоли, отсутствие полярного тельца.

Полученные незрелые ооциты возвращали в среду для дозревания еще на 24 ч. Зрелые яйцеклетки криоконсервировали с применением стандартного протокола витрификации (Kitazato, Япония). При наличии добровольного информированного согласия пациентки на оплодотворение зрелых ооцитов спермой партнера или анонимного донора оплодотворение проводили методом интрацитоплазматической инъекции сперматозоида (ICSI). Через 16-18 часов оценивали оплодотворение по наличию двух четко различимых пронуклеусов (2PN), и выделение второго полярного тельца (2PB), что свидетельствует о нормально оплодотворившемся ооците. Аномально оплодотворившиеся ооциты (содержащие 3 и более PN подлежали утилизации).

Морфологическая оценка гамет и эмбрионов производилась в соответствии со следующими критериями:

- Оценка спермы – по критериям ВОЗ, 2011.
- Оценка ооцитов – методом световой микроскопии с учетом морфологических особенностей и аномалий развития.

- Оценка эмбрионов – на стадии бластоцисты согласно классификации Гарднера (2000).

Культивирование эмбрионов со стадии зиготы до стадии бластоцисты (5-е и 6-е сутки развития) проводили в одношаговой среде G-TL (Vitrolife), под слоем минерального масла Ovoil (Vitrolife), в инкубаторе при 37°C, 6% CO<sub>2</sub> и 5% O<sub>2</sub>. Качество эмбрионов оценивали на 5 и 6-й дни культивирования.

Оценка эмбрионов 5-го дня осуществляется согласно классификации Gardner D.K. и Schoolcraft W.B. [83].

Стадии развития бластоцисты:

- 0 – эмбрион, замерший на стадии дробления.
- 1 - Ранняя бластоциста: бластоцель составляет менее 50% от объема всей бластоцисты.
- 2 - Ранняя бластоциста: бластоцель составляет 50-80% объема всей бластоцисты.
- 3 - Полностью развитая бластоциста, большая бластоцель.
- 4 - Экспандированная бластоциста - более чем полностью развитая бластоциста, zona pellucida (ZP).
- 5 - Бластоциста, начавшая хетчинг, то есть трофэктодерма бластоцисты начинает прорывать ZP.
- 6 - Бластоциста, закончившая хетчинг, то есть полностью вышедшая из ZP.

Внутриклеточная Масса (ВКМ):

- A - Плотное упакованное большое количество клеток.
- B - Свободно сгруппированное небольшое количество клеток.
- C - Очень мало клеток или практически не определяется.

Трофэктодерма (ТФЭ):

- A - Много клеток, регулярное строение.
- B - Немного клеток, нерегулярное строение.
- C - Очень мало клеток и поврежденные клетки.

Биопсию трофэктодермы проводили всем пригодным эмбрионам для данной манипуляции с целью последующего преимплантационного генетического тестирования на анеуплоидии. Генетический анализ образцов трофэктодермы проводился методом высокопроизводительного секвенирования (NGS) с использованием Ion ReproSeq PGS Kit (Thermo Fisher Scientific, США) согласно инструкции производителя. Выявление анеуплоидий было произведено с помощью генетического анализатора Applied Biosystems 3130 (4-capillary). Бластоцисты криоконсервировали на индивидуальных носителях с нумерацией соответствующей биоптатам и применением набора для витрификации (Kitazato). Корковый слой яичника нарезают квадратами со стороной 0,5 см и толщиной около 1 мм на подогреваемой поверхности (37 C) в растворе с буферным раствором. Фрагменты перемещали и эквilibрировали в растворе криопротекторов (1,5 М этиленгликоль и 0,1 М сахароза) в течение 20 минут на льду, затем помещали в криопробирки (по 4 фрагмента в каждую пробирку). Корковый слой отделяли на гистологическое исследование с целью определения плотности фолликулов в образце ткани и замораживали с использованием медленного протокола криоконсервации в программируемом замораживателе (Kryo 360 — 1.7, Planer PLC). При формировании образцов с криоматериалом, создавали один образец для контрольного исследования, с целью определения жизнеспособных образцов ткани яичника в случае аутологической ретрансплантации ткани. В ходе исследования оценивали частоту дозревания ооцитов, частоту оплодотворения, дробления и формирования бластоцист. Кроме того, оценивали морфологические особенности зрелых ооцитов и частоту встречаемости отдельных цитоплазматических и экстрацитоплазматических дисморфизмов.

#### **2.2.4. Гистологический этап**

Подготовка образцов, приготовление гистологических срезов и их окрашивание были выполнены специалистами 1-го Патологоанатомического

отделения ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Подсчёт плотности фолликулов проводился согласно методике McLaughlin et al. (McLaughlin и др., 2015) на гистологических срезах, окрашенных гематоксилин-эозином.

Из фрагментов ткани кортекса яичника были сделаны серийные срезы толщиной 6 микрометров. Для каждого образца был проанализирован объём ткани, равный примерно 1мм<sup>3</sup>. Необходимое число срезов рассчитывалось индивидуально для каждого образца по следующей формуле согласно модели, предложенной McLaughlin и др.:

$$N=V/(t*S),$$

где N - число срезов, V - объём ткани, t - толщина среза, и S - площадь среза. Так как V = 1000 мкм, t = 6 мкм, то формула была приведена к виду

$$N=167/S.$$

Полученные серийные срезы были отсканированы в программе Aperio Scanscope (Leica Biosystems, United States), и дальнейшие подсчёты площади срезов и числа фолликулов проводились в программе Aperio ImageScope (Leica Biosystems, United States).

Число фолликулов и площадь среза были подсчитаны на каждом срезе. Во избежание повторного подсчёта фолликулов учитывали только те фолликулы нормальной морфологии, в ооцитах которых визуализировалось ядро с ядрышком. Критериями нормальной морфологии фолликула были: ооцит сферической формы, без искривлений; ядро в профазе I мейоза (зародышевый пузырь), расположенное центрально относительно плазматической мембраны клетки; отсутствие разрывов в оолемме, <10% пикнотизированных клеток гранулёлы (Anderson и др., 2014). Анализ распределения фолликулов по стадиям развития осуществлялся по их диаметру: фолликулы диаметром 30-40 мкм считали примордиальными, 50-

60 мкм – первичными, 70-110 мкм – вторичными, 120-200 мкм – преантральными, 210-400 мкм – ранними антральными.

### 2.3. Статистическая обработка полученных данных

Статистическая обработка данных выполнена на индивидуальном компьютере с использованием программы StatSoft Statistica, версия 12. Обработку данных производили общепринятыми методами вариационной статистики. Количественные анамнестические и клинико-лабораторные характеристики тестировались на нормальность распределения с помощью теста Колмогорова-Смирнова. Для характеристик с нормальным распределением были определены: среднее значение и стандартное отклонение. Для характеристик с распределением, отличным от нормального были определены медиана и квартили Q1 (25%) и Q3 (75%). Для качественных данных – частоты (%).

Значимость наблюдаемых различий средних значений и медиан для измеренных количественных параметров оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента (для характеристик с выявленным нормальным распределением), а также с помощью теста Манна-Уитни и критерия Краскелла-Уоллеса (для характеристик с распределением, отличным от нормального). Значимость наблюдаемых различий для качественных параметров оценивалась двухсторонним точным тестом Фишера. Статистически значимыми различия считали при уровне значимости  $p < 0,05$ , при множественных сравнениях применяли поправку Бонферрони ( $p < 0,05/N$ , где  $N$  – количество сравнений).

Для оценки влияния различных факторов на успех программы ВРТ был рассчитан относительный риск и 95% доверительный интервал, проводился бинарный логистический регрессионный анализ. Логистические модели строили для каждой комбинации факторов. Выбор наилучшей модели проводился сравнением значения информационного критерия Акаике (AIC – Akaike information criterion). Выбиралась модель с наименьшим значением AIC. Для уточнения характера и степени влияния различных факторов на

успех программы использовался критерий Хи-квадрат, а также проводился корреляционный анализ (с использованием коэффициентов корреляции Спирмена или Пирсона).



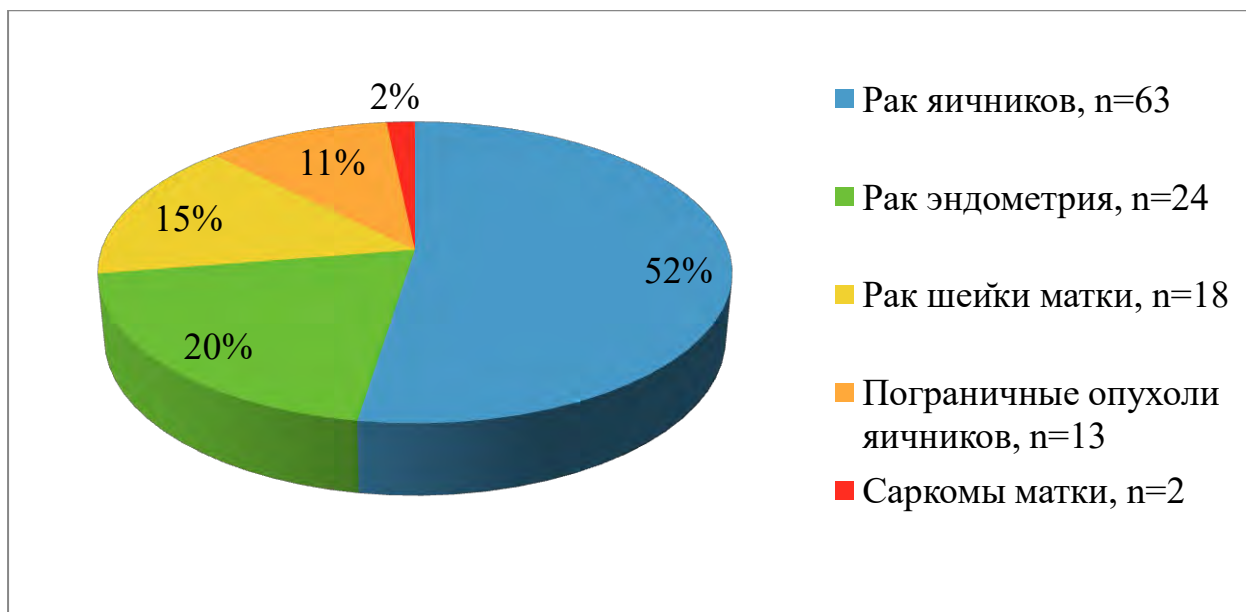
### **Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

В соответствии с целью и задачами исследования, согласно критериям включения, основную группу составили 120 пациенток с диагностированным гинекологическим раком и пограничными опухолями яичников. Средний возраст составил 33 ( $\pm 5,87$ ) года, минимальный – 14 лет, максимальный – 43 года.

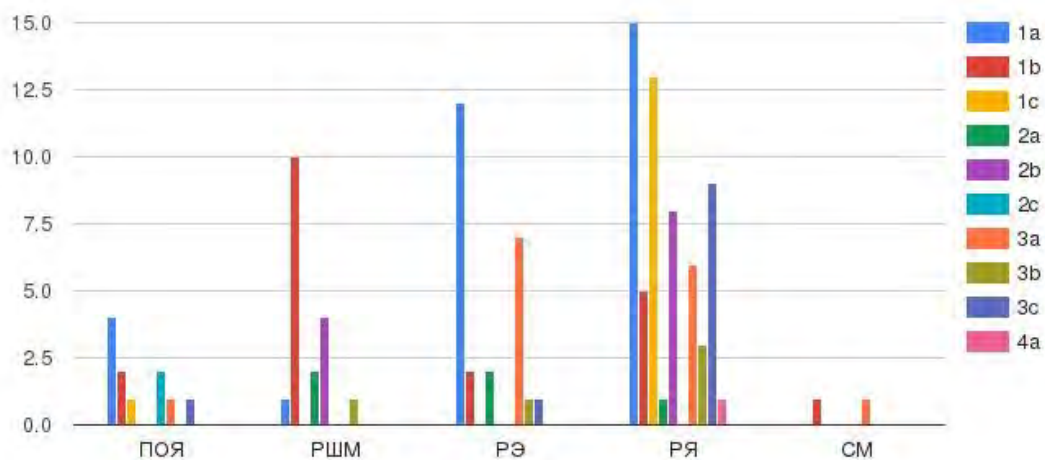
Выборка была разделена на две группы: пациентки с наличием неопластического процесса в яичниках (83/120 пациентки) и без поражения яичников (37/120 пациенток). Исследуемая группа больных имела гинекологические формы рака, а именно рак яичников 59% (63/120), который составил основную часть группы, рецидивирующие пограничные опухоли яичников 17% (13/120), рак шейки матки 15% (18/120), а также гормонозависимый рак матки с инвазией в миометрий 22% (24/120), что не давало использовать другие методы получения и сохранения репродуктивного материала.

#### **3.1. Изучение особенностей репродуктивного анамнеза и овариального резерва, влияющих на получение ОКК из ткани удаленного яичника**

Все пациентки изначально обращались к врачу-репродуктологу после консультации врачом-онкологом. В ходе диагностики и лечения основного заболевания была определена нозологическая форма (рис.5) и стадия заболевания (рис.6), согласно классификации Международной федерации акушеров-гинекологов FIGO (The International Federation of Gynecology and Obstetrics) и международной классификации определения стадий и прогрессирования онкологических заболеваний (TNM – tumor, nodulus, metastasis).



**Рисунок 5.** Распределение пациенток по нозологическим формам (FIGO)



**Рисунок 6.** Распределение пациенток по стадиям онкологических заболеваний (TNM)

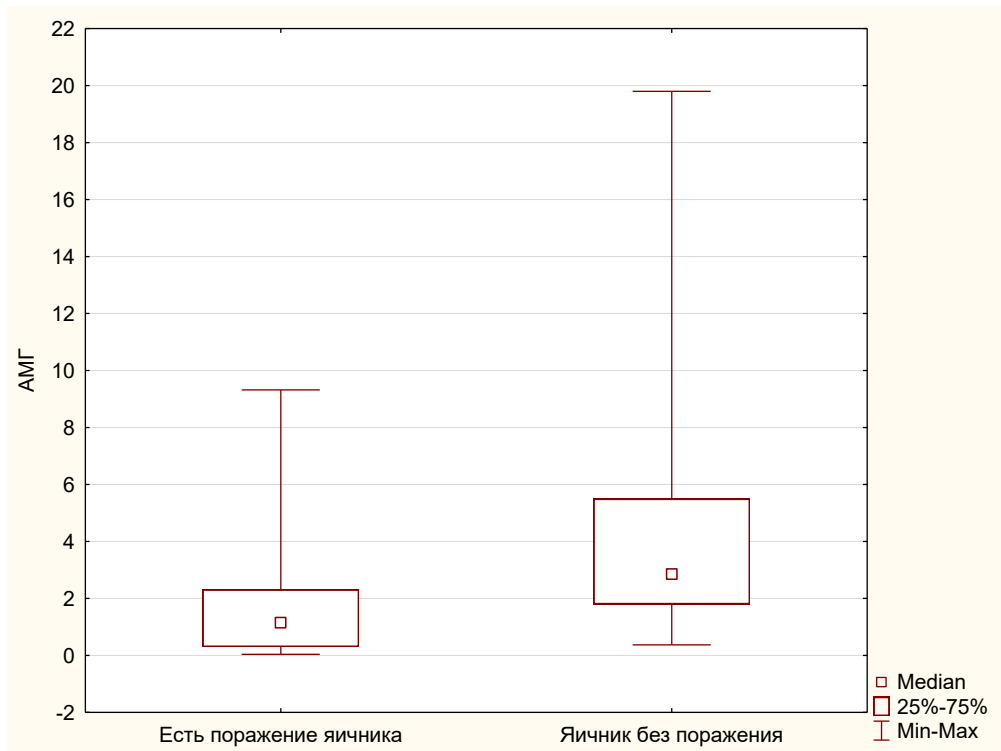
У пациенток с наличием и отсутствием поражения яичников средний возраст и индекс массы тела в двух группах статистически значимо не различался (табл.1).

**Таблица 1. Сравнение количественных анамнестических и клинико-лабораторных характеристик пациенток с поражением и без поражения яичника**

<b>Характеристика</b>	<b>I группа, n=83</b>	<b>II группа, n=37</b>	<b>P*</b>
Возраст	32,69 ( $\pm$ 6,36) N=83	34,11 ( $\pm$ 4,56) N=37	0,168
АМГ	1,09 (0,30; 2,25) N=58	2,40 (1,09; 4,29) N=23	0,003 *
КАФ	3,5 (1,00; 8,00) N=83	9,00 (4,75; 18,50) N=37	<0,001*
ИМТ	22,00 (20,00; 25,00) N=83	24,00 (20,00; 29,00) N=37	0,051

\*t-критерий Стьюдента

Уровень АМГ в сыворотки крови был проанализирован суммарно у 81 пациентки (табл.1) и медианное значение составило 1,41 нг/мл (0,4; 2,79). В группе пациенток с пораженными яичниками уровень АМГ проанализирован у 58 пациенток, медианное значение составило 1,09 нг/мл (0,30;2,25( $p < 0,003$ )) и во второй группе 2,4 нг/мл (1,09;4,29( $p < 0,003$ )) у 23 женщин (рис.5). Данные значения указывают на значительную разницу между показателями АМГ в двух группах, что потенциально может указать на будущий прогноз исхода программы ОТО IVМ.



**Рисунок 7.** Уровень АМГ в двух исследуемых группах

Значения АМГ  $< 2$  нг/мл в группе с пораженными яичниками наблюдалось в 56/83 (67,5 %) случаях и только в 12 /37 (32,4 %) в группе без поражения яичников ( $p=0,016$ ). Относительный риск снижения уровня АМГ при поражении яичников составил  $OR = 2,59$ , 95% Д.И. (1,09 - 6,15).

Количество антральных фолликулов (КАФ) в яичниках подсчитывалось индивидуально у каждой пациентки при помощи УЗ-диагностики накануне хирургического лечения и предстоящей овариэктомии. Среднее количество в двух исследуемых группах составило  $9 (\pm 13,63)$  антральных фолликулов в яичниках (табл.1), однако в группе с поражениями яичников отмечается резкое снижение и медианное значение составило 3,5 (1,00; 8,00 ( $p < 0.001$ )), нежели в группе с интактными яичниками, где КАФ составило 9,00 (4,75; 18,50 ( $p < 0.001$ )).

Уровень онкомаркера СА-125 в сыворотке крови был измерен у 56 пациенток и лишь 3 из них (5,3%) составили группу с интактными яичниками, поэтому сравнения по этому параметру не проводилось. Несмотря на то, что основную часть женщин с измеренным онкомаркером

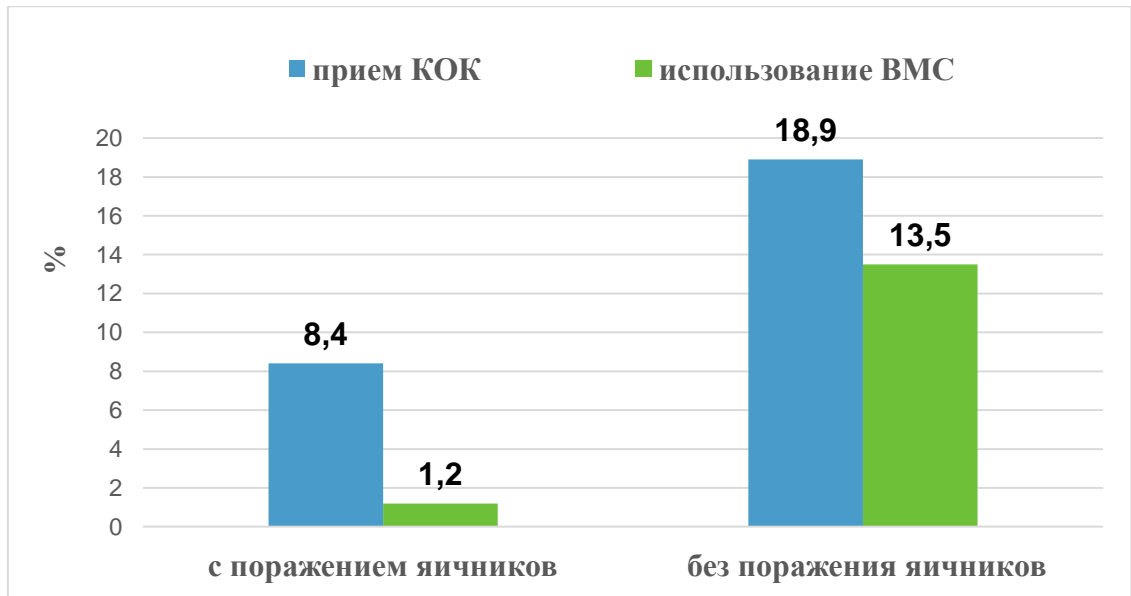
составили пациентки с раком яичника, уровень СА-125 был выше нормативных значений (<35 Ед/мл) у 32/56 (57%) пациенток.

**Таблица 2. Сравнение анамнестических характеристик пациенток в двух группах женщин**

	<b>I группа</b>	<b>II группа</b>	<b>P*</b>
Социальный статус (мужа/половой партнер)	37/83 (44,6 %)	20/37 (54,1 %)	0,3377
Вредные привычки	6/83 (7,2 %)	4/37 (10,8 %)	0,5410
Наследственность к онкозаболеваниям	31/83 (37,3 %)	9/37 (24,3 %)	0,1428
Прием КОК в анамнезе	7/83 (8,4 %)	7/37 (18,9 %)	0,1438
Использование ВМС в анамнезе	1/83 (1,2 %)	5/37 (13,5 %)	0,0343
Наличие беременностей в анамнезе	39/83 (47 %)	21/37 (56,8 %)	0,3217
Наличие родов в анамнезе	18/83 (21,7 %)	6/37 (16,2 %)	0,4708

\* $\chi^2$ -тест

Наследственная предрасположенность к онкологическим заболеваниям чаще наблюдалась в группе с поражением яичников (табл.2), однако статистически значимых различий между группами не выявлено ( $p > 0,05$ ). У 50% (60/120) женщин в анамнезе была беременность, большинство из этих женщин предпочли прервать беременность по своему желанию в силу вынужденных обстоятельств, не связанных с основным заболеванием, лишь у 20% (24/120) женщин родились дети. Преобладающее число женщин 52,5% (63/120) на момент исследования были одиночками и им было предложено воспользоваться спермой анонимного донора для оплодотворения полученных ооцитов, однако все пациентки отказались и приняли решение криоконсервировать собственный генетический материал. Это желание было связано с возможным изменением социального статуса и будущим замужества. Также, часть женщин, которым предстояла гистерэктомия, желали воспользоваться программой суррогатного материнства в будущем после прохождения реабилитационного периода.



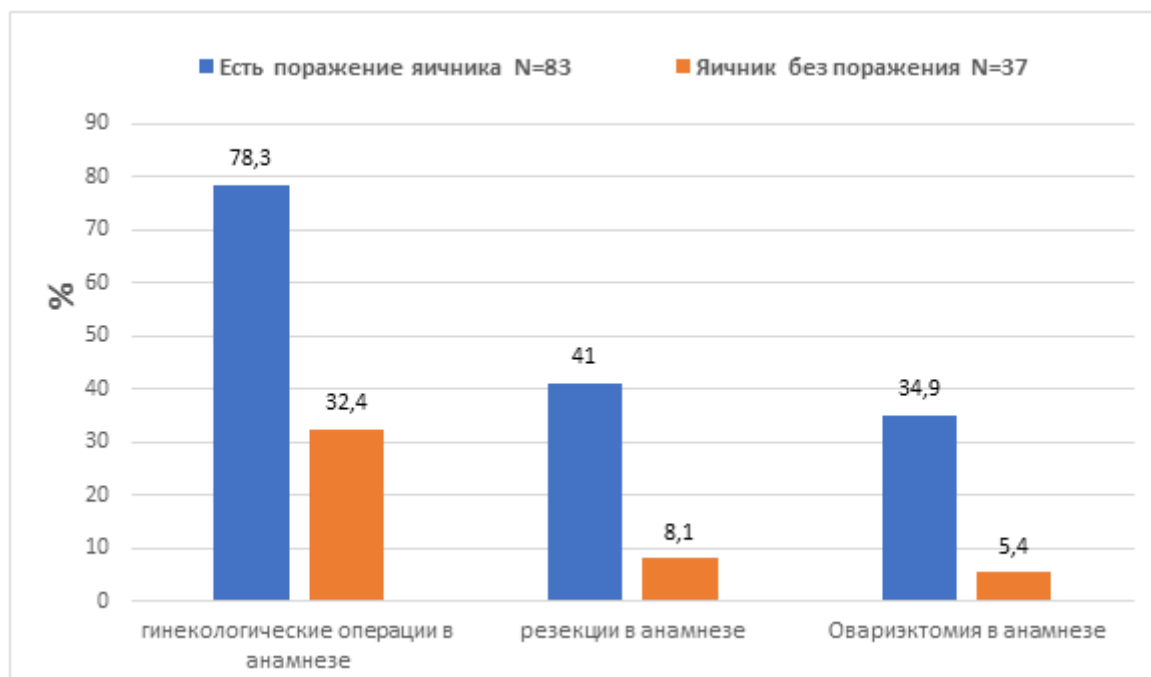
**Рисунок 8.** Использование комбинированных оральных контрацептивов и внутриматочной спирали в анамнезе пациенток

Использование комбинированных оральных контрацептивов обнаружено преимущественно в группе пациенток с пораженными яичниками (рис.8). Возможно, это связано с тем, что опухоли яичников при первичном обращении к гинекологу по месту жительства дифференцировали с доброкачественными функциональными кистами яичников. Использование внутриматочной спирали в анамнезе чаще наблюдалось в группе пациенток без поражения яичников ( $p=0,034$ ).

Следующий немаловажный фактор, влияющий на будущий прогноз репродуктивного потенциала у женщин является гинекологическое хирургическое лечение в анамнезе. В группе с наличием образования в яичниках значительно чаще ранее проводились операции на яичниках. Сравнение данных анамнеза по хирургическому лечению на яичниках между группами (табл. 3) достоверно показывает повышенный процент показателей в анамнезе у пациенток с поражением яичников. В первой группе пациенток хирургические манипуляции на придатках и/или овариэктомия в анамнезе отмечены у 41% (34/83) и 33,7 % (28/83) соответственно, тогда как для группы без поражения яичника эти значения составили 8,1% (3/37) и 5,4% (2/37) соответственно.

Обращает на себя внимание, что частота гинекологических операций в анамнезе в группе с поражением яичников практически в 2,5 раза была выше (рис.9)., чем в группе без поражения яичников (OR=2,41 95% Д.И. (1,5 - 3,9)).

Следует отметить, что ранее в анамнезе была произведена односторонняя овариэктомия у 30/120 (25%) пациенток и резекция яичников ранее производилась у 57/120 (47,5%) женщин.



**Рисунок 9.** Частота гинекологических операций у пациенток в анамнезе в двух исследуемых группах

Согласно нозологическим формам, всем пациенткам было проведено хирургическое лечение с одно- (73/120(60,8%)) или двусторонней (47/120(39,2%)) овариэктомией. Извлечение яичников лапаротомическим доступом производилось в 24% (29/120) случаев (табл.3, рис.10). Под контролем лапароскопии в 76% (91/120) случаев, у 46% (55/91) женщин извлечение происходило с помощью стерильного контейнера через троакарное отверстие и у 30% (36/91) пациенток яичники извлекались через влагалище одновременно с маткой и придатками. Гистерэктомии подверглись 59% (71/120) пациенток, что исключает возможность

вынашивания беременности в будущем. Хирургический этап лечения был произведен в разные фазы менструального цикла и среднем составил 16 день.

Таблица 3. Хирургические особенности пациенток в двух исследуемых группах

	I группа	II группа	P**
Гинекологические операции в анамнезе	65/83 (78,3%)	12/37 (32,4%)	<0.001**
Резекции яичников в анамнезе	34/83 (41%)	3/37 (8,1%)	0.001**
<b>Хирургические методы извлечения яичников</b>			<b>P*</b>
Лапароскопия, n=91			0,0017*
Через троакарное отверстие	39/83 (47,0%)	16/37 (43,2 %)	
Трансвагинальный доступ	18/83 (21,7%)	18/37 (48,7 %)	
Лапаротомия, n=29	26/83 (31,3%)	3/37 (8,1 %)	
День менструального цикла	16±11 (2;40)		

\* $\chi^2$ -тест, \*\*двусторонний точный критерий Фишера

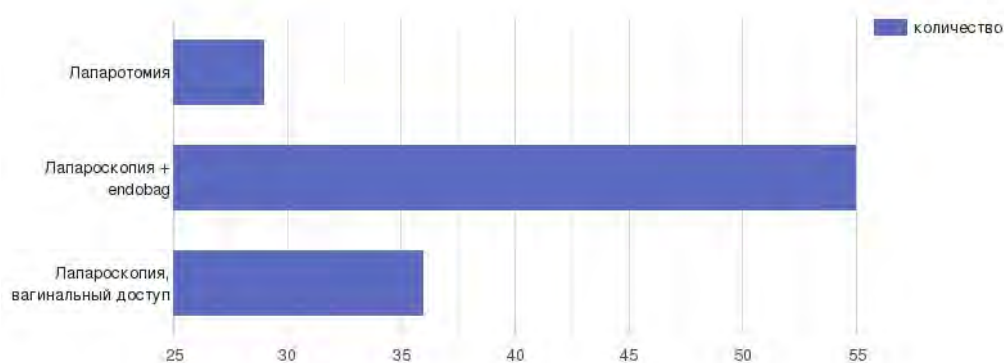


Рисунок 10. Количество и хирургические методы извлечения яичников

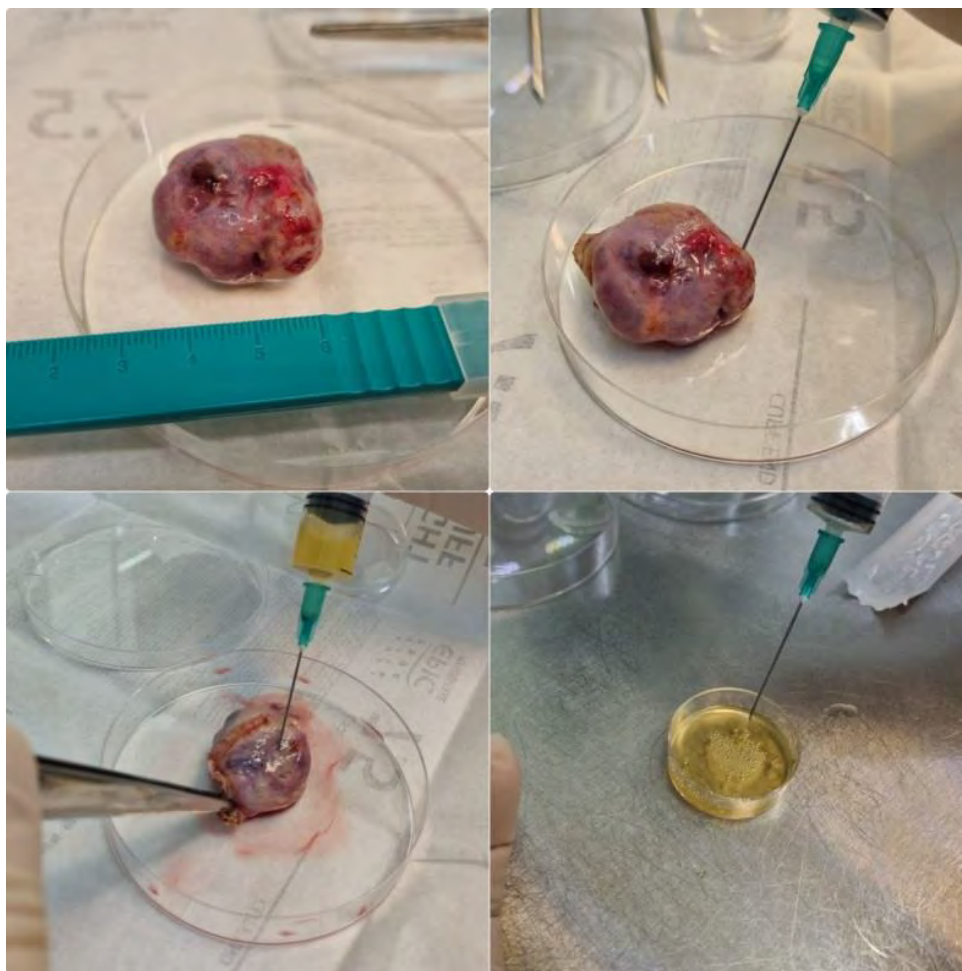


### 3.2. Выделение ооцит-кумулясных комплексов из ткани удаленного яичника

Транспортировка яичников производилась в стерильном подписанном контейнере в буферном растворе в течение 10-15 минут после проведенной овариэктомии (рис 11).



**Рисунок 11.** Стерильный контейнер с яичником в буферном растворе и термос нагретый до 37°C для транспортировки в эмбриологическую лабораторию.

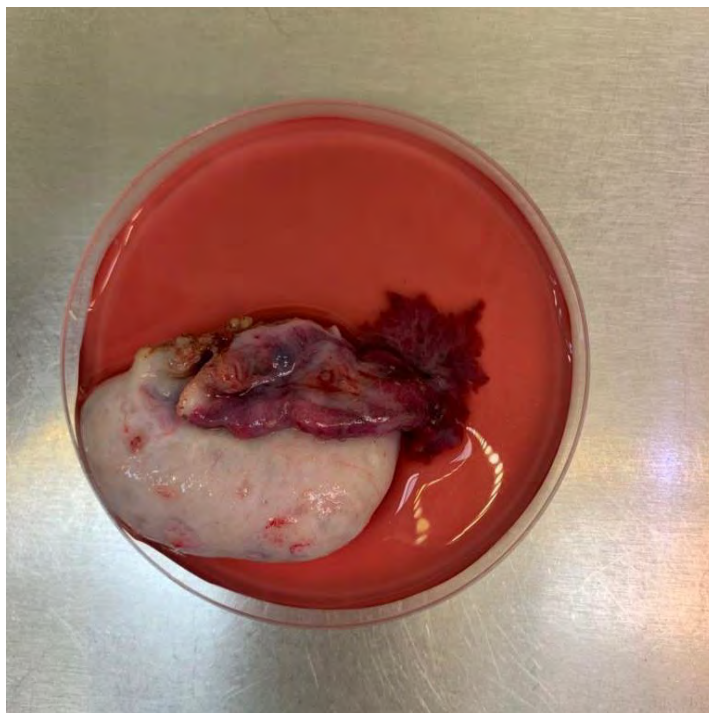


**Рисунок 12.** Эмбриологический этап аспирации фолликулярной жидкости из видимых антральных фолликулов яичника

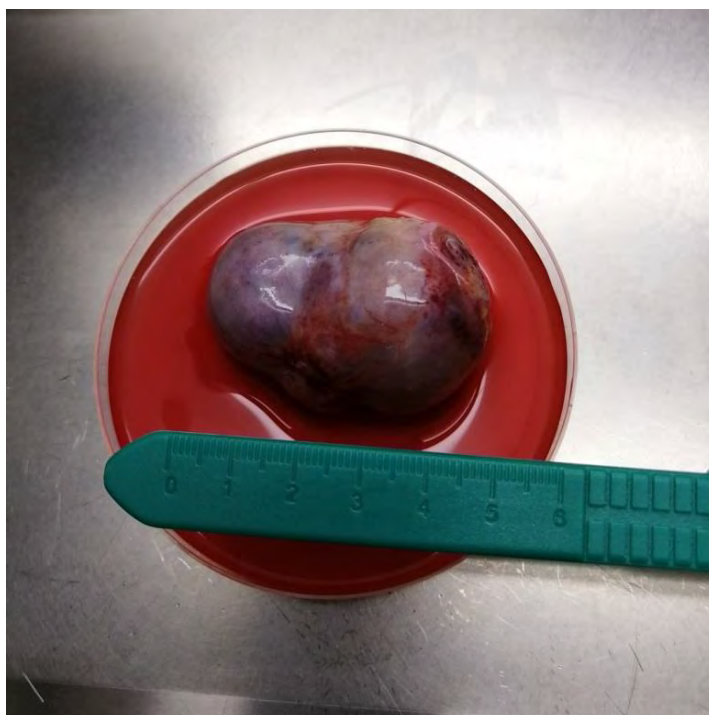
Все яичники, доставленные в эмбриологическую лабораторию, проходили этап замеров и оценки на наличие и объема аномальной ткани (рис.12). В кратчайшее время в стерильных условиях было произведено выделение незрелых ооцит-кумулюсных комплексов из ткани яичника по вышеописанной методике. Далее макропрепарат помещался в чашку Петри и визуально оценивался эмбриологами на наличие видимых антральных фолликулов, которые аспирировались шприцом. Аспирационная жидкость помещалась в чашку Петри и далее оценивалась под стереомикроскопом на наличие ооцит-кумулюсных комплексов (рис.12).

Опыт в данной технологии показал, что яичники с размерами опухоли  $> 6$  см, с множественными поражениями и коагулированной тканью,

обеспечивают достаточно затруднительную идентификацию незрелых ооцит-кумулюсных комплексов в ткани яичника.

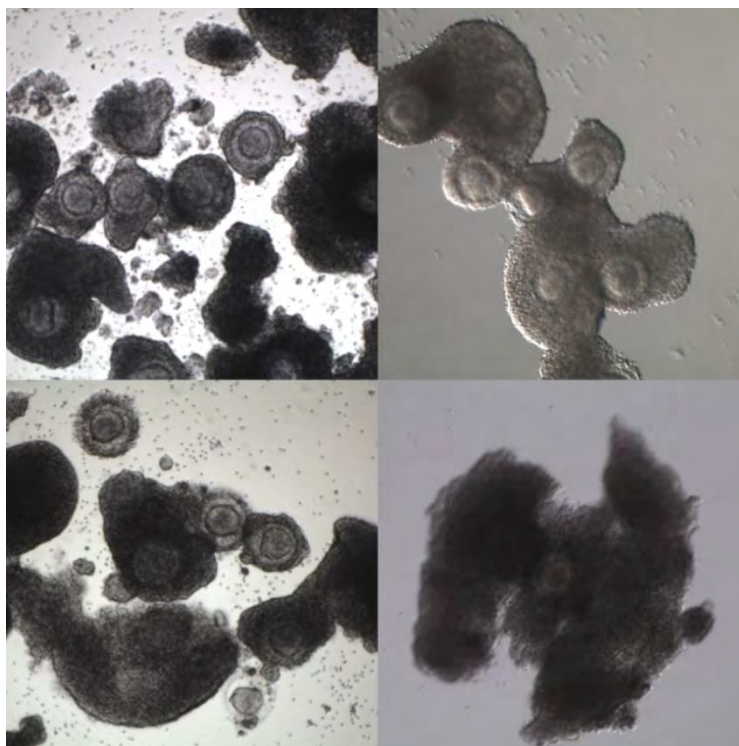


**Рисунок 13.** Макропрепарат: интактный яичник, пациентка 29 лет с раком шейки матки T3bN1M0



**Рисунок 14.** Макропрепарат: метастаз рака эндометрия в яичник, пациентка 32 лет с раком эндометрия T3aN1M1

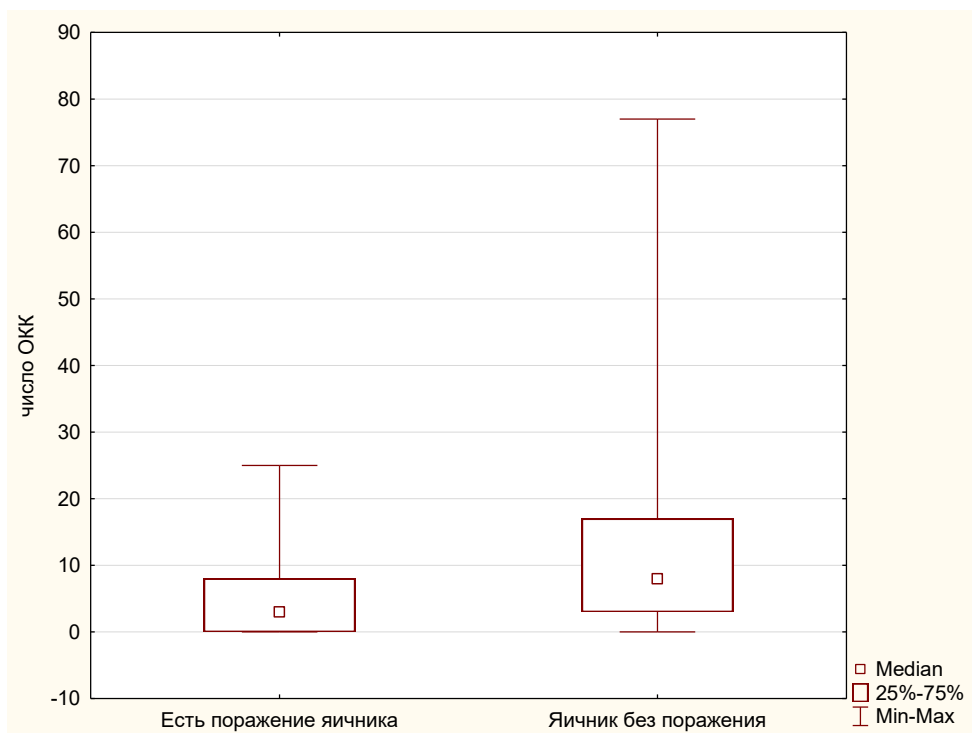
После выделения ооцит-кумулюсных комплексов, происходило их дозревание в условиях *in-vitro* в течение 48 часов. Далее оценивалось качество ооцитов.



**Рисунок 15.** Незрелые ооцит-кумулюсные комплексы под стереомикроскопом, полученные из ткани яичника

У пациенток без поражения яичников было значимо больше полученных ОКК, выявлены статистически значимые различия ( $p < 0,001$ ). В целом успешного результата в идентификации ооцитов из ткани удаленного яичника добились 89/120 (74,16%) женщин.

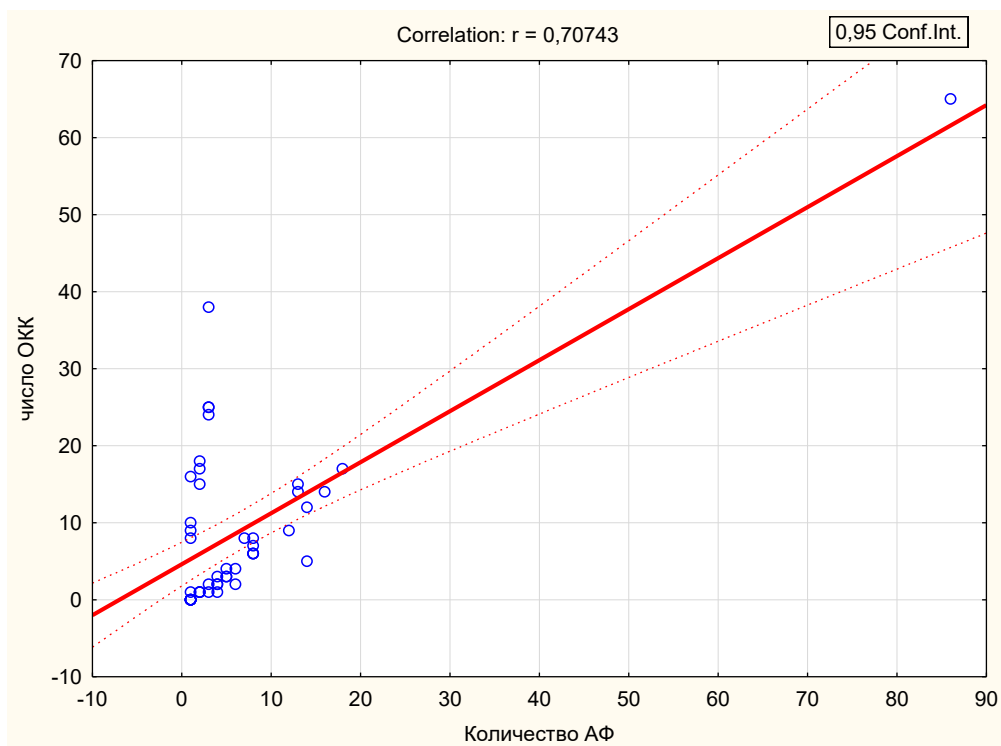
Число полученных ОКК из ткани удаленного яичника в группе с пораженными яичниками (3,00 (0,00; 8,00)) так же статистически значимо были ниже ( $p < 0,001$ ), чем в группе без поражения яичников (8,00 (3,00; 17,00) рис.16).



**Рисунок 16.** Количество полученных ооцит-кумулюсных комплексов в группах женщин с наличием и отсутствием неопластических процессов в яичниках

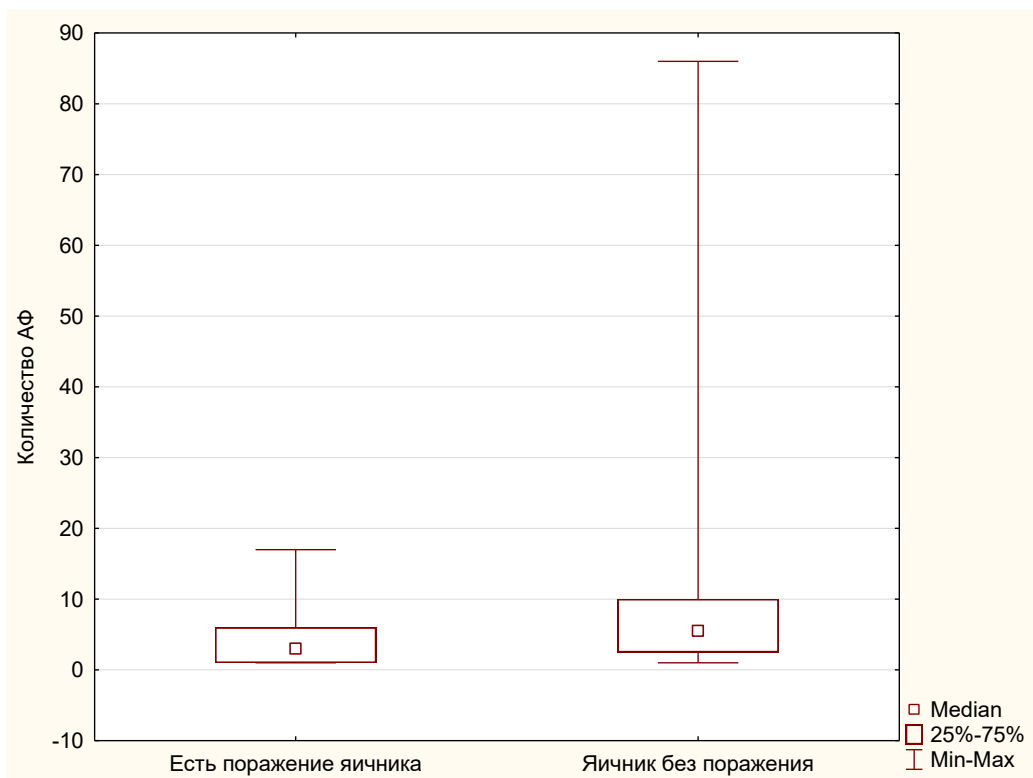
Также, были обнаружены высокие положительные корреляции между числом АФ и числом полученных ОКК ( $R_s = 0.93$ ,  $p < 0.001$ , рис. 17).

Полученный данные позволяют сгенерировать будущий прогноз исхода программы ОТО IVМ. Чем больше видимых антральных фолликулов в яичниках по данным клинко-инструментальных исследований, тем выше вероятность получения незрелых ооцит-кумулюсных комплексов из ткани яичника.



**Рисунок 17.** Корреляционная взаимосвязь между числом АФ и числом полученных ОКК ( $r=0,707$   $p < 0,001$ )

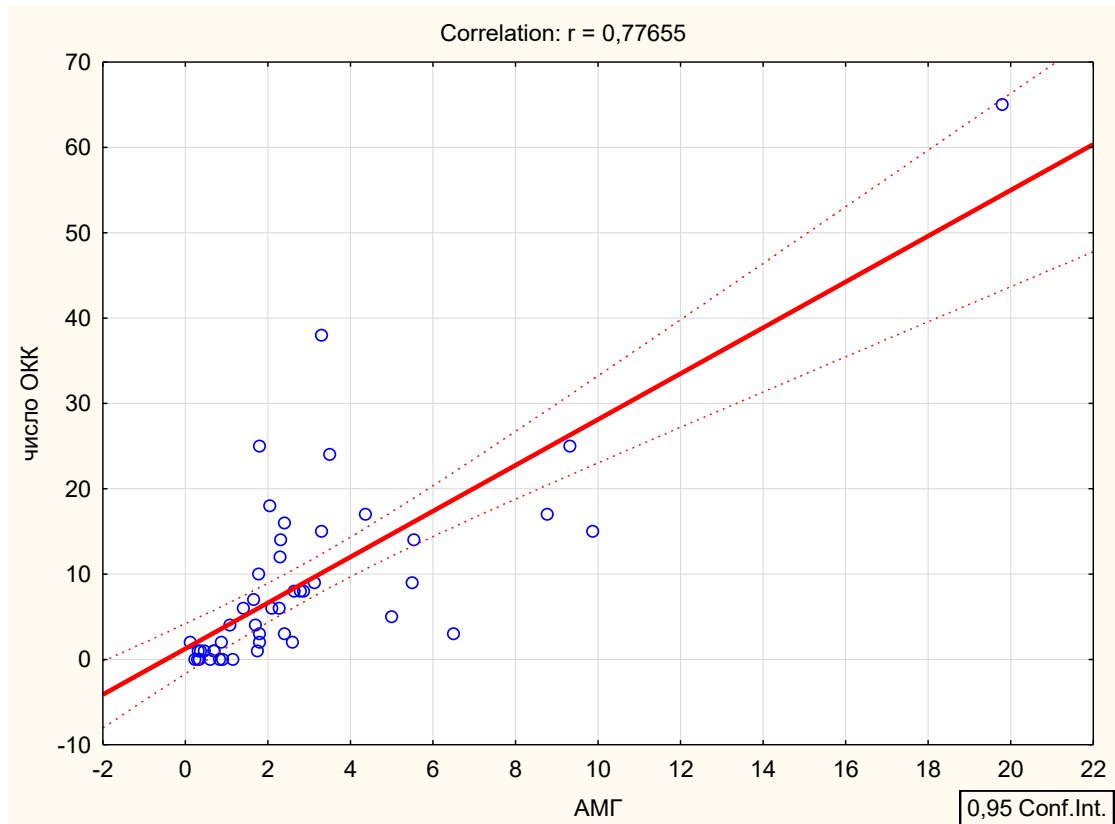
Далее мы проанализировали зависимость количества антральных фолликулов при наличии или отсутствии поражения яичников (рис. 18).



**Рисунок 18.** Количество антральных фолликулов в двух исследуемых группах



Наряду с количеством антральных фолликулов в яичниках, другим значимым параметром овариального резерва является уровень АМГ в сыворотке крови (рис 19.)



**Рисунок 19.** Корреляционная взаимосвязь между уровнем АМГ и числом полученных ОКК ( $r=0,776$   $p < 0,001$ )

Были обнаружены высокие положительные корреляции между уровнем АМГ и числом полученных ОКК ( $r=0,776$   $p < 0,001$ , рис. 19).

Кроме того, оценивалась значимость получения незрелых ОКК из ткани удаленного яичника от клиничко-anamнестических данных. С помощью непараметрического корреляционного анализа Спирмена выявлена сильная положительная зависимость между получением ОКК и количеством антральных фолликулов ( $R=0,718$   $p < 0,001$ ). Также, выявлены отрицательные зависимости от возраста, предрасположенности к онкологическим заболеваниям и гинекологических операций в анамнезе (табл. 4).

Таблица 4. Зависимость между клинико-анамнестическими данными пациенток и получением ОКК из ткани удаленного яичника

	Коэффициент Спирмена	P*
Возраст	-0,217461	0,017039
ИМТ	-0,012692	0,890567
Наличие брака	-0,086732	0,346227
Наличие беременностей в анамнезе	-0,095191	0,301044
Вредные привычки	0,109064	0,235712
Наследственность к онкозаболеваниям	-0,223387	0,015033
Прием КОК в анамнезе	0,095876	0,297562
День менструального цикла	0,181677	0,047044
Использование ВМС в анамнезе	0,135397	0,140354
Количество беременностей в анамнезе	-0,172461	0,059621
Количество родов в анамнезе	-0,120803	0,188746
Гинекологические операции в анамнезе	-0,242521	0,007611
Резекции яичников в анамнезе	-0,100659	0,273998
Овариэктомия в анамнезе	-0,155158	0,404592

\*коэффициент Спирмена

### 3.3. Влияние клинико-анамнестических факторов, влияющих на исходы программы ОТО IVМ

Как описывалось ранее, исходом программы ОТО IVМ принято считать дозревание незрелых ооцит-кумулюсных комплексов, полученных из ткани яичника до стадии зрелых ооцитов (MII) и криоконсервация собственного генетического материала (ооциты/эмбрионы).

Ведущим фактором, влияющим на успех программы IVМ, является возраст. При сравнении количества пациенток, у которых было идентифицированы ооцит-кумулюсные комплексы в сравнении возрастных групп менее 37 лет включительно (n=92) и более 37 лет (n=28) выявлены статистически значимые различия (p=0,010) между группами, при этом в более младшей группе частота положительных исходов выше 69/83 (83,1%) и 22/37 (59,5%) соответственно.



Успех программы IVМ в целом при сравнении возрастных групп менее 37 лет составило у 69/83 (83,1%) пациенток и более 37 лет у 22/37 (59,5%) пациенток ( $p=0,010$ ). ОР = 10,7 (1,5 - 76,15).

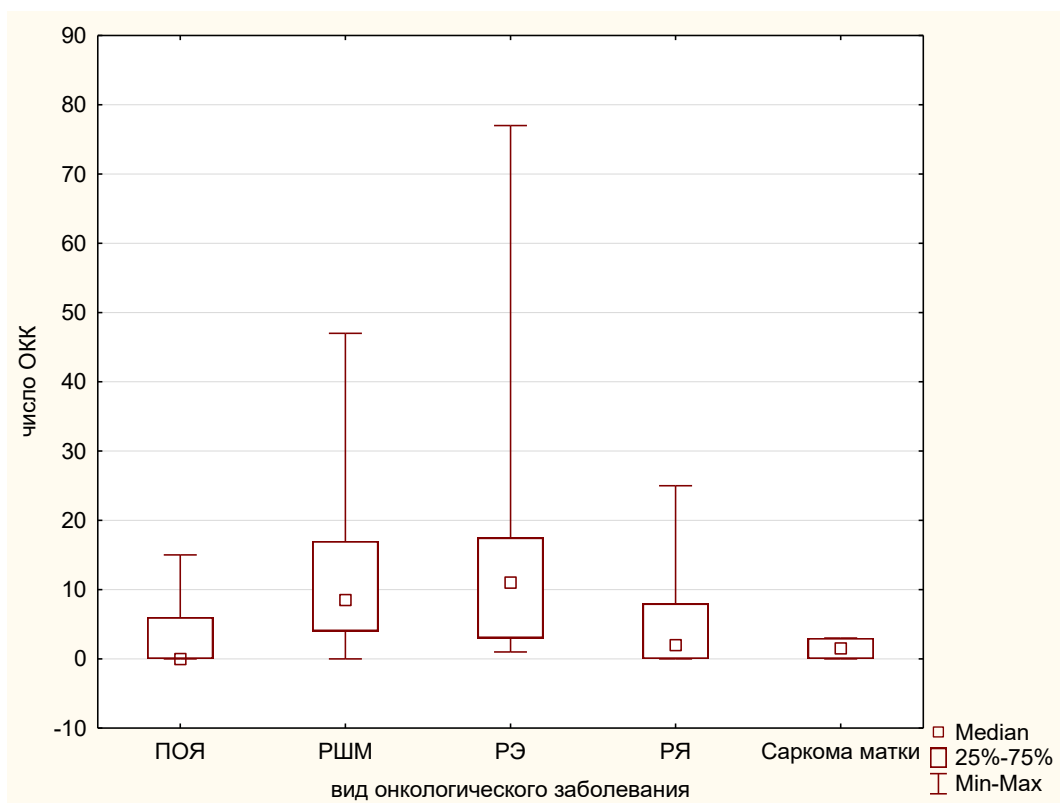
По нашим данным, у пациенток до 37 лет программа завершалась успехом в 80.4 % случаев (у 74 из 92 пациенток), что значимо чаще ( $p=0.044$ , точный тест Фишера), чем у пациенток после 37 лет, для которых вероятность составила 60.7 % (17 из 28 пациенток).

С помощью непараметрического корреляционного анализа Спирмена выявлена сильная положительная зависимость между количеством полученных ОКК, которые в дальнейшем прошли этап дозревания до стадии МП (табл.5) и количества антральных фолликулов ( $R=0,735$ ,  $p < 0,001$ ). Также выявлена положительная умеренная зависимость между полученными ОКК, которые в дальнейшем прошли этап дозревания до стадии МП и уровнем АМГ в сыворотке крови ( $R= 0,488$   $p < 0,001$ ). Выявлены отрицательные зависимости между возрастом, предрасположенностью к онкологическим заболеваниям и гинекологическими операциями в анамнезе.

**Таблица 5 Зависимость клинико-anamнестических данных пациенток на получение ОКК из ткани удаленного яичника в двух исследуемых группах у пациенток, чьи ОКК в дальнейшем прошли этап дозревания до стадии МП**

	<b>Коэффициент Спирмена</b>	<b>P</b>
Возраст	-0,247732	0,006371
АМГ	<b>0,488149</b>	<b>0,000004</b>
ИМТ	-0,053634	0,560698
Наличие брака	-0,052552	0,568645
Наличие беременностей в анамнезе	-0,088960	0,333931
Вредные привычки	0,080467	0,382299
Наследственность к онкозаболеваниям	-0,272750	0,002807
Прием КОК в анамнезе	0,085906	0,350859
День менструального цикла	0,172358	0,059776
Наличие ВМС в анамнезе	0,077554	0,399825
Количество беременностей в анамнезе	-0,109087	0,235614
Количество родов в анамнезе	-0,042059	0,648306
Количество антральных фолликулов	<b>0,735496</b>	<b>0,000000</b>

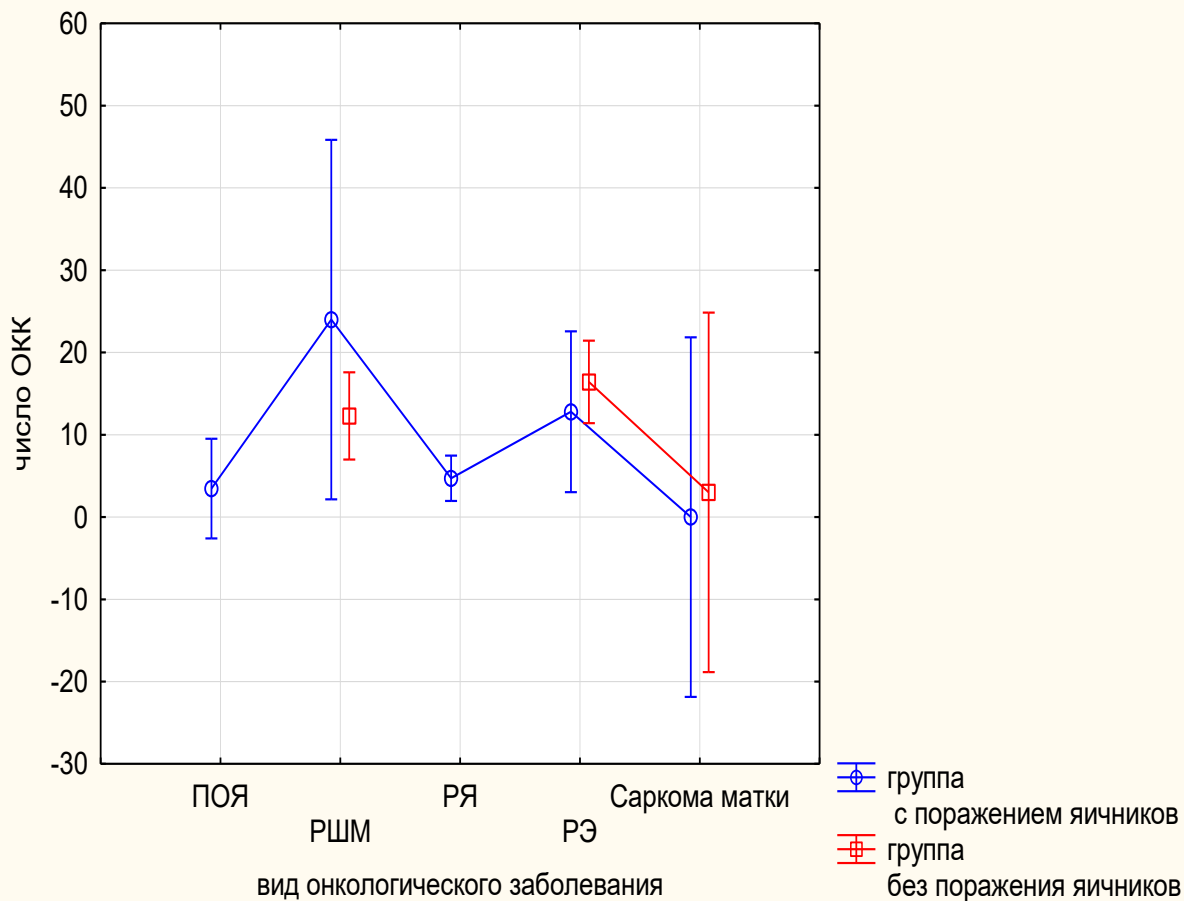
	<b>Коэффициент Спирмена</b>	<b>P</b>
Гинекологические операции в анамнезе	-0,221700	0,014952
Резекции яичников в анамнезе	-0,037564	0,683766
Овариэктомия в анамнезе	-0,176777	0,341439



**Рисунок 20.** Зависимости числа полученных ОКК от нозологической формы вида онкологического заболевания.

Далее оценивалось взаимосвязь между нозологией онкологического процесса у пациенток и получение незрелых ооцит-кумулюсных комплексов из ткани яичника. Существенных отличий между различными нозологиями онкологических заболеваний не получено.

Current effect:  $F(2, 112)=,74647, p=,47638$   
Effective hypothesis decomposition  
Vertical bars denote 0,95 confidence intervals



**Рисунок 21.** График зависимости числа полученных ОКК от нозологической формы онкологического заболевания (Критерий ANOVA)

Выявлены статистически значимые различия (критерий Манна-Уитни) между ПОЯ и РШМ ( $p=0,0061$ ), ПОЯ и РЭ ( $p=0,0039$ ), РШМ и РЯ ( $p=0,0013$ ), РШМ и саркомой матки ( $p=0,0778$ ).

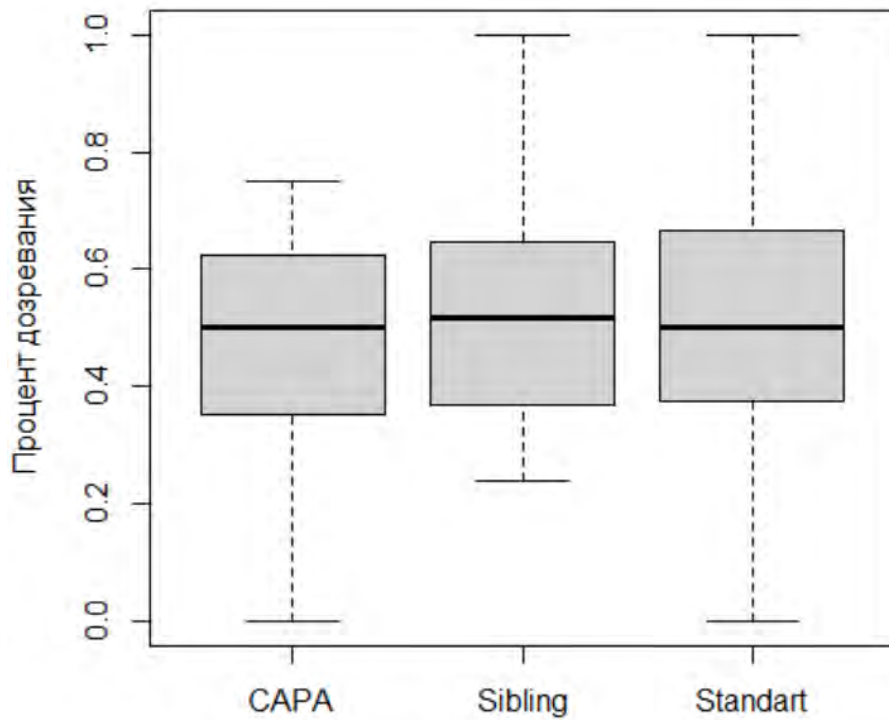
Был проведен сравнительный анализ числа полученных незрелых ОКК у пациенток с наличием образования в яичнике и без такового. У пациенток без поражения яичников значимо выше шанс успеха получения ооцитов по сравнению с теми, у кого яичник был поражен ( $p < 0.001$ ; точный тест Фишера). Из 37 пациенток с непораженным яичником ооциты удалось получить у 36 (97.3 %) пациенток, в то время как в группе с пораженным яичником – только у 55 из 83 женщин (66.3 %).

Эмбриологические индикаторы IVF представлены в таблице 8. В проведенном исследовании незрелые ооцит-кумулюсные комплексы удалось получить у 89/120 (74,16%) пациенток. Среди них, 55 (61,79%) пациенток были с поражением яичников. Общее число полученных ОКК составило 954,

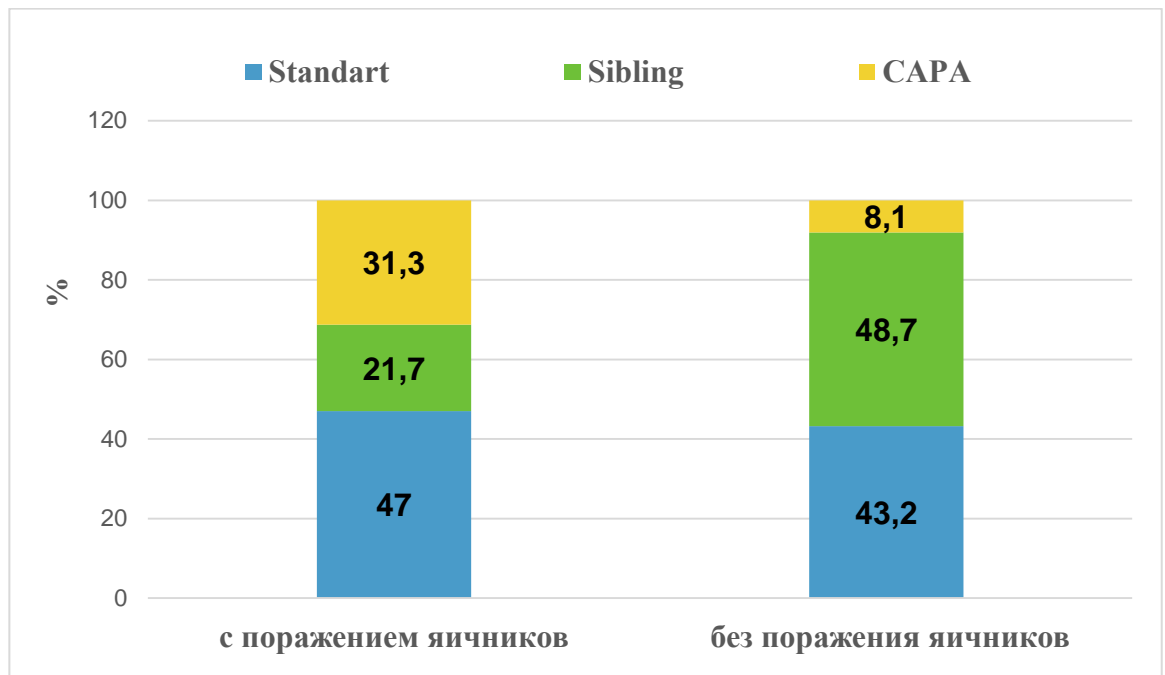
и в среднем на 1 пациента составило 10,7 ооцитов. Дегенеративные клетки в ходе идентификации ОКК из ткани яичника были обнаружены в 14,3% (137), тогда как число клеток зародышего пузырька (GV) составило 232(24,3%).

Примечательно, что статистически значимых различий не выявлено ( $p=0,109$ ) среди пациенток в двух исследуемых группах, чьи полученные незрелые ооцит-кумулюсные комплексы в дальнейшем дозрели до стадии МII, однако прослеживается тенденция к увеличенному числу полученных ОКК у группы без поражения яичников. Исходя из этого, можно предположить, что в группе пациенток с пораженными яичниками, шанс получения дегенеративных клеток или клеток, непригодных для дальнейшего дозревания значительно выше, чем во второй группе.

Далее мы проанализировали, существует ли зависимость доли дозревших до стадии МII ооцитов от общего числа полученных ОКК и от выбранной среды IVM. Всего сравнивалось три среды: standart IVM, CAPA и sibling (однородная смесь standart IVM и CAPA в соотношении 1:1). Значимых различий по критерию Краскела-Уоллиса не было обнаружено ( $p = 0.741$ ). Средний процент дозревания ооцитов до стадии МII составил 50.58 (SD = 26.52) % (рис.22). Статистически значимых различий между видами сред в частоте полученных успешных результатов не выявлено ( $p>0,05$ ). Между Standart и Sibling  $p=0,376$ , между Standart и CAPA  $p= 0,2045$ , между Sibling и CAPA  $p= 0,681$ (рис.23).



**Рисунок 22.** Доля дозревших ооцитов до стадии МII в зависимости от эмбриологической среды IVM



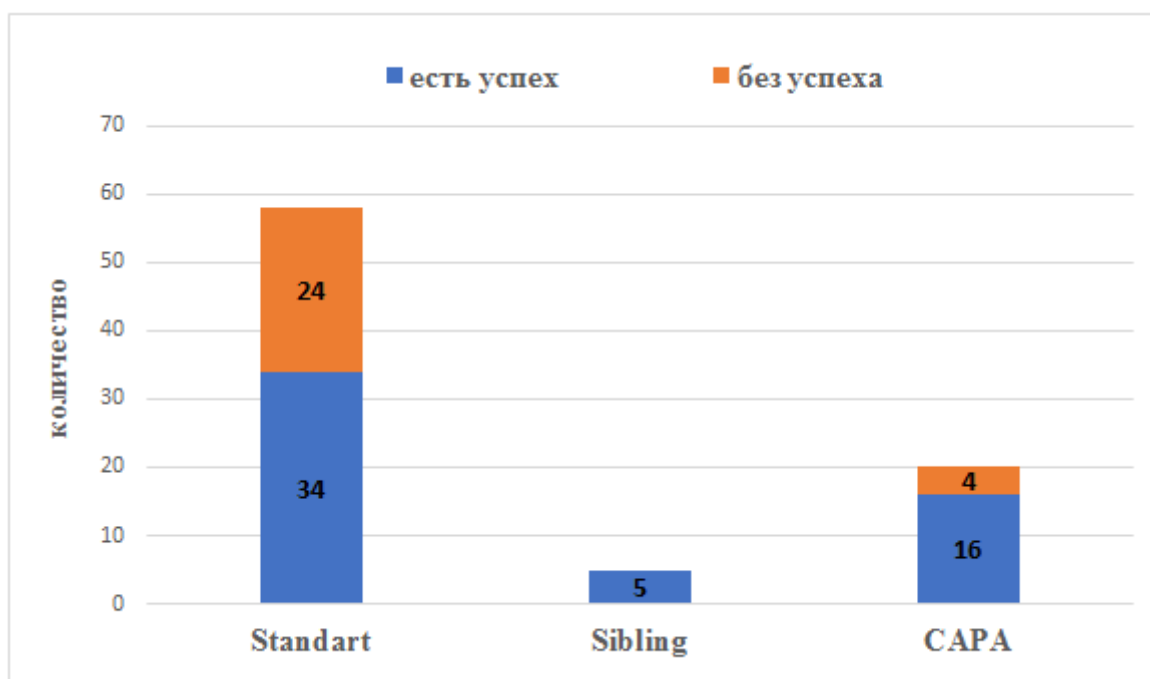
**Рисунок 23.** Распределение пациенток от выбранной среды дозревания IVM

При разделении женщин в зависимости от поражения и без поражения яичника наблюдалась аналогичная картина.

Статистически значимых различий между видами сред в частоте получения успешного результата в группе с поражением яичника не выявлено ( $p > 0,05$ ). Между Standart и Sibling  $p = 0,234$ , между Standart и CAPA  $p = 0,0566$ , между Sibling и CAPA  $p = 0,572$ .

**Таблица 6. Результаты индентификации ооцит-кумулюсных комплексов из ткани удаленного яичника в зависимости от выбранных сред IVМ у пациенток с поражением яичников**

Есть поражение яичника	Standart N=58	Sibling N=5	CAPA N=20	P
Успешные результаты (криоконсервация генетического материала)	34/58 (58,6%)	5/5 (100%)	16/20 (80%)	>0,05



**Рисунок 24.** Распределение пациенток с поражением яичника в зависимости от выбранной среды дозревания IVМ

В группе без поражения яичника получить ОКК удалось у 36/37 (97,3%) женщин (табл. 7).

Таким образом, все изученные IVМ среды работают с одинаковой эффективностью (т.к. частота получения успешного результата (дозревание

незрелых ОКК до стадии МП и криоконсервация собственного генетического материала) между видами сред статистически не значима ( $p > 0,05$ )).

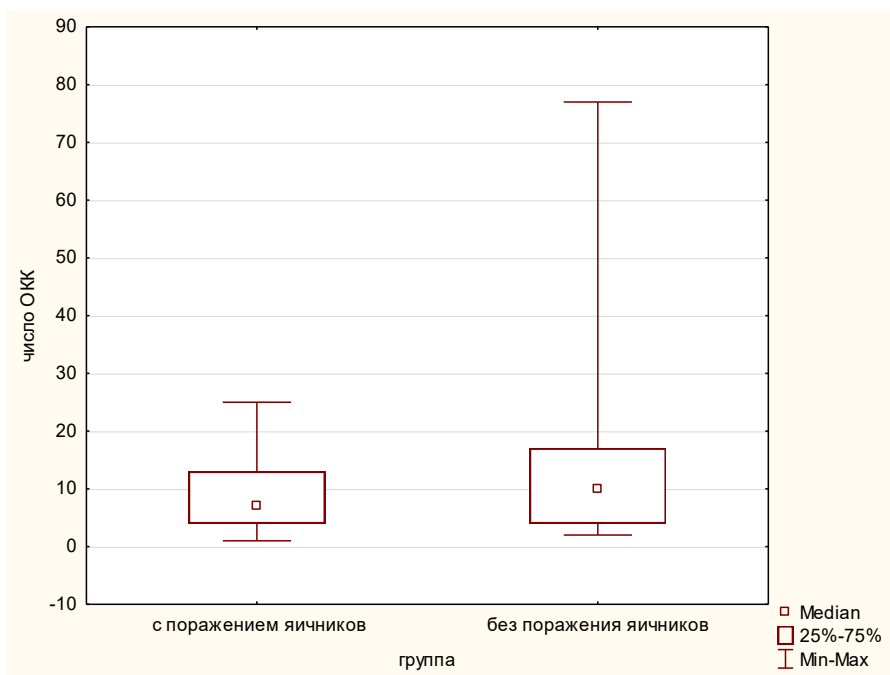
При сравнении частоты полученных успешных результатов при применении программы IVМ ооцитов выявлено статистически значимое снижение частоты успешных результатов в группе с поражением яичников 55/83 (66,3%) по сравнению с группой без поражения яичников 36/37 (97,3%) ( $p < 0,001$ ). Рассчитанный относительный риск получения успешных результатов OR= 0,68 95% Д.И. (0,58 - 0,8) не превышает единицы, что свидетельствует о снижении показателя успеха в группе с поражением яичника по сравнению с группой без поражения яичников.

Соответственно частота неуспеха возрастает в группе с наличием неопластических процессов в яичниках OR= 12,48 95% Д.И (1,76 - 88,32).

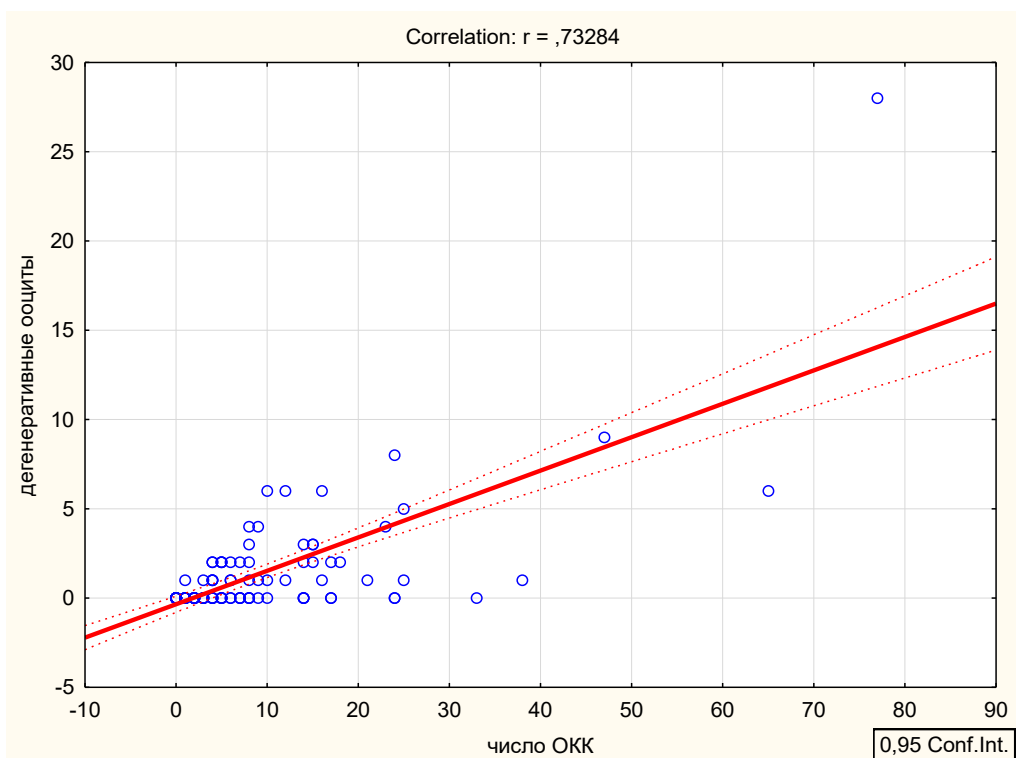
**Таблица 7. Результаты успешности получения ОКК у пациенток и выбранные среды дозревания IVМ**

	<b>I группа, N=83</b>	<b>II группа, N=37</b>	<b>P</b>
Успешные результаты, всего:	55/83 (66,3%)	36/37 (97,3%)	<0,001
Из них при среде IVМ:			
Standart	34/58 (58,6%)	23/24 (95,8%)	<0,001
Sibling	5/5 (100%)	5/5 (100%)	-
САРА	16/20 (80%)	8/8 (100%)	0,639

\*двусторонний критерий Фишера



**Рисунок 25.** Число полученных ОКК из ткани удаленного яичника в двух исследуемых группах у пациенток, чьи ОКК в дальнейшем прошли этап дозревания до стадии МП



**Рисунок 26.** Корреляционная взаимосвязь между числом ОКК и числом дегенеративных клеток ( $r=0,732$   $p < 0,001$ )



### 3.4. Эмбриологические исходы программы ОТО IVМ

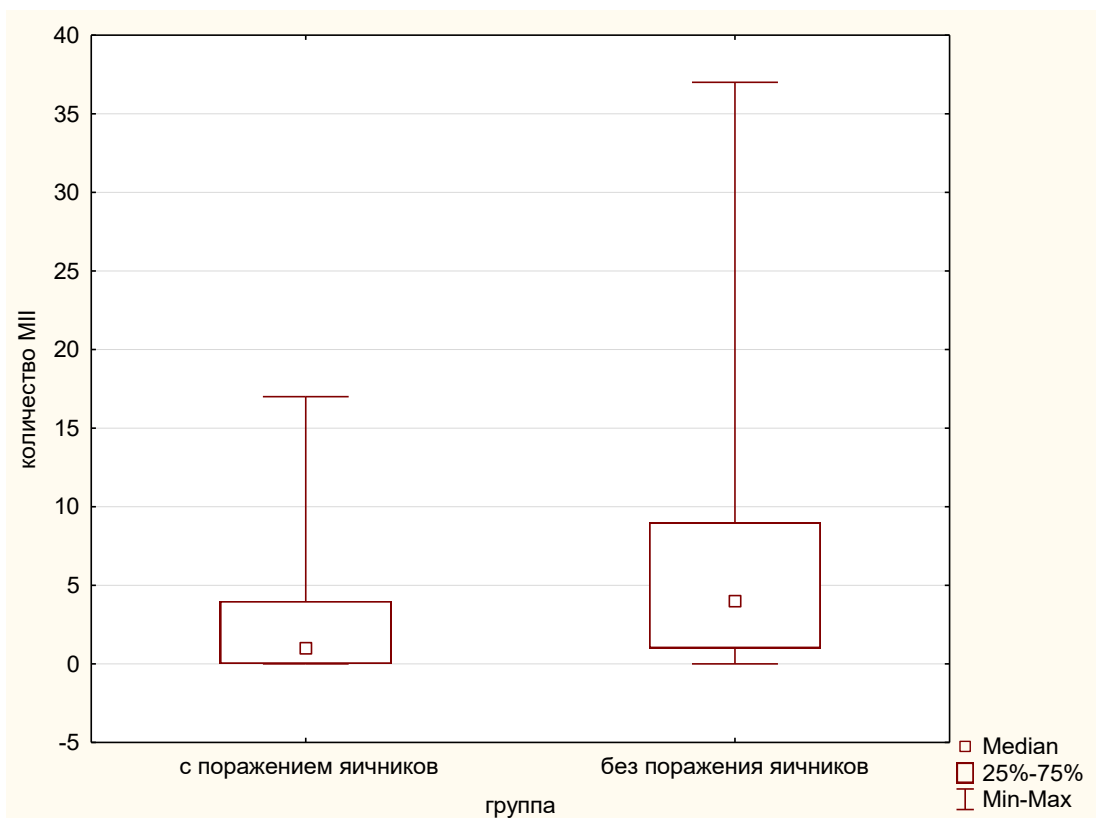
В 52, 2% случаев (498/954) произошло созревание незрелых ОКК до стадии МП, что составило в среднем, 5,6 зрелых ооцита на одного пациента.

Далее пациенткам было предложено заморозить полученные ооциты или оплодотворить спермой мужа/донора. Витрифицировать полученные ооциты пожелали 48 пациенток, общее число криоконсервированного материала составило 255/498 ооцитов, и в среднем на 1 пациентку составило 5,3 зрелых ооцитов. Спермой анонимного донора не воспользовалась ни одна женщина, однако спермой мужа методом ИКСИ было оплодотворено 238/498 ооцитов у 33 пациенток, что составило 7,2 оплодотворенного ооцита на 1 пациентку. Получение зиготы в 142/238 оплодотворенных клеток, а число дробящихся эмбрионов составило 79/142 (55,63%). Несмотря на то, что число формирующихся морул составило 51, формирование бластоцист произошло лишь у 16 пациенток. Всего было получено 20 эмбрионов на стадии бластоцисты, что составило 14,08%, 12 (60%) из которых были пригодны к криоконсервации и у 1 (8,3%) произведена биопсия трофэктодермы для проведения ПГТ-а.

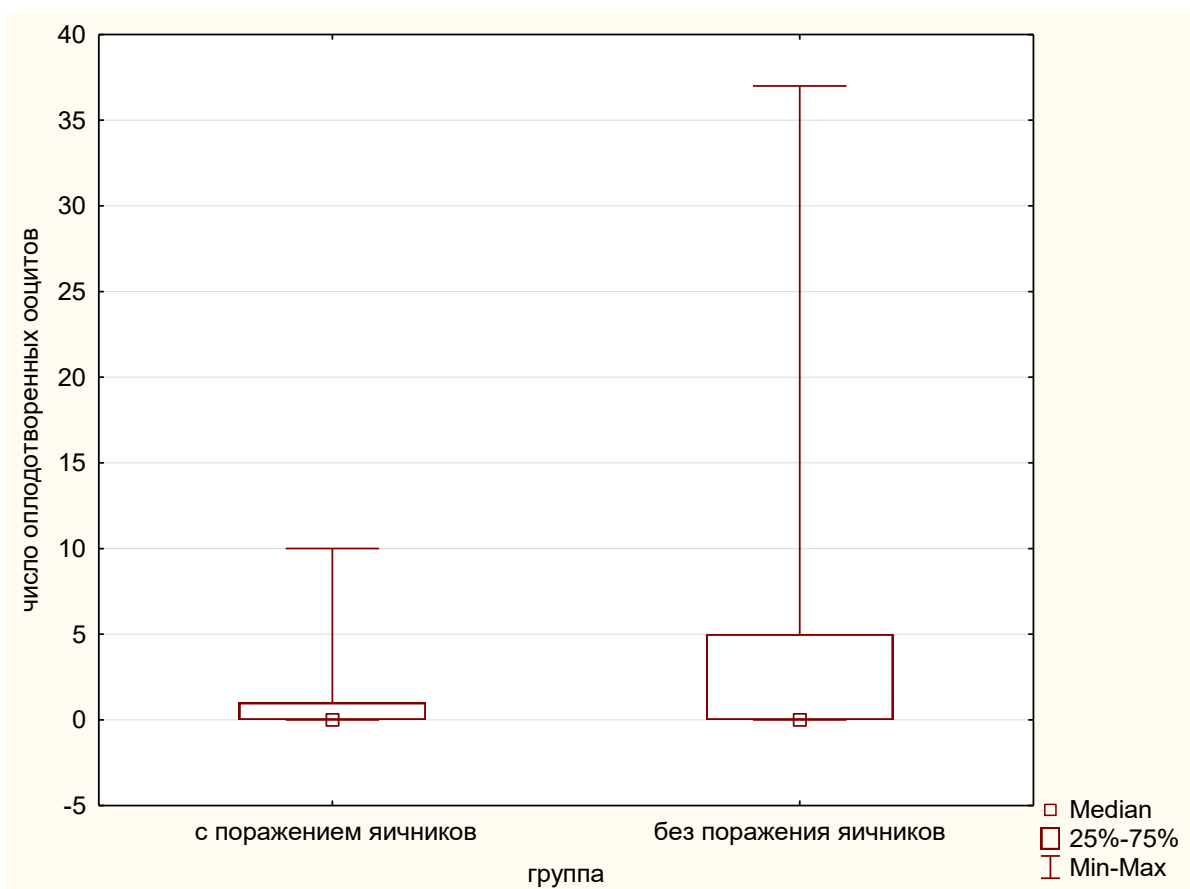
Таблица 8. Эмбриологические параметры IVF

	<b>I группа, N=83</b>	<b>II группа, N=37</b>	<b>P*</b>
Число ОКК	3 (0; 8)	8 (3; 17)	<b>0,0169</b>
Дегенеративные ооциты	0 (0; 1)	1 (0; 2)	0,1382
GV	0 (0; 2)	1 (0; 4)	0,3084
Количество МП	1 (0; 4)	4 (1; 9)	<b>0,0132</b>
Крио МП	0 (0; 2)	1 (0; 4)	0,5780
Число оплодотв.ооцитов	0 (0; 0)	0 (0; 5)	<b>0,0141</b>
2PN	0 (0; 0)	0 (0; 2)	0,1139
Дробящиеся эмбрионы	0 (0; 0)	0 (0; 1)	0,3871
Морула	0 (0; 0)	0 (0; 1)	0,1894
Бластоциста	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0,3511

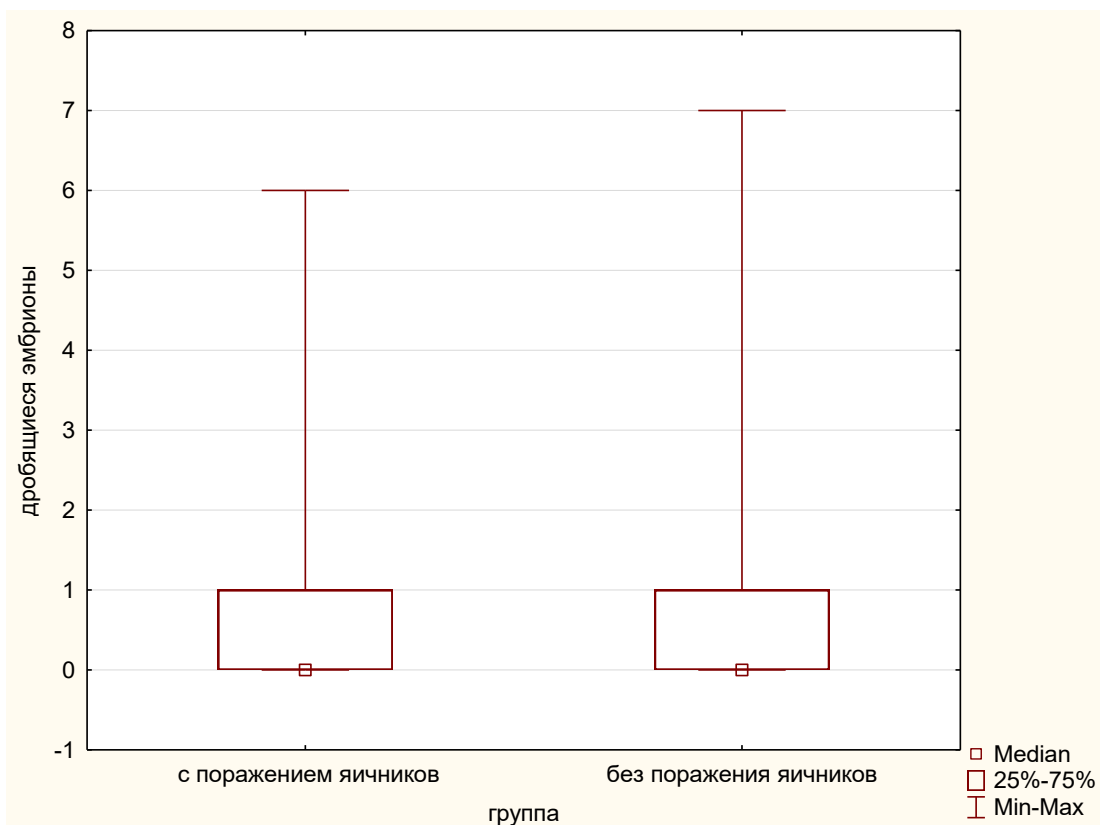
\*Критерий Манна-Уитни



**Рисунок 27.** Количество созревших ОКК до стадии MII среди всех пациенток в 2х группах



**Рисунок 28.** Число оплодотворенных ооцитов у пациенток в двух группах



**Рисунок 29.** Количество дробящихся эмбрионов (третьих суток развития) в двух исследуемых группах

**Таблица 8.1. Эмбриологические параметры IVF**

	Пациенты, N	Общее количество	I группа	II группа
Число ОКК	89	954	430	524
Дегенеративные ооциты	42	137	58	79
GV клетки	62	232	124	109
Количество МП	81	498	217	269
Крио МП	48	255	141	114
Число оплодотворенн ых ооцитов	33	238	75	163
2PN	30	142	58	84
Дробящиеся эмбрионы	26	79	40	39
Морула	20	51	22	29
Бластоциста	16	20	9	11
Крио бластоцист	11	12	6	6
Крио эмбрионов 3х суток	4	9	9	0

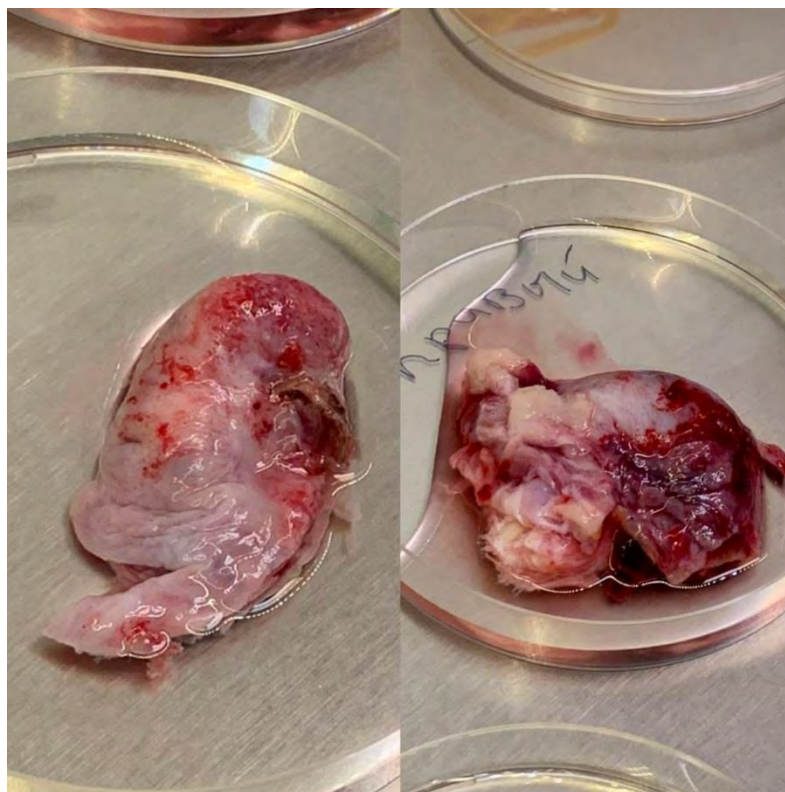
Таблица 9. Оценка эффективности исследуемой технологии IVM

Характеристика, %	Медиана (Q1; Q2)	Объем выборки
Созревание до стадии МШ	50.00 (37.50; 66.67)	81
Частота оплодотворения	57.14 (16.67; 1.0)	81
Дробящиеся эмбрионы	75.00 (47.12; 1.0)	30
Формирование бластоцисты	16.67 (0.00; 41.67)	30

Несмотря на полученные данные, успех программы ОТО-IVM, а именно криоконсервация собственного генетического материала, был получен у 59 пациенток, 38 из которых составляли группу с поражением яичника. Всего было получено 20 эмбрионов на стадии бластоцисты у 13 пациенток, 12 (60%) из которых были пригодны к криоконсервации. Однако биопсию трофэктодермы проводили лишь у 1 пациентки с целью последующего преимплантационного генетического тестирования на анеуплоидии. Генетический анализ образцов трофэктодермы проводился методом высокопроизводительного секвенирования (NGS) с использованием Ion ReproSeq PGS Kit (Thermo Fisher Scientific, США) и выявление анеуплоидий было произведено с помощью генетического анализатора.

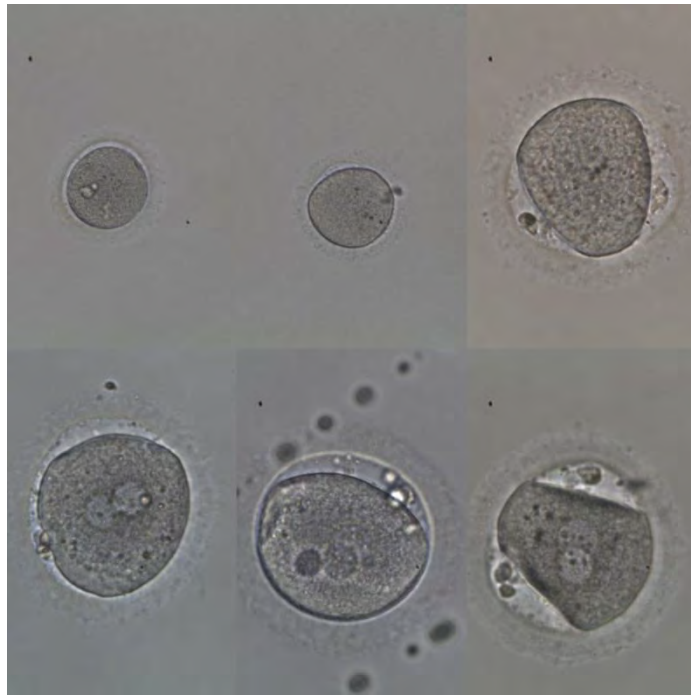
Данная пациентка обратилась для проведения программы ОТО-IVM перед проведением хирургического лечения по поводу рака яичника T4aNxM1 стадии в возрасте 30 лет. В ходе клинико-лабораторного обследования был выявлен уровень АМГ в сыворотке крови, который составил 5 нг/мл, онкомаркер СА 125 составил 95,39 Ед/мл (норма <35 Ед/мл). При ультразвуковом исследовании было подсчитано 14 видимых антральных фолликула. Пациентке проведена лапаротомия, модифицированная задняя экзентерация малого таза, абдоминальная перитонэктомия, аппендэктомия, спленэктомия, холецистэктомия, экстирпация большого сальника, стриппинг обоих куполов диафрагмы, резекция правого купола диафрагмы, метастасэктомия из полых органов,

атипическая резекция печени, полная циторедукция. Яичники были извлечены через брюшную полость и транспортированы в лабораторию ЭКО в течение 15 минут в стерильном контейнере с буферным раствором.

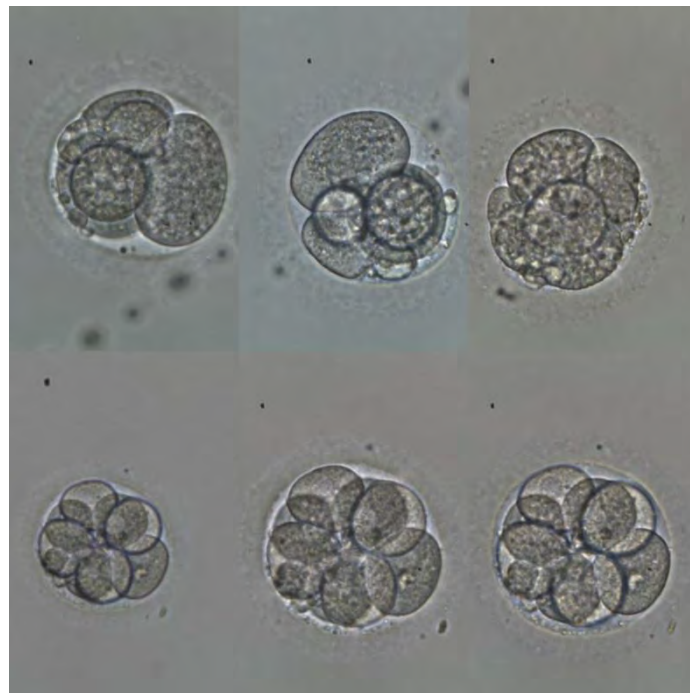


**Рисунок 30.** Макропрепарат: двустороннее поражение яичников. Диагноз – рак яичников с поражением обоих яичников у пациентки 30 лет с раком яичника T4aNxM1 (FIGO)

После обработки ткани яичника, было идентифицировано 5 незрелых ооцит-кумулюсных комплексов, несмотря на значения АМГ в сыворотке крови и количество антральных фолликулов накануне хирургического лечения. Из 5 ОКК дозрело 2 (40%) ооцита до стадии МII и 1 ооцит (20%) до стадии MI. Произведено оплодотворение трех ооцитов методом ИКСИ спермой мужа, из которых 2 (66,6%) удачно оплодотворились. Один эмбрион остановился на стадии морулы, второму эмбриону проведена биопсия трофэктодермы для проведения ПГТ-а с последующей его криоконсервацией на стадии бластоцисты с морфологической оценкой 4AA по классификации Гарднера.



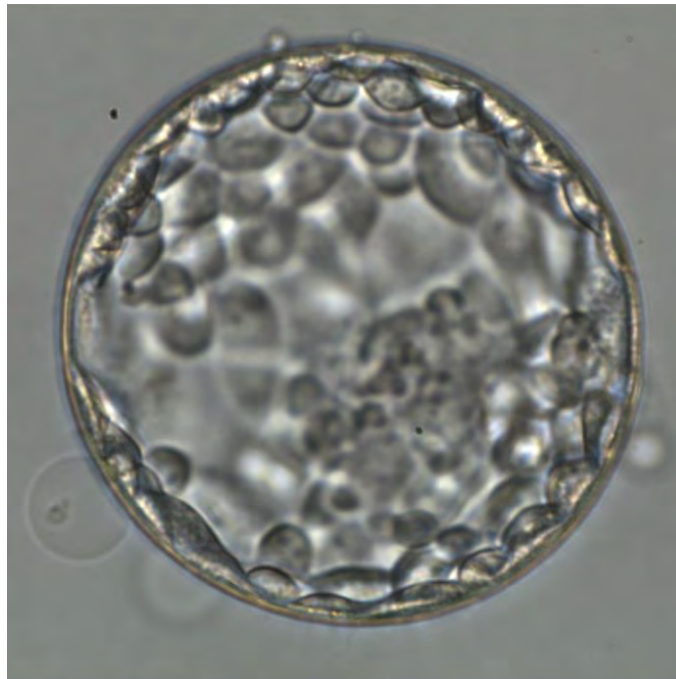
**Рисунок 31.** Зрелые ооциты и зиготы под стереомикроскопом



**Рисунок 32.** Стадия дробления эмбрионов



**Рисунок 33.** Эмбрион на стадии ранней бластоцисты



**Рисунок 34.** Эмбрион на стадии бластоцисты с морфологической оценкой 4AA по Гарднеру

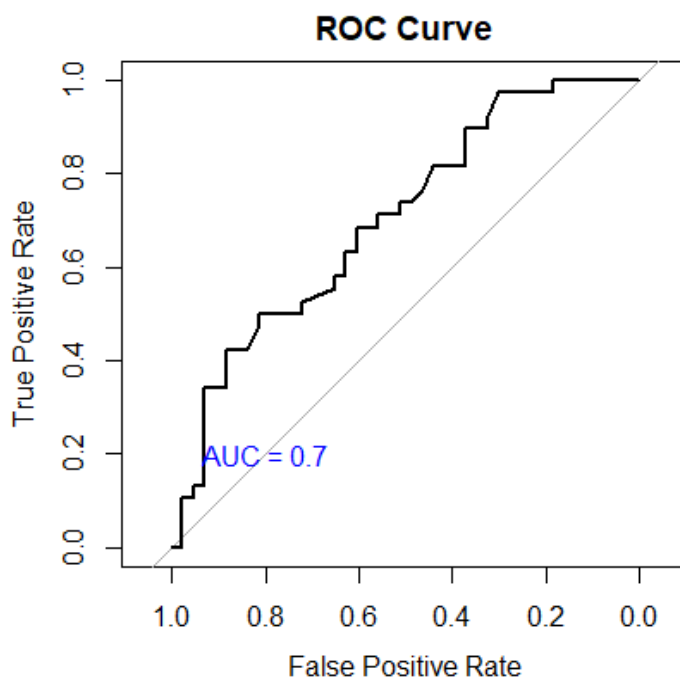
После проведения преимплантационного генетического тестирования эмбриона (табл.10), получен результат seq(1-22)x2,(X,Y)x1, что подтверждает генетическую пригодность к переносу в полость матки.

Таблица 10. Результат преимплантационного генетического тестирования эмбриона методом NGS

Исследованные эмбрионы	Результат	Примечание
Количество эмбрионов	1	
Эмбрион 1 (нот 1)	seq(1-22)x2,(X,Y)x1	
Заключение	Для переноса рекомендован эмбрион нот 1	

### 3.5. Прогностические модели успеха/неуспеха программы ОТО IVМ

Нами был проведен ROC-анализ для выявления пороговых значений у показателей, выше/ниже которых риск неудач возрастает.



**Рисунок 35.** ROC-анализ уровня АМГ в сыворотки крови в отношении исхода программы ОТО IVМ

Исходя из вышеизложенного, получена отличная прогностическая модель для предсказания успеха/неуспеха программы ОТО IVМ, площадь под кривой  $AUC=0,945\pm 0,028$  ( $p < 0,001$ ), таким образом точка «cut off» для



уровня АМГ в сыворотке крови составила 2,11 нг/мл, ниже которой риск неблагоприятного исхода возрастает (OR=5,13 95% ДИ (2,75 - 9,54)).

Мы построили модели логистической регрессии для оценки влияния различных факторов риска (возраст, поражение яичника, ИМТ, вредные привычки, наследственная предрасположенность к онкозаболеваниям, прием КОК, ВМС, ДЦ, количество беременностей, роды, количество АФ, резекции в анамнезе) на успех программы. Были построены логистические модели для каждой комбинации факторов. Выбор наилучшей модели проводился сравнением значения информационного критерия Акаике (AIC – Akaike information criterion). Выбиралась модель с наименьшим значением AIC. Наилучшая модель включает в себя только два параметра: день менструального цикла – ДЦ и количество антральных фолликулов – КАФ. Обе эти переменные оказывают значимое положительное влияние на вероятность успеха программы ОТО IVM.

**Таблица 11. Результаты построения модели логистической регрессии**

<b>Параметр</b>	<b>Коэффициент</b>	<b>P</b>
(Intercept)	-5.805	0.001*
ДЦ	0.154	0.032*
число АФ	3.077	<0.001 *

\*информационный критерий Акаике (AIC – Akaike information criterion)

### **3.6. Оценка зависимости пула яичников от клинико-анамнестических данных**

В данном исследовании, для оценки активности фолликулогенеза у 36 пациенток использовались морфологические критерии, 26 женщин составили первую группу и 10 вторую (табл.12,13). Таким образом, мы решили проверить, имеет ли морфологический подсчет плотности фолликулов прогностическую значимость в зависимости от факторов, влияющих на исход программы ОТО IVM.

Точный тест Фишера не выявил значимых различий между группами с поражением яичника и без по результату программы ( $p = 0.655$ ): при поражении яичника успешно программа IVМ завершилась в 21 случае из 26 (80.8 %), при отсутствии поражения – в 9 из 10 случаев (90.0 %).

**Таблица 12. Зависимость плотности фолликулов от клиничко-анамнестических данных пациенток в двух исследуемых группах**

	<b>Поражение яичника 1-да (N=26)</b>	<b>Поражение яичника 0-нет (N=10)</b>	<b>P*</b>
N фол приморд (30-40)	7,5 (0,5; 32,75)	2,5 (1; 26)	0,762
N фол первичн (50-60)	0 (0; 1)	0 (0; 0,75)	0,862
N фол вторичн (70-110)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0,878
N фол преантрал (120-200)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	
N фол ран антрал (210-400)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0,121
V ткани, мм <sup>3</sup>	1,01 (0,92; 1,06)	1,06 (0,96; 1,11)	0,367
Плотность фолликулов, фол/мм <sup>3</sup>	8,41 (1,95; 31,51)	4,15 (1,19; 28,84)	0,737
Возраст	32 (27.5; 36.75)	35 (32.75; 39)	0,152
АМГ	2,05 (0,9; 3,34) N=10	5,5 (4,4; 12,65) N=3	0.108
КАФ на 1 яичник	3,25 (0,625; 6)	4 (1; 8,375)	0,455
Кол-во ОКК на 1 яичник	3,5 (0,125; 6,75)	5,25 (2,125; 8,75)	0,194

\*критерий Манна-Уитни

**Таблица 13. Коэффициенты корреляции Спирмена между различными показателями плотности фолликулов и клиничко-анамнестических данных пациенток**

	<b>N фолликулов - Примордиальные (30-40)</b>	<b>V ткани, мм<sup>3</sup></b>	<b>Плотность фолликулов, фолл/мм<sup>3</sup></b>	<b>Возраст</b>	<b>АМГ</b>	<b>КАФ на 1 яичник</b>
V ткани, мм <sup>3</sup>	0.17					
Плотность	<b>0.97</b>	0.16				

фолликулов, фолл/мм <sup>3</sup>						
Возраст	<b>-0.5</b>	-0.12	<b>-0.54</b>			
АМГ	0.04	0.4	0.09	-0.35		
КАФ на 1 яичник	0.29	0	0.35	<b>-0.47</b>	<b>0.62</b>	
Кол-во ОКК на 1 яичник	0.31	0.13	0.34	<b>-0.38</b>	<b>0.62</b>	<b>0.94</b>

Выявлена положительная сильная зависимость между КАФ и количеством ОКК на 1 яичник ( $r=0,98$ ,  $p < 0,001$ ) т.е. чем больше КАФ на 1 яичник, тем больше количество полученных ОКК на 1 яичник (табл. 13).

Выявлена положительная сильная зависимость между уровнем АМГ и количеством ОКК на 1 яичник ( $r=0,62$ ,  $p < 0,001$ ) т.е. чем выше уровень АМГ в сыворотке крови, тем больше количество полученных ОКК на 1 яичник.

Выявлена положительная сильная зависимость между АМГ и КАФ на 1 яичник ( $r=0,62$ ,  $p < 0,001$ ) т.е. чем выше уровень АМГ в сыворотке крови, тем больше количество антральных фолликулов на 1 яичник.

Выявлена обратная умеренная зависимость между плотностью фолликулов и возрастом ( $r=-0,54$ ,  $p < 0,001$ ) т.е. с увеличением возраста, плотностью фолликулов снижается.

Выявлена прямая умеренная зависимость между плотностью фолликулов и количеством ОКК на 1 яичник ( $r=0,34$ ,  $p < 0,001$ ), т.е. чем больше плотность фолликулов, тем больше количество полученных ОКК на 1.

Выявлена прямая умеренная зависимость между плотностью фолликулов и КАФ на 1 яичник ( $r = 0,35$ ,  $p < 0,05$ ) т.е. чем больше КАФ на 1 яичник, тем выше плотностью фолликулов.

Выявлена обратная умеренная зависимость между КАФ на 1 яичников и возрастом ( $r=-0,47$ ,  $p < 0,001$ ) т.е. с увеличением возраста, плотностью фолликулов снижается.

Таким образом, морфологический метод оценки плотности фолликулов очередной раз подтвердил, что с увеличением возраста -

показатели АМГ, плотность фолликулов, количество полученных ОКК снижаются. Выявлена прямая положительная взаимосвязь между АМГ, АФК на 1 яичник и количеством полученных ОКК на 1 яичник.

### **Анализ обобщенных линейных моделей**

Наилучшей моделью для предсказания плотности фолликулов оказывается та, которая учитывает только возраст (Информационный критерий Акаике (AIC=410.32).

### **3.7. Влияние химиолучевой терапии на исходы программы ОТО IVМ**

С целью изучения влияния химиолучевой терапии на функцию яичников и исходов программы ОТО IVМ были проанализированы данные 14 пациенток, 11 из которых составили пациентки с раком яичников и 3 с раком шейки матки. Средний возраст составил 35,7 лет (табл.14), зафиксировано резкое снижение овариального резерва, средний уровень АМГ в сыворотки крови составил 0,23 нг/мл. В этой связи, лишь у 5 из 14 (35%) пациенток удалось выделить незрелые ОКК из яичников, что составило в среднем 2 ОКК на пациентку. Дозревание до стадии зрелого ооцита произошло также в 50% случаев, но при оплодотворении у 1 пациентки получена 1 бластоциста низкого качества, согласно классификации Гарднера (2bc).

**Таблица 14. Исходы программы ОТО IVМ у пациенток с проведенной химиолучевой терапией в анамнезе**

	<b>Объем выборки, n</b>	<b>Среднее/ Медиана</b>	<b>Стандартное отклонение/ (Q1; Q3)</b>	<b>Мин. значение</b>	<b>Макс. значение</b>
Возраст	14	35.71	4.66	29	43
АМГ	6	0.23	0.17	0.07	0.46
ИМТ	14	21.00	(20.00; 24.75)	18.00	38.00
День цикла	14	11.57	8.25	0.00	29.00
КАФ	14	1	(0;2)	0	7
Число ОКК	14	0	(0;1)	0	5
Кол-во МП	14	0	(0;0.75)	0	2

Крио МП	14	0	(0;0)	0	2
Кол-во бластоцист	14	0	(0;0)	0	1

\*Для нормально распределенных величин ( $p > 0.05$  в критерии Колмогорова-Смирнова) указаны среднее и стандартное отклонение, для не нормально распределенных величин ( $p < 0.05$  в критерии Колмогорова-Смирнова) указаны медиана и первый и третий квартили.

### **3.8. Ведение пациенток после лечения основного заболевания и методы реализации репродуктивной функции**

Несмотря на то, что криоконсервации генетического материала добились 59 (49%) пациенток, доля женщин, вернувшихся к репродуктологу на консультирование для дальнейшей тактики ведения и достижения беременности составила 18,7% (11/59). Это аргументировано тем, что с момента лечения основного онкологического заболевания не прошла 5-летняя выживаемость и крайне редко кому позволено междисциплинарным консилиумом реализовать репродуктивный потенциал менее, чем через два года после хирургического этапа лечения. Для проведения программы суррогатного материнства обратились 8 пациенток и 3 из них на данном этапе находятся в активном поиске подходящей женщины для вынашивания ребенка. Для решения вопроса о собственной беременности и вынашиванию ребенка обратились 3 пациентки.

Программа переноса размороженных эмбрионов в полость матки проведена лишь у 2 пациенток из 59 (3,9%), которым удалось криоконсервировать свой генетический материал.

В первом случае, пациентка обратилась для проведения программы сохранения фертильности в возрасте 42 лет. После проведенного хирургического лечения по месту жительства и пересмотра стекол препаратов в условиях Центра, был выставлен диагноз гранулезоклеточная опухоль яичника взрослого типа стадии T1aNxM0. Уровень АМГ в сыворотки крови у данной пациентки не был выявлен, однако количество антральных фолликулов достигало 6 на 1 яичник диаметром до 8 мм. На 10

день менструального цикла пациентке проведена лапароскопия, биопсия эндометрия, адгезиолизис, аднексэктомия справа, мультифокальная биопсия брюшины, биопсия левого яичника, субтотальная оментэктомия. После овариэктомии, яичник был передан в лабораторию ЭКО и при препарировании ткани яичника было идентифицировано 9 незрелых ОКК, из которых 8 (88,8%) дозрело до стадии МП при помощи технологии IVМ и были криоконсервированы. После прохождения реабилитационного периода, пациентка обратилась для проведения размораживания ооцитов и их оплодотворения спермой анонимного донора. В ходе эмбриологического этапа разморозилось 8 ооцитов (100%), из них нормально оплодотворилось методом ИКСИ 2 (25%) ооцита. После предварительной подготовки пациентки и междисциплинарного консилиума, на котором по результатам анамнестических и представленных клинических данных противопоказаний к достижению беременности методами ВРТ не было выявлено, произведен перенос двух эмбрионов на 3 сутки развития в полость матки без технических сложностей. На 10-й день после переноса эмбрионов, было проведено лабораторное исследование на уровень в-ХГЧ в крови и результат оказался отрицательным (<1,2 МЕ/л).

Во втором клиническом случае, пациентка обратилась для проведения программы сохранения фертильности в возрасте 30 лет. По месту жительства на основании жалоб пациентки и результатов клинико-лабораторных обследований была произведена лапароскопия, аднексэктомия справа, биопсия большого сальника, брюшины малого таза, верхнего этажа брюшной полости. По результатам гистологического исследования выставлен диагноз - пограничная серозная опухоль правого яичника T3bN0M0, имплантационный метастаз пограничной серозной опухоли яичников, пограничная серозная опухоль левого яичника. В результате пересмотра стекол препаратов в условиях Центра и учитывая рецидив основного процесса, пациентке на 6 день менструального цикла было проведено хирургическое лечение в объеме - лапароскопия, аднексэктомия слева, оментэктомия, тазовая

перитонэктомия. После овариэктомии, яичник был передан в лабораторию ЭКО и при препарировании ткани яичника было идентифицировано 3 незрелых ОКК, из которых 3 (100%) дозрело до стадии МП при помощи технологии IVM. Пациентка изъявила желание сразу оплодотворить полученные зрелые ооциты спермой мужа. В результате эмбриологического этапа было оплодотворено 3 (100%) ооцита методом ИКСИ, в результате чего был получен 1 эмбрион на стадии бластоцисты с последующей его криоконсервацией. После предварительной подготовки пациентки и междисциплинарного консилиума, на котором по результатам анамнестических и представленных клинических данных противопоказаний к достижению беременности методами ВРТ не было выявлено, произведен перенос одного размороженного эмбриона в полость матки без технических сложностей. На 10-й день после переноса эмбрионов, было проведено лабораторное исследование на уровень б-ХГЧ в крови и результат также оказался отрицательным ( $<1,2$  МЕ/л).

#### **ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ**

Несмотря на то, что заболеваемость онкологией выше у пациентов старше 50 лет, достаточно резко растет число пациентов молодого возраста. В связи с этим, растет число женщин, нуждающихся в помощи медицинских специалистов в области репродукции для сохранения фертильности и продолжения рода [85].

Спрос на программы онкофертильности с каждым годом вызывает больший интерес, связанный с доступностью и разнообразием методов сохранения генетического материала. В частности, это затрагивает пациенток репродуктивного возраста, которые нацелены на преодоление основного заболевания с последующей реализацией репродуктивного потенциала. Рождение здорового ребенка является залогом успешного завершения программы онкофертильности, однако результативность до сих пор остается низкой. Зачастую, стандартные методы лечения бесплодия с помощью ВРТ у

онкологических пациенток не всегда удается провести благополучно. Ряд факторов, препятствующие этому - вид и стадия онкологического процесса, распространенность опухолевого роста, возраст, уровень овариального резерва и незамедлительное лечение в виде хирургического этапа или гонадотоксичной терапии.

Гинекологические опухоли представляют собой гетерогенную группу злокачественных новообразований у женщин, которые различаются между собой патологическими особенностями, клиническими проявлениями, подобранной тактикой и методами лечения [86]. Однако все виды гинекологического рака потенциальной приводят к потере фертильности. Стандартом лечения является хирургия (как радикальная, так органосохраняющая) и комбинированное лечение (хирургия, лекарственное лечение, лучевая терапия). Эти методы сохранения жизни онкологических больных имеют потенциал окончательного повреждения репродуктивной способности [89]. Также, в стандартных методах лечения гинекологического рака часто требуется удаление органов репродуктивной системы, в связи с чем остро встает вопрос о сохранение генетического материала, что может стать сложной задачей для пациентов. Сохранение фертильности является ключевым компонентом лечения рака, влияющее на дальнейшее качество жизни женщин репродуктивного возраста.

Согласно международным клиническим рекомендациям, пациенты нуждаются в консультировании по поводу бесплодия перед прохождением онкологического лечения [88,89]. Инновационные программы сохранения фертильности дают возможность женщинам родить в будущем своего биологического ребенка. Каждая из них нуждается в индивидуальной консультации мультидисциплинарных специалистов, совместно с которыми будет принято решение о выборе метода сохранения фертильности, оценке преимуществ, рисков и безопасности проведения данных методов.

Например, Кампос и др. сообщили о 100% участников своего исследования, которые планировали решить вопрос беременности в будущем



[92]. Картер и соавт. обнаружили, что проблемы с фертильностью влияли на решения о методах лечения рака у четверти выживших пациенток, в то время как большинство из них заявили о недостатке времени для благополучного завершения деторождения. У данной категории пациенток материнство воспринималось как наивысшее значение в жизни после прохождения лечения основного заболевания. Однако, почти половина беспокоится об эффективности своего лечения, которое возможно может повлиять на здоровье будущее потомство [70]. Также, женщины жалуются на избегание сексуальной активности и попыток естественного зачатия, связанное со страхом рецидива онкологического процесса [91].

Также, Картер и соавт. в своем исследовании описывают переживание пациенток в связи с отсутствием достаточного осведомления о методах сохранения фертильности [90]. Большинство выживших пациенток после достижения ремиссии гинекологического рака были ознакомлены с программой суррогатного материнства, проинформированы про трансвагинальную пункцию для получения и криоконсервации ооцитов. Получение собственных ооцитов рассматривали 31% (16/51) онкологических пациенток, в то время как 61% (31/51) обсуждали вопрос донорства ооцитов и 53% (27/51) считали суррогатное материнство вполне реальным вариантом рождения собственного генетического ребенка. Однако 76% (36/51) из данной категории пациенток заявили, что было бы приемлемо изучить альтернативы, такие как усыновление ребенка. Данный вариант был наиболее реальным и перспективным среди выживших пациенток после гинекологического рака, за которым следовали суррогатное материнство и использование донорских яйцеклеток.

Достаточно часто, при проведении программы онкофертильности, время между первым визитом пациентки к специалисту в области репродукции и завершением самой программы, часто ограничено и составляет от нескольких дней до нескольких недель [92]. Самая короткая продолжительность программы сохранения фертильности зарегистрирована

у шести пациенток с гинекологическим раком, у которых прошло всего 24 часа между консультацией врача-репродуктолога и хирургическим лечением основного заболевания [93]. По мере того, как выживаемость больных раком улучшается, спрос на сохранение фертильности растет. Тем не менее, сохраняется несколько противоречий относительно использования программы IVМ в области онкофертильности.

Технология *in vitro* дозревания ооцитов была разработана и применена в практику у пациентов с поликистозными яичниками, как альтернативный щадящий метод сохранения фертильности без применения гормональной стимуляции яичников. Однако, спустя годы, большой интерес возник о решении вопроса сохранения генетического материала у девочек пубертатного возраста и у пациенток с онкологическими заболеваниями. В настоящее время, выживаемость пациенток с различными нозологиями онкологических заболеваний составляет 80% [94]. Среди женщин с гинекологическим раком, 20% составляют женщины с нереализованной репродуктивной функцией [67]. По мере того, как выживаемость пациентов после лечения рака значительно улучшилась, спрос на программы сохранения фертильности значительно вырос. Основной целью онкологического лечения является продление жизни пациентов, поэтому большинство врачей не задумываются о будущей социальной жизни женщин, стараясь в кратчайшие сроки начать химиолучевую терапию. На сегодняшний день, самым распространенным, эффективным и зачастую единственным методом лечения рака является лучевая или химиотерапия. Как известно, эти методы подавляют функцию яичника и значительно снижают качество ооцитов. Таким образом, женщины, выжившие после онкологического заболевания, теряют надежду на реализацию репродуктивного потенциала с собственным генетическим материалом.

Наиболее распространенным видом онкологических заболеваний у женщин является рак молочной железы, и он затрагивает треть женщин репродуктивного возраста. Вопрос о сохранении генетического материала

перед основным лечением встает ребром, когда, зачастую, стимуляция функции яичников гонадотропинами противопоказана при эстроген-зависимых видах рака. Также, ограничение во времени и сроках для начала хирургического или химиолучевой терапии является препятствием для врача-репродуктолога. Как известно, стимуляция функции яичников гонадотропными препаратами зависит от дня менструального цикла и занимает не менее двух недель. При всей готовности репродуктологов помочь данной категории пациентов, врачи-онкологи не готовы подвергать риску жизни пациентов и отказывают в проведении стандартных программ сохранения фертильности.

Исходя из вышеизложенного, в сохранении собственного генетического материала пациентам с онкологическими заболеваниями органов репродуктивной системы могут помочь новые инновационные программы онкофертильности. Технология IVМ известна со времен начала ВРТ и разрабатывалась в основном для пациентов с синдромом поликистозных яичников, а также для предотвращения гиперстимуляции функции яичников и снижения затрат, связанных с овариальной стимуляцией [94]. Однако, спустя годы, были разработаны протоколы с заменой триггера овуляции или сегментацией цикла и криоконсервацией генетического материала с целью предотвращения риска возникновения синдрома гиперстимуляции яичников.

Технология ОТО IVМ недавно была разработана одновременно с криоконсервацией ткани яичника после овариэктомии, чтобы обеспечить дополнительные шансы на беременность. Несомненно, что метод дозревания незрелых ОКК *in vitro* имеет большие перспективы применения в клинической практике как вариант сохранения фертильности у онкологических пациенток. Следует еще раз подчеркнуть тот факт, что ОТО IVМ используется в тех случаях, когда нет альтернативных вариантов иметь генетически родного ребенка, прежде всего у молодых женщин, имеющих

раком яичников. Данная технология – их единственная надежда и несомненна необходимость дальнейшей работы в этом направлении.

На первом этапе мы хотели описать больных, которым показан данный метод сохранения фертильности и в исследование вошли 120 пациенток с различными видами и стадиями онкологических заболеваний органов репродуктивной системы (до 43 лет), направленных на консультацию онкогинеколога. Основные 2 группы пациенток были выделены по наличию или отсутствию неопластических процессов в яичниках как на этапе диагностирования основного заболевания, так и по результатам гистологического исследования после хирургического этапа лечения. Каждой из них были противопоказаны стандартные методы ВРТ с целью криоконсервации генетического материала. Мы поставили задачу определить клиничко-анамнестические критерии, характеристики овариального резерва и онкологических заболеваний, которые являются предикторами выделения незрелых ооцит-кумулясных комплексов из ткани яичника с последующим их дозреванием *in vitro*. Для получения заявленных результатов мы оценивали анамнез пациенток, овариальный резерв, наличие неопластического процесса в яичниках или резекции яичников в анамнезе. Именно эти факторы, по нашему мнению, могут быть определяющими в предсказании исходов программы ОТО IVМ.

Таким образом, обобщая этап исследования, нам удалось выделить клиничко-лабораторные и клиничко-анамнестические предикторы исхода программы ОТО IVМ, а именно – возраст, день менструального цикла, отсутствие поражения яичников, отсутствие химиолучевой терапии в анамнезе, отсутствие резекций яичников в анамнезе, уровень АМГ в сыворотки крови, количество антральных фолликулов по данным УЗИ, а также использование эмбриологических сред дозревания полученных ОКК до стадии зрелых ооцитов (МII).

В ходе данного исследования, при оценке анамнестических данных была выявлена наследственная предрасположенность к онкологическим

заболеваниям у 40/120 пациенток (48%). Каждой женщине проведено хирургическое лечение основного заболевания, сопровождающееся односторонней овариэктомией у 47/120 (39%) пациенток и двусторонней овариэктомией у 73/120 (61%) пациенток. Извлечение яичников подразделялось на 3 метода – лапаротомия с извлечением через брюшную полость в 29/120 (24%) случаев, под контролем лапароскопии с извлечением через троакарное отверстие и использованием стерильного мешочка у 55/120 (46%) пациенток и через влагалище при гистерэктомии с придатками у 36/120 (30%) женщин. Каждый отдельный случай не повлиял на дополнительное повреждение овариальной ткани, также, как и время транспортировки, которое осуществлялось в стерильном контейнере с буферным раствором в достаточно короткое время (до 15 минут) после извлечения яичников.

Немаловажный фактор, влияющий на исходы программы ОТО IVМ является наличие оперативных вмешательств на ткань яичника в прошлом, его резекция, коагуляция, а также биопсия здоровой ткани яичника. Следует отметить, что в данном исследовании односторонней овариэктомией подверглись 73/120 (61%) пациентки, однако 30 (41%) из них уже была проведена овариэктомия коллатерального яичника в анамнезе. Это говорит о том, что у 59% (43/73) женщин потенциально есть возможность зачать ребенка естественным путем. Однако существует ряд ограничений для этого, таких как, предстоящее химиолучевая терапия, продолжительный период восстановления и ремиссия основного заболевания, согласие междисциплинарных специалистов, а также репродуктивный потенциал оставшегося яичника. У 20,5% (15/73) пациенток проведена резекция коллатерального яичника, что также резко снижает овариальный резерв. Шансы на естественное зачатие крайне невелики, что еще раз подтверждает факт необходимости сохранения генетического материала заблаговременно до прохождения лечения основного заболевания. И здесь мы снова приходим

к тому, что, зачастую, у пациенток с онкологическими заболеваниями органов репродуктивной системы нет достаточно времени на проведение стандартных методов сохранения фертильности.

Ряд авторов описывают исходы ВРТ в зависимости от возраста пациенток. В нашем исследовании мы также проанализировали зависимость возраста и исходы программ ОТО IVM. По нашим данным, у пациенток до 37 лет программа завершалась успехом в 80.4 % случаев (у 74 из 92 пациенток), против пациенток после 37 лет, для которых составила 60.7 % (17 из 28 пациенток). Распределение пациенток по возрастному критерию объясняется диагностированным онкологическим заболеванием органов репродуктивной системы в большинстве случаев после 30 лет. Лишь у 25/120 (20,8%) пациенток возраст на момент проведения программы ОТО IVM составил от 14 до 29 лет.

Немаловажный критерий для определения прогноза исходов программы ОТО IVM является уровень АМГ в сыворотки крови. В нашем исследовании средний уровень АМГ в группе пациенток без поражения яичников составил 2,4 нг/мл и в группе с поражением яичников составил 1,09 нг/мл. Однако медианное значение уровня АМГ у пациенток с успешным исходом составило 2,11 нг/мл (0.82; 3.38), а при безуспешном исходе – 0,84 (0.22; 2.08) нг/мл. Исходя из этого, мы получили прогностическую модель для предсказания успеха/неуспеха программы ОТО-IVM, в которой уровень АМГ в сыворотки крови должен составлять не менее 2,3 нг/мл.

В ходе данного исследования мы не смогли добиться наступления беременности у пациенток с онкологическими заболеваниями органов репродуктивной системы, как описывают наши коллеги о первом живорождении после проведения программы IVM незрелых ооцит-кумулюсных комплексов, полученных из удаленного яичника [72]. Однако, криоконсервация генетического материала в виде ооцитов или эмбрионов уже гарант успеха у данной категории пациенток.

Получение качественных клеток является крайне актуальным, особенно при выделении их из ткани удаленного яичника. В нашем исследовании, мы смогли доказать, что полученные незрелые ооцит-кумуляные комплексы с последующим дозреванием в условиях *in vitro* могут пройти дальнейший эмбриологический этап до развития бластоцисты наравне с ооцитами, полученных при трансвагинальной пункции в стандартных программах ВРТ. Наглядным примером оказалось получение нами эуплоидного эмбриона у пациентки 30 лет с раком яичников IVa стадии, а также рождение здоровых детей у ряда авторов [73].

Согласно рекомендациям Европейского общества репродуктивной медицины (ESHRE) требуются дальнейшие исследования, посвященные изучению качества ооцитов после IVМ, а также долгосрочные наблюдения за детьми, рожденными после применения указанной технологии [41].

## ВЫВОДЫ

1. У женщин с гинекологическим раком и не пораженными яичниками имеются статистически более высокие показатели овариального резерва: уровень АМГ в сыворотке крови (2,40 (1,09; 4,29)); число антральных фолликулов (8 (4; 18),  $p < 0,001$ ), независимо от нозологической формы рака.

2. Хирургические манипуляции на яичниках, а также овариэктомии в анамнезе чаще встречаются у пациенток с повторно пораженными яичниками 47,5% (57/120), что значительно снижает возможность качественно идентифицировать ооцит-кумулюсные комплексы из ткани яичника.

3. У пациенток с гинекологическими видами рака и отсутствием неопластических процессов в яичниках удается выделить незрелые ооцит-кумулюсные комплексы в 97,3%, в группе с поражением яичников в 66,3%.

4. Успех программы ОТО IVM (криоконсервация генетического материала) зависит от возраста пациентки: до 37 лет в 80,4% случаев ( $p=0.044$ ), старше 37 лет в 60,7 %.

5. Предиктором успеха программы ОТО IVM является уровень АМГ в сыворотке крови не менее 2,11 нг/мл (0,82; 3,38); безуспешный исход имеет место при уровне АМГ 0,83 нг/мл (0,22; 2,08).

6. Плотность фолликулов, определяемая по результатам морфологического исследования ткани яичника коррелирует с уровнем АМГ в сыворотке крови, числом антральных фолликулов в яичниках и снижается с увеличением возраста.

7. Все изученные среды дозревания IVM среды работают с одинаковой эффективностью, однако тенденцию к улучшенному дозреванию ОКК проявляют среды САРА-IVM, средний процент дозревания ооцитов до стадии МII составил 50,58%.



8. Формированием бластоцист в программе ОТО IVМ происходит в 17% случаев и не зависит от нозологической формы рака и наличия поражения яичников.

9. Химиолучевая терапия ухудшает исход программы ОТО IVМ.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Пациенткам с гинекологическим раком, желающим сохранить генетический материал перед проведением лечения основного заболевания, рекомендована консультация врача-репродуктолога для выбора метода и целесообразности проведения программы сохранения фертильности.

2. Следует провести клинико-лабораторное и клинико-инструментальное обследование пациенток для выявления факторов, влияющих на исход программы ОТО IVМ – уровень АМГ в сыворотки крови, подсчет антральных фолликулов при помощи УЗИ, а также оценить клинико-anamнестические данные пациенток.

3. Программу ОТО IVМ следует проводить пациенткам моложе 37 лет с уровнем АМГ не менее 2,11 нг/мл и с наличием антральных фолликулов в яичниках по данным клинико-инструментальных методов исследований.

4. Для исключения неблагоприятного исхода программы ОТО IVМ, рекомендовано проводить технологию пациенткам до химиолучевой терапии.

5. Учитывая недостаточность данных о рождении детей после программы ОТО-IVМ, рекомендовано проводить преимплантационное генетическое тестирование эмбрионов на анеуплоидии (NGS, секвенирование высокого разрешения).

6. Последующее консультирование пациенток, после прохождения реабилитации, рекомендовано проводить совместно с междисциплинарными специалистами для оценки риска вынашивания беременности.

7. Эмбриологам, планирующим выполнять программы ОТО-IVМ необходимо пройти соответствующее обучение.

8. Программу ОТО IVМ можно проводить в любой день менструального цикла.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АМГ – антимюллеров гормон

ВРТ – вспомогательные репродуктивные технологии

ИГХ – иммуногистохимия

ИКСИ –intracytoplasmic sperm injection (ICSI), интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида в ооцит

ИМТ – индекс массы тела

ЛГ – лютеинизирующий гормон

ОКК – ооцит-кумулюсные комплексы

ОШ – отношение шансов

ПНЯ – преждевременная недостаточность яичников

ПЦР – полимеразная цепная реакция

СПКЯ – синдром поликистозных яичников

ТТГ – тиреотропный гормон

УЗИ – ультразвуковое исследование

КАФ – количество антральных фолликулов

ФСГ – фолликулостимулирующий гормон

ХГЧ – хорионический гонадотропин человека

ЭКО – экстракорпоральное оплодотворение

AFC – antral follicle count, количество антральных фолликулов

E2 – эстрадиол

IVM – in vitro maturation, in vitro дозревание

ОТО-IVM – ovarian tissue oocyte – in vitro maturation

FIGO - The International Federation of Gynecology and Obstetrics (международная федерация акушеров-гинекологов)

TNM – tumor, nodule, metastasis (международная классификация определения стадий и прогрессирования онкологических заболеваний)

FSS – fertility sparing surgery (операция по сохранению фертильности)

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Searching for evidence of disease and malignant cell contamination in ovarian tissue stored from hematologic cancer patients /D. Meiorow [ et al.] // Human Reproduction. – 2008. – Vol. 23. – P. 1007–1013.
2. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: a review / J. Donnez [ et al.] // Human Reproduction Update. – 2006. – Vol. 12.- P. 519–535.
3. Anderson, R. A. Antimüllerian hormone, the assessment of the ovarian reserve, and the reproductive outcome of the young patient with cancer/ R. A. Anderson W. H.B. Wallace // Fertility and Sterility. – 2013. – Vol. 99. – P. 1469–1475.
4. De Vos, M. Fertility preservation in women with cancer / M. De Vos, J. Smits, T. K. Woodruff // The Lancet. – 2014.-Vol. 384.- P. 1302–1310.
5. Occasional involvement of the ovary in Ewing sarcoma / R. Abir [et al.] // Human Reproduction. - 2010.- Vol. 25. – P. 1708–1712.
6. Minimal residual disease detection of leukemic cells in ovarian cortex by eight-color flow cytometry / C. Amiot [et al.] // Human Reproduction.2013. – Vol. 28. – P. 2157–2167.
7. Autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue in cancer survivors and the risk of reintroducing malignancy: a systematic review / L. Bastings [et al.] // Human Reproduction Update. – 2013. – Vol. 19. – P. 483–506.
8. Risk of transferring malignant cells with transplanted frozen-thawed ovarian tissue / M. –M. Dolmans, V. Luyckx, J. Donnez [ et al.] // Fertility and Sterility. – 2013. Vol. 99. – P. 1514–1522.
9. Rosendahl, M. The safety of transplanting cryopreserved ovarian tissue in cancer patients: a review of the literature / M. Rosendahl, T. Greve, C. Y. Andersen // J Assist Reproduction Genet. – 2013. – Vol. 30. – P. 11–24.
- 10.Meiorow, D. The effects of radiotherapy and chemotherapy on female reproduction / D. Meiorow // Human Reproduction Update. – 2001. – Vol. 7. – P. 535–543.

- 11.Reimplantation of cryopreserved ovarian tissue from patients with acute lymphoblastic leukemia is potentially unsafe /M. –M. Dolmans, [et al.] // Blood. -2010. –Vol. 116. – P. 2908–2914.
- 12.Psychology of infertility and assisted reproductive treatment: the Italian situation / SG. Vitale, VL. La Rosa, AM. Rapisarda [ et al.] // J Psychosom Obstetrics Gynecology. – 2017. – Vol.38, N 1. – P.1-3.
- 13.Angarita AM, Johnson CA, Fader AN, Christian- son MS. Fertility Preservation: A Key Survivorship Issue for Young Women with Cancer. Front Oncology. 2016. – Vol.6. - P. 102.
- 14.Pretreatment fertility counseling and fertility preservation improve quality of life in reproductive age women with cancer / JM. Letourneau, EE. Ebbel, PP. Katz [ et al.] // Cancer. – 2012. – Vol.118, N 6. – P. 1710- 1717.
- 15.Fertility Preservation for Patients With Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update / Loren, Alison W., B. Pamela, Mangu, Lindsay Nohr Beck [ et al.] // Journal of Clinical Oncology. – 2013. – Vol.31, N 19. – P. 2500–2510.
- 16.Forman, EJ. Pilot survey of oncologists regarding treatment-related infertility and fertility preservation in female cancer patients / EJ. Forman, CK. Anders, MA. // J Reproduction Medicine. – 2009. – Vol.54. – P.203-207.
- 17.Fisch, B. Female Fertility Preservation: Past, Present and Future/ B. Fisch R. Abir // Reproduction. – 2018. –Vol. 156, N1. - F11–F27.
- 18.The implications of reproductive aging for the health, vitality and economic welfare of human societies / S. Bhasin, C. Kerr, K. Oktay [ et al.] // J. Clinical Endocrinology Metabolism. – 2019.
- 19.Chan, J. L. Oncofertility for women with gynecologic malignancies / J.L. Chan E. T. Wang // Gynecologic Oncology. -2017. –Vol. 144. – P.631–636.
- 20.Siegel, R. L. Cancer statistics, 2015, CA Cancer / R.L. Siegel, K.D. Miller, A. Jemal. // J. Clinical. – 2015. –Vol. 6, N 1. – P. 5–29.

21. Potential indications for ovarian autotransplantation based on the analysis of 5,571 autopsy findings of females under the age of 40 in Japan / K. Kyono, M. Doshida, M. Toya [et al.] // *Fertility Sterility*. – 2010. –Vol.93. – P. 2429–2430.
22. [<https://www.cancer.gov/types/ovarian>]
23. American Cancer Society (2016) [[www.cancer.org/cancer/ovariancancer/index](http://www.cancer.org/cancer/ovariancancer/index)]  
Date accessed: 02/04/18
24. McCorkle, R. The silent killer: Psychological issues in ovarian cancer / R. McCorkle, J. Pasacreta, S. T. Tang // *Holistic Nursing Practice*. – 2003. – Vol.17, N 6. – P. 300–308.
25. National Cancer Institute (2014). Recurrent or persistent ovarian epithelial cancer treatment. Available from  
<http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/ovarianepithelial/HealthProfessional/page6>.
26. Borderline ovarian tumors in Sweden 1960–2005: trends in incidence and age at diagnosis compared to ovarian cancer / I. Skirnisdottir, H. Garmo, E. Wilander [ et al.] // *Int J Cancer*. – 2008. –Vol.123. – P.1897–1901.
27. Gershenson, D. M. Fertility-Sparing Surgery for Malignancies in Women / D. M. Gershenson // *Journal of the National Cancer Institute Monographs*. – 2005. – N34. – P. 43–47.
28. Fertility-sparing surgery in high-risk ovarian cancer / A. Ditto, G. Bogani, F. Martinelli [ et al.] // *J Gynecology Oncology*. – 2015. –N 26. – P.350–351.
29. Gynaecologic Cancer Surgery and Preservation of Fertility / E. Bentivegna, A. Maulard, G. Mialhe [ et al.] // *Journal of Visceral Surgery*. – 2018. –Vol. 155. – S.23–S.29.
30. Preservation of Fertility in Surgery of Benign and Borderline Malignant Ovarian Tumors / A. Guillaume, O. Pirrello // *Journal of Visceral Surgery*. – 2018. – Vol. 155. - S.17–S.21.
31. Fertility and borderline ovarian tumor: a systematic review of conservative management, risk of recurrence and alternative options / E. Daraï [et al.] // *Human Reproduction Update*. – 2013. -N 19. –P. 151–166.

32. Taylan, E. Fertility Preservation in Gynecologic Cancers /E. Taylan, K. Oktay // *Gynecologic Oncology*. – 2019. – Vol. 155, N 3. – P. 522–529.
33. Wang T. H, H.S. Wang, Y.K. Soong, Paclitaxel-induced cell death: where the cell cycle.
34. Arrive, L.[et al.] Radiation-induced uterine changes: MR imaging // *Radiology*. – 1989. – Vol.170, 1Pt1. – P.55–58.
35. Treatment outcomes and quality-of- life assessment in a university-based fertility preservation program: results of a registry of female cancer patients at 2 years / AE. Reh, L. Lu, R. Weinerman [et al.] // *J Assist Reproduction Genetic*. – 2011. – Vol. 28, N 7. – P.635-641.
36. AIOM: Scientific Documents [Internet]. Milan: Italian Association of Medical Oncology. c2017. Guidelines "Preservation of fertility in cancer patients"; 2015 [cited 2016 Dec 1]; [about 2 screens].
37. Outcomes of ovarian transposition in gynaecological cancers; a systematic review and meta-analysis / K. Gubbala, A. Laios, I. Gallos [ et al.] // *J Ovarian Res*. – 2014. – N 7. – P.69–79.
38. Сохранение функции яичников в процессе комбинированного лечения рака шейки матки / Ю. С. Сидоренко, Г. А. Неродо, О. Е. Левченко [и др.] // *Опухоли женской репродуктивной системы*. – 2012. – Т 1. - С 113-116.
39. Laparoscopic ovarian transposition before pelvic cancer treatment: ovarian function and fertility preservation / N.S. Moawad, E. Santamaria, A. Rhoton-Vlasak [ et al.] // *J. Minim. Invasive Gynecol*. -2017. – N 24. -28e35.
40. Ovarian function after ovarian transposition and additional pelvic radiotherapy: a systematic review / E.J. Hoekman, E. Broeders, LA. Louwe [ et al.] // *European J Surg Oncology*. – 2019. -N45. - P.:1328–1340.
41. ESHRE Guideline Group on Female Fertility Preservation, Anderson R.A., Amant F., Braat D., D'Angelo A., de Sousa Lopes S.M.C., Demeestere I., Dwek S., Frith L., Lambertini M., Maslin C., Moura-Ramos M., Nogueira D., Rodriguez-Wallberg K., Vermeulen N. ESHRE guideline: female fertility

- preservation. *Hum Reprod Open*. 2020; 2020(4):hoaa052. doi: 10.1093/hropen/hoaa052
42. Steigrad, S. In vitro fertilization surrogate pregnancy in a patient who underwent radical hysterectomy followed by ovarian transposition, lower abdominal wall radiotherapy, and chemotherapy/ S. Steigrad, NF. Hacker, B. Kolb // *Fertility Sterility*. – 2005. – Vol. 83. – P.1547–1549.
43. High survival rate of vitrified human oocytes results in clinical pregnancy / KP. Katayama, J. Stehlik, M. Kuwayama [ et al.] // *Fertility Sterility*. – 2003. –Vol. 80. – P.223-224.
44. Feasibility of ovarian cryopreservation in borderline ovarian tumours / V. Fain-Kahn, C. Poirot, C. Uzan [et al.] // *Human Reproduction*. – 2009. – N 24. – P.850–855.
45. Pavone, ME. Female fertility preservation: a clinical perspective / ME. Pavone, R. Confino, M. Steinberg // *Minerva Gynecology*. – 2016. –Vol.68. – P..458-465.
46. Gemmell, L. C. Triple stimulation (TriStim) before bilateral oophorectomy in a young woman with ovarian cancer: a case report and review of the literature. / L. C. Gemmell, J. D. Wright, P. C. Brady // *Fertility Res and Pract*. – 2020. - N 6. – P. 17.
47. Ex-Vivo Oocyte Retrieval for Fertility Preservation / H. M. Fatemi, D. Kyrou, M. Al-Azemi [ et al.] // *Fertility and Sterility*. – 2011. – Vol. 95.N 5. – P. 1787.e15-1787.e17.
48. Oocyte cryopreservation in two women with borderline ovarian tumor recurrence / F. Filippi, F. Martinelli, E. Somigliana [ et al.] // *Journal Assist. Reproduction // Genetics*. - 2020.
49. Gershenson, DM. Management of borderline ovarian tumours/ dm. Gershenson // *Best Pract Res Clinical Obstetrics Gynecology*. – 2017. - N41. – P. 49–  
Guillaume, A. Preservation of Fertility in Surgery of Benign and Borderline Malignant Ovarian Tumors / A. Guillaume, O. Pirrello // *Journal of Visceral Surgery*. – 2018. – Vol. 155. - S.17–S.21.



50. Fertility preservation in women with borderline ovarian tumours / G. Mangili, E. Somigliana, V. Giorgione [ et.al.] // *Cancer Treat*
51. American Society for Reproductive Medicine. *Fertil Steril.* – 2005. – Vol.83. – P.897–901.
52. Ginsburg, ES. In vitro fertilization for cancer patients and survivors /ES. Ginsburg, EH. Yanushpolsky, KV. Jackson // *Fertility Sterility.* - 2001.- N 75.- P.705–710.
53. Efficacy of in vitro fertilization after chemotherapy / M. –M. Dolmans, D. Demylle, B. Martinez-Madrid [ et al.] // *Fertility and Sterility.* – 2005. – Vol. 83. – P. 897–901.
54. Donnez J, Dolmans MM. Fertility preservation in women // *N Engl J Medicine.* – 2017. – Vol.377. – p. 1657–1665.
55. Silber, S. Ovarian Tissue Cryopreservation and Transplantation: Scientific Implications / S. J. Silber // *J Assist Reproduction Genetic.* - 2016. – Vol. 33, N 12. – P. 1595–1603.
56. Silber, S. Ovarian Tissue Cryopreservation and Transplantation: Scientific Implications / S. J. Silber // *J Assist Reproduction Genetic.* - 2016. – Vol. 33, N 12. – P. 1595–1603.
57. Hormonal and histologic findings in human cryopreserved ovarian autografts. / R. Dittrich, A. Mueller, T. Maltaris [ et al.] // *Fertility Sterility.* – 2009. – Vol. 91. – P.1503–1506.
58. Children born after autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue. A review of 13 live births / J. Donnez, S. Silber, CY. Andersen [et al.] // *Ann Med.* – 2011. – Vol.43. – P.437–450.
59. Donnez, J. Transplantation of Ovarian Tissue / J. Donnez, M. –M. Dolmans // *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynecology.* – 2014. – Vol. 28, N 8. – P. 1188–1197.
60. Outcomes of transplantations of cryopreserved ovarian tissue to 41 women in Denmark /AK. Jensen, SG. Kristensen, KT. Macklon [et al.] // *Human Reproduction.* – 2015. – Vol.30. – P.2838-2845

61. Pregnancies and live births after 20 transplantations of cryopreserved ovarian tissue in a single center / R. Dittrich, J. Hackl, L. Lotz, [ et al.] // *Fertility and Sterility*. 2015. – Vol. 103. –P. 462–468.
62. Fertility preservation and refreezing of transplanted ovarian tissue—a potential new way of managing patients with low risk of malignant cell recurrence. / S. C. Kristensen [et al.] // *Fertility and Sterility*. -2017. – Vol. 107.- P.1206–1213.
63. Meirow, D. Fertility Preservation in Cancer Patients Using Stored Ovarian Tissue: Clinical Aspects: Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity. – 2008. – Vol. 15, N6. – P. 536–547.
64. The definition of IVM is clear—variations need defining / M. De Vos, J. Smitz, J.G. Thompson [ et al.] // *Human Reproduction*. -2016. –Vol. 31. – P. 2411–2415.
65. Revel, A. Oocyte collection during cryopreservation of the ovarian cortex. / A. Revel // *Fertility and Sterility*. – 2003.- Vol. 79. – P. 1237–1239.
66. Pregnancy after in vitro fertilization of human follicular oocytes collected from nonstimulated cycles, their culture in vitro and their transfer in a donor oocyte program\*\*Prize paper, presented at the 45th Annual Meeting of The American Fertility Society, San Francisco, California, November 11 to 16, 1989 / K. Y. Cha [et al.] // *Fertility and Sterility*. – 1991. -N 55. – P. 109–113.
67. Trounson, A. In vitro maturation and the fertilization and developmental competence of oocytes recovered from untreated polycystic ovarian patients / A. Trounson, C. Wood, A. Kausche // *Fertility Sterility*. – 1994. – Vol.62. – P.353-362.
68. Obstetric and perinatal outcome and preliminary results of development of children born after in vitro maturation of oocytes / V. Söderström-Anttila, T. Salokorpi, M. Pihlaja [ et al.] // *Human Reproduction*. – 2006. – Vol. 21. – P. 1508–1513.
69. Growth and development of children conceived by in-vitro maturation of human oocytes /M. Shu-Chi [et al.] // *Early Human Development*. – 2006. – Vol. 82. – P. 677–682.

70. Cryopreservation of in vitro matured oocytes after ex vivo oocyte retrieval from gynecologic cancer patients undergoing radical surgery / C. W. Park [et al.] // *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*. – 2016. – Vol. 43. – P. 119.
71. First pregnancy and live birth resulting from cryopreserved embryos obtained from in vitro matured oocytes after oophorectomy in an ovarian cancer patient. / E. B. Prasath [et al.] // *Human Reproduction*. – 2014. – Vol. 29. – P. 276–278.
72. In vitro maturation (IVM) of oocytes recovered from ovariectomy specimens in the laboratory: a promising “ex vivo” method of oocyte cryopreservation resulting in the first report of an ongoing pregnancy in Europe / I. Segers [et al.] // *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. – 2015. – Vol. 32. – P. 1221–1231.
73. Live birth following in vitro maturation of oocytes retrieved from extracorporeal ovarian tissue aspiration and embryo cryopreservation for 5 years / P. S. Uzelac, A. A. Delaney, G. L. Christensen [ et al.] // *Fertility and Sterility*. – 2015. – Vol.104. – P. 1258–1260.
74. Cryopreservation of euploid blastocysts obtained after fertilization of in vitro matured ovarian tissue oocytes: a case report / A. Kirillova [ et al.] // *J Assist Reproduction Genet*. - 2020.- Vol. 37.- P. 905–911.
75. Live births following fertility preservation using in-vitro maturation of ovarian tissue oocytes / I. Segers [et al.] // *Human Reproduction*. – 2020. –Vol. 35. – P. 2026–2036.
76. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. / J. Donnez, MM. Dolmans, D. Demylle [ et al.] // *Lancet*. – 2004. – Vol. 364. – P.1405-1410.
77. Ovarian transplantation between monozygotic twins discordant for premature ovarian failure / SJ. Silber, KM. Lenahan, DJ. Levine [ et al.] // *N Engl J Med*. – 2005. –Vol.353. – P.58-63.
78. Pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a patient with ovarian failure after chemotherapy / D. Meirow, J. Levron, T. Eldar-Geva [ et al.] // *N Engl J Med*. – 2005. – Vol.353. – P.318-321.

79. Fertility preservation: successful transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a young patient previously treated for Hodgkin's disease / I. Demeestere, P. Simon, S. Emiliani [ et al.] // *Oncologist*. – 2007. - N12. – P.1437-1442.
80. Two successful pregnancies following autotransplantation of frozen/thawed ovarian tissue/ CY. Andersen, M. Rosendahl, AG. Byskov [et al.] // *Human Reproduction*. – 2008. – Vol. 23. – P.2266-2272.
81. 86 successful births and 9 ongoing pregnancies worldwide in women transplanted with frozen- thawed ovarian tissue: focus on birth and perinatal outcome in 40 of these children. / AK. Jensen, KT. Macklon, J. Fedder [ et al.] // *J Assist Reproduction Genetic*. – 2017. – Vol.34. – P.325-336.
82. A review of 15 years of ovarian tissue bank activities / M. –M. Dolmans, P. Jadoul, S. Gilliaux [et al.] // *J Assist Reproduction Genetic*. – 2013. – Vol.30. – P.305–314.
83. Gardner, DK, Schoolcraft WB. In vitro culture of human blastocysts. In: Jansen R, Mortimer D, editors. *Toward Reproductive Certainty: Fertility and Genetics Beyond 1999*. UK: Parthenon Publishing London. -; 1999. -P. 378-388.
84. Full-term pregnancy in breast cancer survivor with fertility preservation: A case report and review of literature / M. Garrido-Marín, PM. Argacha, L. Fernández [et al.] // *World J Clin Cases*. – 2019. – Vol.7, N 1. – P.58–68.
85. The evolving role of the endocannabinoid system in gynaecological cancer. / T. Ayakannu, AH. Taylor, JM. Willets [ et al.] // *Human Reproduction Update*. – 2015. – Vol.21, N 4. – P.517-535.
86. Special issues in fertility preservation for gynecologic malignancies / F. Tomao, F. Peccatori, L. Del Pup [et al.] // *Crit Rev Oncology Hematology*. – 2016. – Vol.97. – P.206-219.
87. Martinez, F. International Society for Fertility Preservation– ESHRE–ASRM Expert Working Group. Update on fertility preservation from the Barcelona International Society for Fertility Preservation-ESHRE-ASRM 2015 expert meeting: indications, results and future perspectives / F. Martinez // *Fertility Sterility*. – 2017. – Vol.108. – P.407-415.e11. 4.

88. Fertility preservation in patients with cancer: ASCO clinical practice guideline update / K. Oktay, BE. Harvey, AH. Partridge [et al.] // *J Clinical Oncology*. – 2018. – Vol.36, N 19. – P.1994-2001.
89. Young women diagnosed with early-stage ovarian cancer or borderline malignancy of the ovary: a focus on fertility and sexual function / SM. Campos, S. Berlin, UA. Matulonis [et al] // *J Psychosoc Oncology*. – 2012. – Vol.30, N 4. – P.387-401.
90. A cross-sectional study of the psychosexual impact of cancer-related infertility in women: thirdparty reproductive assistance // J. Carter, L. Raviv, L. Applegarth [et al.] // *J Cancer Surviv*. – 2010. – Vol.4, N 3. – P.236-246.
91. Repair of the threatened feminine identity: experience of women with cervical cancer undergoing fertility preservation surgery/ H. Komatsu, K. Yagasaki, R. Shoda [et al.] // *Cancer Nurs*. – 2014. – Vol.37, N 1. – P.75- 82.
92. Spontaneous in vitro maturation of oocytes prior to ovarian tissue cryopreservation in natural cycles of oncologic patients / MJ. Escriba, N. Grau, L. Escrich [ et al.] // *J Assist Reproduction Genetic*. – 2012. – Vol.29. – P.1261- 1265.
93. Yin, H. Vitrification of in vitro matured oocytes collected from surplus ovarian medulla tissue resulting from fertility preservation of ovarian cortex tissue/ H. Yin, H. Jiang, SG. Kristensen [ et al.] // *J Assist Reproduction Genetic*. – 2016. – Vol.33. – P.741-746.
94. Fertility considerations in the management of gynecologic malignancies /N. Noyes, JM. Knopman, K. Long M [ et al.] // *Gynecology Oncology*. – 2011. – Vol.120. – P..326-333.

## Приложение 1. Алгоритм реализации репродуктивной функции у пациенток с гинекологическим раком

