

На правах рукописи

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

Автореферат на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва, 2023

Диссертация выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

Гависова Алла Анатольевна - доктор медицинских наук, заведующая 1-м гинекологическим отделением Института репродуктивной медицины ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России

Официальные оппоненты:

Краснопольская Ксения Владиславовна - доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, руководитель отделения репродуктологии ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии»

Калугина Алла Станиславовна – доктор медицинских наук, профессор, ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава России, профессор кафедры акушерства, гинекологии и неонатологии

Ведущая организация: ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России

Защита диссертации состоится «21» ноября 2023 г. на заседании диссертационного совета 21.1.022.01 на базе ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им.В.И. Кулакова» Минздрава России по адресу: 117997, г. Москва, ул. Академика Опарина, д.4.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте на сайте ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им.В.И. Кулакова» Минздрава России <https://science.ncagp.ru/upfiles/pdf/Bunyaeva%20ES-disser.pdf?738069067>

Автореферат разослан «__» _____ 2023 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор медицинских наук, профессор

Е. А. Калинина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности 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%. 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 для сохранения фертильности и продолжения рода (Garrido-Marín M et al., 2019; Grynberg M et al., 2016). Из 100 000 случаев гинекологических злокачественных новообразований, диагностируемых каждый год, 15-20% обнаруживается у женщин до 40 лет (Ferlay et al., 2020). Тем не менее, последствия лечения онкологических заболеваний зачастую приводят к снижению овариального резерва, преждевременному выключению функции яичников или менопаузе (Loren et al., 2013).

Основной тактикой сохранения фертильности в настоящее время до проведения гонадотоксичной терапии является криоконсервация ооцитов и/или эмбрионов, полученных после овариальной (Chan et al., 2017). 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 (Park et al., 2016). В связи с этим, крайне актуальным представляется вопрос о сохранении фертильности у пациенток с онкологическими заболеваниями до проведения хирургического или химиолучевой терапии.

Все виды гинекологического рака потенциальной приводят к потере фертильности. Основное лечение представляет собой хирургический этап и/или консервативную терапию, а также как дополнение к адъювантной терапии в виде облучения малого таза и химиотерапии. Эти методы сохранения жизни онкологических больных имеют потенциал окончательного повреждения репродуктивной способности (Tomao F et al., 2016). 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.

Для пациенток с онкологическими заболеваниями органов репродуктивной системы единственным эффективным способом сохранения фертильности могут служить методы, основанные на дозревании ооцит-

кумулясных комплексов в условиях *in vitro* (IVM), полученных в результате овариэктомии. Технология ОТО IVM (Ovarian Tissue Oocyte IVM или ОТО IVM) подразумевает выделение и работу с ооцит-кумулясными комплексами экстракорпорально, она не несет дополнительных рисков для пациенток в плане переноса атипических клеток, что не исключено при аутотрансплантации ткани яичника (De Roo C et al., 2021; Kirillova et al., 2021). В настоящее время в мировой практике описаны всего три случая наступления беременности с применением технологии IVM после овариэктомии (Prasath, 2014; Uzelac, 2015; Segers, 2015).

Данные исследования указывают на то, что ооциты, полученные после овариэктомии, дозревшие и оплодотворенные *in vitro*, способны к развитию и могут привести к беременности.

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

Все выше изложенное определило актуальность настоящего исследования.

Степень разработанности темы исследования

За последние несколько лет наблюдается растущий интерес к методам сохранения фертильности онкологических больных, что связано с улучшением показателей выживаемости при раке, повышением внимания к качеству жизни онкологических больных в ремиссии, постоянным прогрессом в области вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ). Сегодня в мире используют и апробируют ряд методик, призванных сохранить репродуктивный материал и защитить репродуктивную функцию пациентов от негативного влияния гонадотоксичной терапии (De Vos et al., 2014). Несомненно, что технология дозревания незрелых ооцит-кумулясных комплексов *in vitro* имеет большие перспективы применения в клинической практике как метод сохранения фертильности у онкологических пациенток. Данный метод используется в тех случаях, когда нет альтернативных вариантов иметь генетически родного ребенка.

Все вышесказанное обуславливает необходимость разработки тактики ведения пациенток с онкологическими заболеваниями органов репродуктивной системы, способную обеспечить реализацию репродуктивной функции у этого контингента больных.

Цель исследования

Разработать тактику ведения пациенток с онкологическими заболеваниями органов репродуктивной системы, желающих сохранить генетический материал и реализовать репродуктивный потенциал в будущем, а также определить клиничко-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 клиничко-анамнестических характеристик пациенток (возраст, уровень АМГ в сыворотке крови, количество антральных фолликулов 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 клиничко-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

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 созревания ооцитов, полученных из ткани яичника не влияет на плоидность эмбриона при условии его хороших морфологических характеристик.

Практическая значимость

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.

Материал и методы 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. проведено проспективное (для клинических и лабораторных исследований) и ретроспективное (для выявления факторов риска) исследование 120 пациенток, которые желали реализовать репродуктивный потенциал после хирургического лечения основного онкологического заболевания. Клинико-anamнестический 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.).

Критериями включения в исследование явились: возраст от 15 до 43 лет; 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.

Критериями невключения были: возраст >43 лет; уровень ФСГ ≥ 18 МЕ/мл; опухоли яичников больших размеров >6 см в максимальном измерении; преждевременная недостаточность яичников; наличие хромосомных нарушений в кариотипе, генетические аномалии;

На первом этапе были проанализированы клинико-anamнестические данные 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. По результатам первого этапа было сформировано 2 группы пациенток. I группа - пациентки с наличием неопластического процесса в яичниках (n=83). II группа - пациентки с яичниками без поражения (n=37).

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

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

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

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

Методами исследования явились: сбор анамнестических данных и общеклинические методы исследования; оценка овариального резерва (уровень антимюллерового гормона (АМГ) в крови), количество антральных фолликулов (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.

На хирургическом этапе выбор оперативного доступа осуществлялся в зависимости от нозологической формы онкологического заболевания, предполагаемого объема оперативного вмешательства, определяемого гистологическим типом опухоли и распространенности процесса. Согласно нозологическим формам, всем пациенткам было проведено хирургическое лечение с одно- или двусторонней овариэктомией.

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 коркового слоя яичников, окрашенных гематоксилин-эозином.

На эмбриологическом этапе производилась аспирация ооцит-кумулюсных комплексов (ОКК) из фолликулярной жидкости антральных фолликулов извлеченной овариальной ткани. 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% CO₂ и 5% O₂. Через 48 ч культивирования ОКК помещали в 80 ЕД/мл

раствор гиалуронидазы (Origio, CooperSurgical) и аккуратно пипетировали для удаления кумулюсных клеток. 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).

Всем пригодным эмбрионам проводили биопсию трофэктодермы 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.

Статистическая обработка данных выполнена на индивидуальном компьютере с использованием программы StatSoft Statistica, версия 12.

Исследование было одобрено комиссией по этике биомедицинских исследований ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (протокол №11 от 13 декабря 2018 года).

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 IVM 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 IVM. 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.

Апробация работы

Материалы настоящей диссертационной работы доложены на межклинической конференции ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России 26 июля 2021 г. и заседании апробационной комиссии ФГБУ «НМИЦ АГП им. акад. В.И. Кулакова» Минздрава России 26 июня 2023 г., (протокол № 8).

Внедрение результатов исследования в практику

Результаты исследования внедрены и используются в практической работе отделений института репродуктивной медицины ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (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 12 печатных работ, в том числе 5, входящих в перечень рецензируемых научных изданий, рекомендованных ВАК, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, и 1 патент «Способ выделения и дозревания незрелых ооцит-кумулюсных комплексов, выделенных из яичника после его удаления» (Авторы: Кириллова А.О., Буняева Е.С.).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 3.1.4. Акушерство и гинекология. Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пунктам 1, 2 и 4 паспорта специальности 3.1.4. Акушерство и гинекология.

Степень достоверности полученных результатов

Достоверность выполненного исследования определяется достаточным количеством пациенток, включенных в исследование, применением современных методов обследования и статистической обработки данных.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена в традиционной форме на 110 страницах машинописного текста, состоит из следующих разделов: оглавление, список сокращений, введение, обзор литературы, главы собственных исследований, обсуждение полученных результатов, выводы, практические рекомендации и список литературы. Рукопись иллюстрирована 35 рисунками и содержит 14 таблиц. Список используемой литературы включает 95 русскоязычных и англоязычных работ. Дополнительные материалы включают 1 приложение.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

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.

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 одинокими и им было предложено воспользоваться спермой анонимного донора для оплодотворения полученных ооцитов, однако все пациентки отказались и приняли решение криоконсервировать собственный генетический материал.

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.

Уровень АМГ в сыворотки крови был проанализирован суммарно у 81 пациентки и составил 1,41 нг/мл. В группе пациенток с пораженными яичниками уровень АМГ проанализирован у 58 пациенток, и средней значение составило 1,09 нг/мл, во второй группе 2,4 нг/мл у 23 женщин. Данные показатели указывают на значительную разницу между уровнем АМГ

в двух группах, что потенциально может указать на будущий прогноз исхода программы ОТО IVМ.

Количество антральных фолликулов 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. В группе с поражениями яичников отмечалось их 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 ($p < 0.001$)).

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.

Все яичники, доставленные в эмбриологическую лабораторию в буферном растворе,

в кратчайшие сроки 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. После выделения ооцит-кумулюсных комплексов, происходило их дозревание в условиях *in-vitro* в течение 48 часов. Далее оценивалось качество ооцитов. 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 у 89/120 (74,16%) женщин.

В ходе данного исследования были обнаружены высокие положительные корреляции между уровнем АМГ и числом полученных ОКК из ткани яичника ($r=0,776$ $p < 0,001$).

Кроме того, оценивалась значимость получения незрелых ОКК из ткани удаленного яичника от клинично-анамнестических данных. 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 гинекологическими операциями в анамнезе.

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

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 ($p=0,010$).

Был проведен сравнительный анализ числа полученных незрелых ОКК у пациенток с наличием неопластического процесса в яичниках и без такового. У пациентов без поражения яичников значимо выше шанс успеха получения ооцитов по сравнению с теми, у кого яичник был поражен ($p < 0.001$). 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 %).

Общее число полученных ОКК составило 954, и в среднем на 1 пациента составило 10,7 ооцитов. 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 МП, однако прослеживается тенденция к увеличенному числу полученных ОКК у группы без поражения яичников.

Далее мы проанализировали, существует ли зависимость доли дозревших до стадии МП ооцитов от общего числа полученных ОКК и от выбранной среды IVМ. Средний процент дозревания ооцитов до стадии МП составил 50.58% (SD = 26.52). Статистически значимых различий между видами сред в частоте полученных успешных результатов не выявлено ($p > 0,05$).

В 52, 2% случаев (498/954) произошло дозревание незрелых ОКК до стадии МП, что составило в среднем, 5,6 зрелых ооцита на одного пациента. Общее число криоконсервированных ооцитов МП составило 255/498, и в среднем на 1 пациентку составило 5,3 зрелых ооцитов. Оплодотворение методом ИКСИ произведено с 238/498 ооцитами 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 у 13 пациенток, что составило 14,08%, 12 (60%) из которых были пригодны к криоконсервации и у 1 (8,3%) произведена биопсия трофэктодермы для проведения ПГТ-а. Данный эмбрион оказался генетически пригодный к переносу в полость матки по результатам преимплантационного тестирования (seq(1-22)x2,(X,Y)x1).

Нами была получена отличная прогностическая модель для предсказания успеха/неуспеха программы ОТО IVМ, площадь под кривой AUC=0,945±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)) (Рисунок 1).

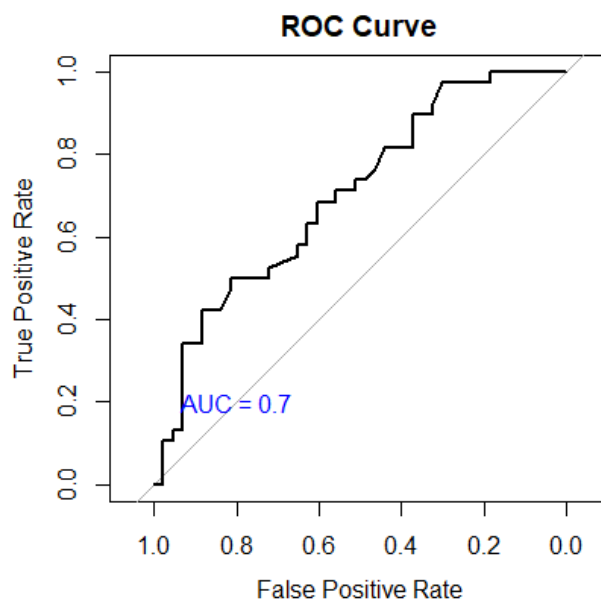


Рис. 1. - ROC-анализ уровня АМГ в сыворотки крови в отношении исхода программы ОТО IVМ

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. 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.

В данном исследовании, для оценки активности фолликулогенеза у 36 пациенток использовались морфологические критерии, 26 женщин составили первую группу и 10 вторую (Таблица 1, 2). Таким образом, мы решили проверить, имеет ли морфологический подсчет плотности фолликулов прогностическую значимость в зависимости от факторов, влияющих на исход программы ОТО IVМ.

Таблица 1 - Зависимость плотности фолликулов от клиничко-анамнестических данных пациенток в двух исследуемых группах

	Поражение яичника 1-да (N=26)	Поражение яичника 0-нет (N=10)	P*
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 ³	1,01 (0,92; 1,06)	1,06 (0,96; 1,11)	0,367
Плотность фолликулов, фолл/мм ³	8,41 (1,95; 31,51)	4,15 (1,19; 28,84)	0,737
	Поражение яичника 1-да (N=26)	Поражение яичника 0-нет (N=10)	P*
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

* медиана (интерквартильный интервал), критерий Манна-Уитни

Таблица 2 - Коэффициенты корреляции Спирмена между различными показателями плотности фолликулов и клинико-анамнестических данных пациенток

	N фолликулов - Примордиальные (30-40)	V ткани, мм ³	Плотность фолликулов, фолл/мм ³	Возраст	АМГ	КАФ на 1 яичник
V ткани, мм ³	0.17					
Плотность фолликулов, фолл/мм ³	0.97	0.16				
Возраст	-0.5	-0.12	-0.54			
АМГ	0.04	0.4	0.09	-0.35		
КАФ на 1 яичник	0.29	0	0.35	-0.47	0.62	
Кол-во ОКК на 1 яичник	0.31	0.13	0.34	-0.38	0.62	0.94

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.

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

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, 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 3).

Таблица 3 - Исходы программы ОТО IVМ у пациенток с проведенной химиолучевой терапией в анамнезе

	Объем выборки, n	Среднее/ Медиана	Стандартное отклонение/ (Q1; Q3)	Мин. значение	Макс. значение
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

*критерий Колмогорова-Смирнова, $p > 0.05$ среднее и стандартное отклонение для нормально распределенных величин, медиана и первый и третий квартили для не нормально распределенных величин

Технология ОТО IVМ недавно был 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 рак яичника. Данная технология – их единственная надежда и несомненна необходимость дальнейшей работы в этом направлении.

В данное исследование вошли 120 пациенток с различными видами и стадиями онкологических заболеваний органов репродуктивной системы (до 43 лет), направленных на консультацию онкогинекологом. Основные 2 группы пациенток были выделены по наличию или отсутствию поражения яичников как на этапе диагностирования основного заболевания, так и по результатам гистологического исследования после хирургического этапа лечения.

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.

В ходе данного исследования не были достигнуты беременности у пациенток с онкологическими заболеваниями органов репродуктивной

системы. Однако, криоконсервация генетического материала в виде ооцитов или эмбрионов уже гарант успеха у данной категории пациенток.

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 IVМ (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 IVМ 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 IVМ среды работают с одинаковой эффективностью, однако тенденцию к улучшенному дозреванию ОКК проявляют среды САРА-IVМ, 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 клиничко-лабораторное и клиничко-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 клиничко-анамнестические 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Эффективность дозревания ооцитов, полученных в ходе овариэктомии, у онкологических пациенток / Е.В. Ковальская, А.О. Кириллова, **Е.С. Буняева**, Г.Н. Хабас, Н.С. Камалетдинов, Т.А. Назаренко, А.Н. Абубакиров // **Акушерство и гинекология**. – 2019. – №9. – с. 87-91.
2. Potential for fertilization and blastocyst formation of in vitro matured oocytes recovered from excised ovaries in oncological patients / A. Kirillova, E. Kovalskaya, E. Bunyaeva, G. Khabas, A. Ekimov, N. Kamaletdinov, N. Mishieva, T. Nazarenko, A. Abubakirov // Abstracts from the 2019 ISFP meeting in NYC. - 2019. - New York, USA. - p. 1006
3. The first case report of the euploid blastocyst cryopreservation obtained after fertilization of in vitro matured ovarian tissue oocytes in a cancer patient / A. Kirillova, E. Kovalskaya, O. Brovkina, A. Ekimov, E. Bunyaeva, M. Farmakovskaya, M. Goediev N., Mishieva, T. Nazarenko, A. Abubakirov // XV Ovarian Club meeting. – Hong Kong. - 2019.
4. The developmental potential of the in vitro matured oocytes recovered from excised ovaries in oncology patients: a pilot study / E. Kovalskaya, A. Kirillova, N. Kamaletdinov, E. Bunyaeva, G. Khabas N. Mishieva, T. Nazarenko, A. Abubakirov// Abstracts of the 35th Annual Meeting of the ESHRE. - 2019. - Vienna, Austria – p. 351.
5. In vitro maturation of ovarian tissue oocytes as a new method of fertility preservation in postpubertal girls / A. Kirillova, E. Kovalskaya, E. Bunyaeva, G. Khabas, N. Kamaletdinov, Y. Kiseleva, N. Mishieva, T. Nazarenko, A. Abubakirov // ESHRE Campus Edinburgh 2019. Fertility preservation in children and adolescents: the next frontier. - 2019. - Edinburgh, United Kingdom.
6. Сохранение фертильности у пациенток с диагностированным во время беременности онкологическим заболеванием / А.О. Кириллова, **Е.С. Буняева**, Е.В. Ковальская, Н.С. Камалетдинов, Г.Н. Хабас, М.Д. Фармаковская, Е.А. Сироткина, Н.Г. Мишиева, Т.А. Назаренко, А.Н. Абубакиров // **Акушерство и гинекология**. - 2020. – №4. – с. 59-64.
7. Характеристики и тактика ведения онкологических больных, нуждающихся в сохранении репродуктивного материала / Т.А. Назаренко, Л.А. Ашрафян, А.М. Бирюкова, А.О. Кириллова, Я.О.

- Мартиросян, Л.Г. Джанашвили, **Е.С. Буняева** // **Акушерство и гинекология.** – 2020. – №11. – с. 93-99.
8. Cryopreservation of euploid blastocysts obtained after fertilization of in vitro matured ovarian tissue oocytes: a case report / A. Kirillova, E. Kovalskaya, O. Brovkina, A. Ekimov, E. Bunyaeva, M. Gordiev, N. Mishieva, T. Nazarenko, A. Abubakirov, G. Sukhih // *Journal of assisted reproduction and genetics.* – 2020. - Vol. 37, № 4. - p. 905–911.
 9. Современные методы сохранения фертильности у пациенток с онкологическими заболеваниями органов репродуктивной системы / **Е.С. Буняева**, А.О. Кириллова, Г.Н. Хабас, А.Н. Абубакиров, Н.Г. Мишиева // **Акушерство и гинекология.** – 2021. – №7. – с. 45-52.
 10. Improved maturation competence of ovarian tissue oocytes using a biphasic in vitro maturation system for patients with gynecological malignancy: a study on sibling oocytes / A. Kirillova, E. Bunyaeva, H. Ranst, G. Khabas, M. Farmakovskaya, N. Kamaletdinov, T. Nazarenko, A. Abubakirov, G. Sukhih, J. Smitz // *Journal of assisted reproduction and genetics.* - 2021. - № 38(6). – p. 1331-1340.
 11. Feasibility of in vitro maturation of oocytes collected from patients with malignant ovarian tumors undergoing fertility preservation / E. Bunyaeva, A. Kirillova, G. Khabas, A. Asaturova, N. Mishieva, T. Nazarenko, A. Abubakirov, G. Sukhih // *International journal of gynecological cancer: official journal of the International Gynecological Cancer Society.* – 2021. - № 31(3). – p. 475–479.
 12. Показания и эффективность технологии получения незрелых ооцит-кумулюсных комплексов из ткани яичника с последующим их дозреванием *in vitro* / **Е.С. Буняева**, А.О. Кириллова, Т.А. Назаренко, Л.Г. Джанашвили, К.К. Гаджимагомедова, Г.Н. Хабас, А.М. Бирюкова, А.А. Гависова // **Акушерство и гинекология.** – 2022. – №6. – с. 75-82.
 13. Кириллова А.О., **Буняева Е.С.** Способ выделения и дозревания незрелых ооцит-кумулюсных комплексов, выделенных из яичника после его удаления. **Патент на изобретение № 2745425** от 25 марта 2021 г (заявка № 2020129262 от 4 сентября 2020 г).

ПРИЛОЖЕНИЕ

Алгоритм реализации репродуктивного потенциала у пациенток с гинекологическим раком



Подписано в печать: 19.09.2021

Формат А5

Объем: 1,0 усл.п.л.

Бумага офсетная. Печать цифровая

Тираж: 100 экз. Заказ № 1307532-10-23

Типография ООО “МДМпринт” 117485,

Г. Москва, Миклухо-Макляя, 47а

Тел. 8-495-256-10-00 (доб.256)