

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
федеральное государственное бюджетное учреждение
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ЦЕНТР АКУШЕРСТВА, ГИНЕКОЛОГИИ И ПЕРИНАТОЛОГИИ ИМЕНИ
АКАДЕМИКА В.И. КУЛАКОВА»

На правах рукописи

МАРТИРОСЯН

Яна Ованнесовна

СОХРАНЕНИЕ РЕПРОДУКТИВНОГО МАТЕРИАЛА
ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ: ОТБОР ПАЦИЕНТОВ И ТАКТИКА
ВЕДЕНИЯ

3.1.4. – Акушерство и гинекология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научные руководители:

д.м.н., профессор Назаренко Т.А.

академик РАН, д.м.н., профессор Ашрафян Л.А.

Москва – 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ	2
ВВЕДЕНИЕ	5
Актуальность темы исследования	5
Степень разработанности темы исследования	7
Цель исследования	8
Задачи исследования:	8
Научная новизна.....	9
Практическая значимость	9
Положения, выносимые на защиту	9
Личный вклад автора	10
Соответствие диссертации паспорту полученной специальности	11
Апробация материалов диссертации.....	11
Внедрение результатов исследования в практику.....	12
Структура и объем диссертации.....	12
ГЛАВА 1. РЕШЕНИЕ ПРОБЛЕМЫ СОХРАНЕНИЯ РЕПРОДУКТИВНОЙ ФУНКЦИИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ В ПРАКТИКЕ ВЕДУЩИХ СТРАН МИРА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	13
1.1. Влияние лечения онкологического заболевания на состояние репродуктивной системы больных	18
1.2. Методы сохранения репродуктивной функции, их эффективность и безопасность	23
1.3. Протоколы стимуляции функции яичников у онкологических больных. Сравнительная характеристика полученных ооцитов	29
1.4. Подходы к стимуляции функции яичников у больных раком молочной железы	36
1.5. Возможные патогенетические обоснования стимуляции независимо от дня менструального цикла	40
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	45
2.1. Материал исследования	45

2.1.1. Группы пациенток	46
2.2. Дизайн исследования	48
2.3. Конечные точки	50
2.4. Критерии включения и невключения в исследование	51
2.5. Методы исследования	51
2.5.1. Мониторирование индуцированного цикла	53
2.5.2. Гормональное обследование	53
2.5.3. Овариальная стимуляция и трансвагинальная пункция фолликулов	54
2.5.4. Овариальная стимуляция и трансвагинальная пункция фолликулов у больных раком молочной железы	54
2.5.5. Эмбриологический этап	55
2.6. Статистический анализ полученных данных.....	56
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	58
3.1. Клинико-лабораторная характеристика пациенток.....	58
3.1.1. Клинико-лабораторная характеристика пациенток, направленных до лечения онкологического заболевания	58
3.1.2. Клинико-лабораторная характеристика пациенток, направленных после лечения онкологического заболевания	66
3.1.3. Клинико-лабораторная характеристика пациенток, направленных на программу IVF	67
3.2. Характеристики проведенного лечения в программах ЭКО/ИКСИ в зависимости от локализации онкологического процесса	68
3.2.1 Характеристики оогенеза и раннего эмбриогенеза у пациенток в исследуемых группах	70
3.3. Характеристика протоколов стимуляции в зависимости от фазы менструального цикла.....	74
3.3.1. Динамические гормональные показатели индуцированных циклов	75
3.3.2. Характеристики оогенеза и раннего эмбриогенеза у пациенток исследуемых групп	78

3.4. Характеристика протоколов стимуляции с добавлением ингибиторов ароматазы	81
3.4.1. Гормональные параметры индуцированных циклов с добавлением ингибиторов ароматазы	83
3.4.2. Характеристики оогенеза и раннего эмбриогенеза в модифицированных протоколах с добавлением ингибиторов ароматазы	86
3.5. Характеристики оогенеза и раннего эмбриогенеза у пациенток с BRCA-мутацией	90
3.6 . Возможное патогенетическое обоснование стимуляции в разные фазы и дни менструального цикла	92
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ	96
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	108
ВЫВОДЫ	109
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	111
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	113
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	117

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Специалисты ведущих стран мира считают обеспечение качества жизни онкологических больных приоритетным направлением медицинской науки и практики. Это, с одной стороны, связано с ростом количества пациентов с онкологическими заболеваниями, особенно среди детей и лиц молодого возраста, с другой – с несомненными достижениями онкологии, позволяющими диагностировать процесс на ранних стадиях, эффективно лечить заболевание, что способствует значительному увеличению показателей выживаемости.

В Российской Федерации в 2019 году выявлено 348 894 случаев злокачественных новообразований у пациенток женского пола. Годовой прирост данного показателя составил 2,5 % [5, 6].

В Российской Федерации рак молочной железы является ведущей онкологической патологией у женского населения (21,2%). Заболеваемость среди пациенток в возрасте до 40 лет составляет 5,8% от общей популяции больных раком молочной железы [6].

Значительный вклад в структуру онкологической заболеваемости женщин вносят также злокачественные новообразования органов репродуктивной системы (38,8%) [6].

Определенные социальные тенденции, а именно: откладывание деторождения на поздний репродуктивный возраст, малодетность, увеличение интергенетических интервалов между рождением детей, отказ от грудного вскармливания, по всей видимости, являются факторами, способствующими росту частоты встречаемости рака молочной железы и гинекологических заболеваний у женщин репродуктивного возраста. Немаловажную роль могут играть ожирение, малоподвижный образ жизни, стрессы и психоэмоциональные нагрузки, сопровождающие работающую женщину [1, 155].

Так, в ряде работ незначительный рост заболеваемости раком молочной железы (примерно на 0,3% в год) с 2004 года, по крайней мере частично, объясняется продолжающимся снижением рождаемости и откладыванием деторождения на более поздний срок, а также увеличением частоты встречаемости ожирения, которое также может способствовать продолжающемуся росту заболеваемости раком матки (1,3% в год в период с 2007 по 2016 годы [96, 101, 105, 131]).

По данным Siegel et. al., без учета стадии онкологического заболевания, самая высокая выживаемость в США наблюдается при меланоме кожи (92%) и раке молочной железы у женщин (90%), а самая низкая – при обнаружении рака поджелудочной железы (9%), печени (18%), легких (19%) и пищевода (20%) [25, 123, 155, 167, 170]. Также, 5-летняя выживаемость больных РМЖ – около 85% и выше в Канаде, Австралии, Израиле, Бразилии и большинстве северных и западноевропейских стран. В развивающихся же странах она составляет 60% и ниже [167].

Известно, что лечение онкологических заболеваний предполагает использование химио-, а также лучевой терапии, что позволяет спасти жизнь заболевшему, но в подавляющем большинстве случаев приводит к потере репродуктивной функции вследствие ятрогенной преждевременной недостаточности яичников, возникающей из-за прямого влияния химиотерапевтических препаратов на ДНК ооцитов, приводящего к атрезии фолликулов [56].

Вышеизложенное послужило основанием для формирования нового междисциплинарного направления в медицине, которое в англоязычной литературе получило название онкофертильность [185].

Широкомасштабные междисциплинарные исследования, проведенные во многих странах мира, позволили выделить группы больных с часто встречающимися формами рака, которые нуждаются в сохранении

репродуктивной функции. Среди женщин моложе 40 лет наиболее распространенными показаниями для сохранения фертильности являются гематологические злокачественные новообразования (лимфома Ходжкина, неходжкинская лимфома, лейкоз) и рак молочной железы [11, 13, 28, 60].

Главным постулатом, сформулированным специалистами, является необходимость сохранения репродуктивного материала с целью отсроченного деторождения у молодых пациентов с онкологическими заболеваниями до начала гонадотоксичной терапии, что закреплено в международных документах и клинических рекомендациях [76, 104].

Это направление интенсивно развивается во всех странах мира, которые достигли несомненных успехов в формировании тактики ведения онкологических пациентов, нуждающихся в сохранении репродуктивной функции [172].

Степень разработанности темы исследования

В большинстве стран сформированы клинические рекомендации, отражающие основные вопросы сохранения репродуктивной функции онкологических больных. Представлены нозологические формы заболеваний, определены онкологические показания и характеристики репродуктивной системы приемлемые для программ предварительного забора и криоконсервации репродуктивного материала, обозначены способы получения и сохранения репродуктивного материала [16, 69, 75, 152].

Вместе с тем, многие тактические и практические вопросы этой дисциплины далеки от окончательного решения. Проблема особенно актуальна для нашей страны, в которой до настоящего времени нет рекомендаций, регламентирующих тактику сохранения репродуктивного материала у этой категории больных.

В клинической практике отсутствуют надежные алгоритмы принятия решений, касающихся применения ВРТ у онкологических больных, учитывающие методики лечения основного заболевания, состояние овариального резерва и

данные анамнеза, такие как: возраст, сопутствующие патологии, бесплодие в анамнезе - что подчеркивает необходимость проведения исследований в этом направлении. Отсутствуют данные о степени влияния онкологического заболевания на исходы контролируемой овариальной стимуляции, не обозначены особенности оогенеза, эмбриогенеза при различных локализациях онкологического процесса.

Цель исследования

Разработать и обосновать тактику сохранения репродуктивного материала у онкологических больных с использованием вспомогательных репродуктивных технологий.

Задачи исследования:

1. Изучить структуру онкологических заболеваний у пациенток, направленных для сохранения репродуктивного материала и определить методы ВРТ для отдельных групп больных.
2. Оценить показания для проведения стимуляции яичников в программах ВРТ и исходы контролируемой овариальной стимуляции у пациенток с различными онкологическими нозологиями.
3. Разработать протоколы стимуляции, независимые от фазы менструального цикла, основываясь на показателях овариального резерва, параметрах фолликуло-, оогенеза, стероидогенеза и определить наиболее благоприятный день менструального цикла для начала стимуляции яичников.
4. Оценить эффективность протоколов стимуляции с применением ингибиторов ароматазы для пациенток с эстрогензависимыми опухолями.
5. Дать патогенетическое обоснование стимуляции яичников в любой день менструального цикла на основании исследования параметров фолликуло-стероидогенеза.

6. Рекомендовать для клинического использования разработанную тактику лечения онкологических пациенток, направленную на сохранение репродуктивного материала для отсроченного деторождения.

Научная новизна

Разработана тактика ведения больных с онкологическими заболеваниями, нуждающихся в сохранении репродуктивного материала для отсроченного деторождения, путем совокупного анализа онкологических и репродуктивных характеристик пациенток. Проанализирована эффективность и безопасность модифицированных протоколов контролируемой овариальной стимуляции, независимых от фазы и дня менструального цикла. Проанализированы особенности исходов овариальной стимуляции у пациенток с различными нозологиями онкологических заболеваний. Выявлены особенности стероидогенеза и оогенеза в индуцированных циклах с использованием ингибиторов ароматазы. Предложено патогенетическое обоснование возможности проведения овариальной стимуляции с любого дня менструального цикла.

Практическая значимость

Разработаны и предложены для клинической практики алгоритмы ведения пациенток с онкологическими заболеваниями, желающих сохранить репродуктивный материал перед гонадотоксичной терапией основного заболевания.

Положения, выносимые на защиту

1. Рак молочной железы, гематологические и гинекологические нозологии рака занимают ведущие места среди пациенток, обращающихся для сохранения репродуктивного материала перед гонадотоксичной терапией. Наличие онкологического заболевания и его нозология при начальных формах рака не

оказывают негативного влияния на количество и качество ооцитов, что обеспечивает получение и сохранение зрелых ооцитов при начальных формах рака, нормальных или высоких показателях овариального резерва.

2. Стимуляцию яичников можно проводить с любого дня цикла в режимах random-start протоколов. При начале стимуляции в раннюю лютеиновую фазу не целесообразно назначать анТГнРГ, используя защитное действие эндогенного прогестерона для предотвращения паразитарных пиков ЛГ.
3. Ингибиторы ароматазы, при включении их в протокол стимуляции больным раком молочной железы, снижают количество зрелых ооцитов, что обуславливает целесообразность использования этих препаратов у пациенток с высокими параметрами овариального резерва, при получении большого числа ооцитов, прогнозируемой гиперстимуляции яичников.
4. Анализ показателей фолликуло-стероидогенеза при стимуляции яичников в любой день менструального цикла позволил предложить патогенетическую концепцию фолликулогенеза и овуляции, рассматривающую менструальный цикл как интеровуляторный, где ключевая роль принадлежит овуляции, а рекрутинг нового пула фолликулов осуществляется не однократно, а два-три раза в течение цикла: в раннюю фолликулярную фазу, которая определяется в день падения уровней половых стероидов (за 2 дня до кровяных выделений), в первый день после овуляции и в период ранней секреторной фазы. Эти точки следует считать благоприятным периодом для проведения овариальной стимуляции.

Личный вклад автора

Автор участвовал в выборе тематики научного исследования, разработке цели, задач и дизайна исследования, в систематизации литературных данных по теме диссертации, изучении клинико-анамнестических данных, результатов обследования и лечения пациенток, включенных в исследование. Автор

самостоятельно осуществлял обследование пациенток и проводил все этапы программ ЭКО. Автором собран материал для исследования, проведен анализ полученного материала, статистическая обработка данных исследования и публикация основных результатов исследования. Сформулированы выводы и рекомендации для практического применения.

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 материалов диссертации

Основные положения научно-исследовательской работы доложены на международных и российских конгрессах: The 6th World Congress of the International Society for Fertility Preservation (ISFP) (Нью-Йорк, США, 2019), XXIX Ежегодная Международная конференции РАРЧ «Репродуктивные технологии сегодня и завтра» (Ростов-на-Дону, Россия, 2019), «Сложный пациент – неординарные решения» (Москва, Россия, 2019), XIV Международный конгресс по репродуктивной медицине (Москва, Россия, 2020), «Репродуктивные технологии в условиях эпидемии COVID-19: новые вызовы и старые проблемы» (Россия, 2020), IV Национальный научно-образовательный конгресс «Онкологические проблемы от менархе до менопаузы» (Россия, 2020), ESHRE 2020 Virtual (онлайн, 2020), XXX Ежегодная Международная конференции РАРЧ «Репродуктивные технологии сегодня и завтра» (Россия, 2020), XXII Всероссийский научно-образовательный форум «Мать и дитя-2021» (Москва, Россия, 2021), Большая конференция RUSSCO «Рак молочной железы» (Москва, Россия 2021), V Национальный научно-

образовательный конгресс «Онкологические проблемы от менархе до менопаузы» (Россия, 2021).

Внедрение результатов исследования в практику

Результаты исследования внедрены и используются в практической работе отделений ФГБУ «НМИЦ АГП им. Академика В.И. Кулакова» МЗ РФ.

По теме диссертации опубликовано 11 печатных работ, из них 7 в научных журналах, входящих в перечень рецензируемых научных журналов и изданий, рекомендованных ВАК.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена в традиционной форме на 137 страницах машинописного текста. Состоит из оглавления, введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и списка литературы. Работа иллюстрирована 26 таблицами и 10 рисунками. Библиографический указатель включает 185 источников, из них 14 отечественных и 171 зарубежных авторов.

ГЛАВА 1. РЕШЕНИЕ ПРОБЛЕМЫ СОХРАНЕНИЯ РЕПРОДУКТИВНОЙ ФУНКЦИИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ В ПРАКТИКЕ ВЕДУЩИХ СТРАН МИРА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Влияние заболевания и его лечения на репродуктивную функцию и эндокринное здоровье следует рассматривать как составную часть первоначального плана комплексной помощи, оказываемой молодым пациентам с онкологическими заболеваниями. На данный момент решение вопроса о защите репродуктивной функции и сохранении репродуктивного материала от потенциального негативного воздействия химио- и лучевой терапии осложняется рядом факторов, среди которых можно выделить возраст пациента, семейное положение, срочность лечения. Осознание риска потери репродуктивной функции вследствие лечения онкологического заболевания является достаточно сложным для пациентов, их родителей и партнеров, которые большую часть своего внимания уделяют именно лечению основного заболевания.

Разговор о репродуктивном здоровье с онкологическими пациентами затрагивает как фундаментальные аспекты функционирования репродуктивной системы, так и этические, религиозные и моральные нюансы [4, 171, 182-185].

Впервые попытки систематизировать данные, касающиеся методов сохранения репродуктивного материала онкологических больных, были предприняты в начале XXI века. В 2007 году по инициативе Woodruff ТК, под эгидой Национального института здравоохранения США, был создан Консорциум по Онкофертильности (ОС). Данное междисциплинарное объединение было создано с целью расширения исследований в области изучения репродуктивной функции у онкологических больных, ускорения внедрения новых способов сохранения фертильности в клиническую практику и решения сложных проблем здравоохранения, касающихся качества жизни молодых пациентов с онкологическими заболеваниями [59, 182].

Миссия Консорциума по онкофертильности – формировать фундаментальные основы для конструктивного диалога между онкологами, репродуктологами и

непосредственно пациентами, а также специалистами в области биоэтики и медицинского права [182, 184]. Основные направления исследовательской деятельности Консорциума – фундаментальные аспекты роста и созревания фолликулов, изучение механизмов формирования преждевременной недостаточности яичников, а также способов медикаментозной защиты фолликулов от повреждающего действия гонадотоксичных агентов, особенности контролируемой овариальной стимуляции у пациенток с онкологическими заболеваниями, криоконсервация яичниковой ткани и извлечение незрелых ооцитов с последующим дозреванием в условиях *in vitro* (IVM).

В США под эгидой консорциума была создана Национальная Ассоциация, которая сегодня представляет 60 центров, занимающихся лечением бесплодия у мужчин и женщин, а также 19 центров, ориентированных на педиатрических пациентов [183].

Наиболее крупные международные организации, занимающиеся вопросами репродуктивного здоровья, а также некоторые онкологические сообщества сформировали клинические рекомендации, освещающие основные вопросы сохранения репродуктивной функции у онкологических больных.

В последние годы ведется активная работа по формированию баз данных, отслеживающих информацию об онкологических пациентах, сталкивающихся с проблемой бесплодия, возникшего в результате лечения онкологических заболеваний. Изучаются демографические данные пациентов, информация о заболевании, характере и длительности лечения. В подавляющем большинстве развитых стран мира созданы собственные национальные регистры и клинические рекомендации [24]. Все больше стран начинают активно финансировать программы, направленные на предварительный забор и сохранение репродуктивного материала онкологических больных [115].

Несмотря на существование ряда клинических рекомендаций и определенного международного опыта в области онкофертильности, вопросов, требующих

решения, больше, чем однозначных ответов, что обуславливает необходимость продолжения исследований в этом направлении что отмечается подавляющим большинством международных исследователей [75, 76, 168].

В нашей стране первая работа, посвященная сохранению репродуктивного материала у молодых женщин, больных раком молочной железы, была опубликована в 2011 году [2, 12]. Данное исследование выполнялось в рамках междисциплинарного сотрудничества НЦ акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И. Кулакова и института онкологии им. акад. Н.Н. Блохина.

С этого времени проводится активная совместная работа репродуктологов и онкологов, направленная на сохранение репродуктивной функции у больных раком шейки матки, раком молочной железы, эндометрия и другими онкологическими нозологиями. Активно ведутся исследования по криоконсервации и трансплантации ткани яичников, по *in vitro* дозреванию ооцитов, полученных трансвагинально или непосредственно из ткани яичника [116].

Вместе с тем, не существует единой национальной программы, отечественных протоколов и рекомендаций по сохранению репродуктивного материала у онкологических больных, что делает этот вид помощи практически недоступным для большинства нуждающихся, особенно проживающих в отдаленных регионах страны. Существует настоятельная необходимость в создании междисциплинарного совета, занимающегося вопросами сохранения репродуктивного материала у онкологических больных молодого возраста и формированием клинических рекомендаций.

Значительным прогрессом в области онкофертильности в России явилось создание междисциплинарного совета по онкофертильности в стенах НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И. Кулакова, которым было сформировано и опубликовано информационно-методическое письмо «Способы сохранения биологического материала для отсроченной реализации

репродуктивной функции у пациенток, имеющих и перенесших онкологические заболевания» [10].

Решение вопроса о наличии показаний для проведения программ, направленных на сохранение репродуктивного материала, лежит в плоскости мультидисциплинарного подхода. Определяющую роль играют перспективы долгосрочного выживания после лечения основного заболевания, характеристики онкологического процесса, а также определение степени гонадотоксичности лечения. При этом, несмотря на существование ряда потенциально безопасных и способствующих сохранению репродуктивной функции способов лечения, таких как органосохраняющие операции при раке шейки матки 1А стадии, длительная консервативная терапия по поводу рака эндометрия 1А стадии и атипичской гиперплазии, длительная гормонотерапия по поводу рака молочной железы, необходимо помнить, что период лечения, реабилитации, в том числе и психологической, требует времени [7, 9, 130]. При этом, если женщина изначально имеет снижение репродуктивных возможностей в силу возраста, низких показателей овариального резерва, наличия гинекологических заболеваний, бесплодия в анамнезе, то это время может быть фатальным для ее дальнейших репродуктивных намерений, что еще раз подчеркивает необходимость совместного определения возможностей каждой пациентки для отсроченного деторождения. Недаром специалистами декларировано, что все медицинские работники должны учитывать возможность преждевременного истощения овариального резерва, вызванного лечением рака, и направлять пациентов, которые желают сохранить фертильность, к врачам репродуктологам как можно скорее, до начала лечения, т.к. на сегодняшний день мы не можем в полной мере предсказать степень гонадотоксичности проводимой терапии и влияние времени лечения на репродуктивные возможности пациентки. Следует заметить, что это утверждение относится не только к заведомо токсичным видам лечения, но и к использованию

длительной терапии гормональными препаратами – антиэстрогенами, агГнРГ, прогестинами, а также к ряду диагностических операций [26, 62, 183].

Созданное направление в медицине постоянно развивается и совершенствуется, накапливается опыт, формируется четкая терапевтическая тактика, разрабатываются и внедряются в клиническую практику новые технологии и способы лечения. Так, несмотря на длительное обсуждение и достаточное число публикаций, методики забора, криоконсервации и трансплантации ткани яичников практически во всех странах относились к разряду экспериментальных [76].

Вместе с тем, у неполовозрелых детей, больных раком, а также в ситуациях, когда нельзя проводить стимуляцию яичников, этот метод является единственно возможным. Вот почему в 2020 году Американская ассоциация репродукции человека зарегистрировала криоконсервацию ткани яичников как клиническую методику.

Нельзя не остановиться на методике IVM – получении незрелых ооцитов трансвагинально или непосредственно из ткани яичников и дозревание их *in vitro*. Метод известен давно, но не стал достойной альтернативой классическому ЭКО в силу худших результатов по частоте наступления беременности. Специалисты связывают это с асинхронным созреванием ядра и цитоплазмы при культивировании незрелого ооцита, однако появились новые среды, при помощи которых возможно преодолеть этот дефект, в силу чего указанная методика может быть перспективной для онкологических больных, т.к. позволит избежать или минимизировать этап стимуляции яичников.

Некоторые специалисты не без оснований считают необходимым использовать все имеющиеся методы сохранения репродуктивного материала, опираясь на тот факт, что в большинстве случаев предварительная консервация является единственно реальной возможностью обеспечить отсроченное деторождение в будущем [59].

В первые годы с момента появления этого направления в медицине, частота возвращения пациентов, т.е. востребованность криоконсервированного материала для реализации репродуктивной функции не превышала 10%, что позволило некоторым специалистам говорить о позитивном психологическом аспекте этих процедур для больных и широких исследовательских поисках для специалистов, а не о реальном клиническом направлении. В последних публикациях показано, что востребованность ранее криоконсервированного материала составляет 35% и неуклонно растет. Очевидна востребованность и клиническая значимость предварительной криоконсервации репродуктивного материала у онкологических больных и необходимость всестороннего развития этого раздела медицины [30, 73, 168].

1.1. Влияние лечения онкологического заболевания на состояние репродуктивной системы больных

Влияние лечения онкологического заболевания на репродуктивную функцию женщины все чаще находит подтверждение в исследованиях. В целом, у женщин после диагностики и лечения онкологического заболевания на 38% снижаются шансы на беременность. При этом, влияние лечения на шанс забеременеть и родить после достижения стойкой ремиссии в значительной степени варьируется в зависимости от диагноза и проведенного лечения [3, 175].

За последние несколько десятилетий рак шейки матки и рак молочной железы оказали наибольшее влияние на сокращение числа наступивших беременностей как вследствие высокой распространенности, так и значительного влияния на состояние репродуктивной системы методов лечения данных заболеваний [38, 44].

В настоящее время существует настоятельная необходимость в разработке методов защиты от разрушительного воздействия химио- и лучевой терапии на состояние репродуктивной системы в целом и овариального резерва в частности, учитывая довольно обширную группу заболеваний, лечение которых

подразумевает использование широкого диапазона химиотерапевтических препаратов, включая алкилирующие агенты (циклофосфамид, бусульфан и другие); алкилирующие агенты на основе платины (цисплатин, антрациклины); таксаны (доцетаксел и другие); ингибиторы топоизомеразы (такие как этопозид); алкалоиды барвинка (включая винкристин).

О влиянии химиотерапевтических препаратов на репродуктивную функцию у женщин начали сообщать в 1970-х годах, первоначально основываясь на результатах, полученных при использовании циклофосфамида, и описывая возникающую в результате лечения аменорею, подавление функции яичников и атрезию фолликулов [55, 57, 121].

Учитывая частое комбинированное использование лекарственных препаратов, изучение влияния каждого конкретного химиотерапевтического агента на овариальный резерв и репродуктивную функцию довольно затруднительно. Считается, что наиболее токсичными по отношению к яичнику являются алкилирующие лекарственные средства [153, 161].

Платиносодержащие препараты также способны индуцировать повреждения в ДНК ооцитов, вероятно опосредовано через тирозинкиназу c-ab1 и активацию p53. Отсроченные эффекты цисплатина проявляются ранними замершими беременностями и повышенной частотой встречаемости анеуплоидий [53, 119, 120].

Антрациклины, такие как доксорубин, индуцируют оксидативный стресс, а также возникновение доминантных летальных мутаций. При этом риск возникновения аменореи после лечения доксорубином у женщин моложе 30 лет, по некоторым данным, минимален, у женщин 30-39 лет составляет 33%, а у женщин 40-49 риск увеличивается до 96% [124].

Влияние алкалоидов, антиметаболитов и других классов химиотерапевтических препаратов на состояние овариального резерва менее изучено и выражено не в столь значительной степени. Исследования на животных

показали влияние лечения алкалоидом барвинка на увеличение частоты возникновения анеуплоидий [113]. При этом клинические исследования не доказали негативного влияния данного химиотерапевтического агента на частоту возникновения преждевременной недостаточности яичников [119].

Еще меньше достоверных сведений имеется о влиянии антиметаболитов на состоянии яичников. На данный момент, учитывая клинический опыт использования метотрексата для прерывания внематочной беременности, можно говорить об отсутствии долгосрочных последствий для репродуктивной функции при использовании антиметаболических препаратов [173].

Также имеются довольно ограниченные сведения о влиянии таксанов на частоту возникновения аменореи после лечения онкологического заболевания. На данный момент в литературе встречаются противоречащие исследования как об отсутствии долгосрочных последствий применения таксанов, так и о задокументированной токсичности таксанов по отношению к яичникам, что в свою очередь проявляется значительным повышением уровня ФСГ после лечения онкологического заболевания и повышенной частотой развития аменореи [23, 58, 97, 100, 174].

Учитывая, что чаще всего в терапии используются комбинации перечисленных лекарственных препаратов, а также индивидуальные особенности пациенток на момент начала лечения, предварительная оценка рисков повреждения яичников чрезвычайно затруднена. На данный момент имеются сведения о некоторых наиболее распространенных комбинациях и протоколах лечения. К менее токсичным относится комбинация ABVD (адриамицин, блеомицин, винкристин и дакарбазин), используемая при лечении лимфом [27, 85]. Напротив, у большинства пациенток с лимфомой применение комбинации COPP (циклофосфамид, винкристин, прокарбазин, преднизолон) впоследствии приводит к преждевременной недостаточности яичников [142].

Имеющиеся в распоряжении клиницистов методы медикаментозной защиты яичников базируются на фундаментальных знаниях, о физиологии формирования яичников и фолликулогенеза, сформулированных в прошлом столетии, а также понятии овариального резерва и динамики его изменения в течение жизни женщины [179].

Овариальный резерв у млекопитающих закладывается на ранних этапах эмбрионального развития, а затем постоянно снижается на протяжении всего репродуктивного периода.

В экспериментальных исследованиях показано, что химиотерапевтические препараты, используемые в онкологической практике, провоцируют изменения в ДНК ооцитов. Двухцепочечные разрывы являются одним из наиболее часто встречаемых повреждений, вызываемых цитотоксичными агентами. Их последствием является либо активация репарации ДНК, либо гибель клеток путем апоптоза [178].

Пути репарации ДНК различаются в зависимости от типа химиотерапевтического агента и могут включать, например, белки pATM, RAD51 или PARP1 [15]. При недостаточной активности механизмов репарации повреждение ДНК вызывает апоптоз, опосредуемый белком p63 (изоформой Tар63), активируемый молекулами ВАХ и Bcl-2 [178].

Почти все классы цитотоксических препаратов вызывают изменения в ДНК гранулезных клеток и/или ооцитов, что опосредует деградацию растущих фолликулов, либо выживание ооцитов с мутацией. Это зачастую манифестируется временной вторичной аменорей [37].

Реже, если оплодотворение происходит во время воздействия лекарственных препаратов, может произойти самопроизвольный аборт, либо сформироваться врожденные аномалии у плода, что тесно связано со сроками воздействия цитотоксических препаратов на ооциты [81].

Существует другая теория, объясняющая гонадотоксичное действие препаратов, согласно которой химиотерапевтические препараты такие как циклофосфамид или цисплатин, вызывают истощение пула фолликулов путем активации чрезмерного роста спящих фолликулов, происходящего одновременно с апоптозом растущих фолликулов [18, 56]. Рекрутирование первичных фолликулов является следствием чрезмерной активации сигнального пути PI3K [171]. Кроме того, цитотоксические агенты разрушают растущие фолликулы, что приводит к снижению секреции АМГ. Поскольку предполагается, что этот гормон ингибирует рекрутирование первичных фолликулов, снижение его уровня усиливает активацию фолликулов и приводит к последующему истощению овариального резерва.

В первом исследовании, раскрывающем эту гипотезу, у первичных фолликулов не было обнаружено признаков апоптоза [56]. Другие исследования, подтвердили эту гипотезу, названную «эффектом выгорания» [46, 80, 157]. Таким образом, эффект выгорания состоит из индукции рекрутирования роста фолликула, опосредованного активацией в пути PI3K/PTEN/Akt, происходящего одновременно с апоптозом крупных фолликулов и приводящего к снижению секреции АМГ. Механизм, посредством которого химиотерапевтические агенты вызывает активацию этого сигнального пути, остается неясным. Это может быть связано с непосредственным воздействием на ооциты и прегранулезные клетки первичных фолликулов [134].

Представленные данные свидетельствуют о том, что несмотря на длительное клиническое применение химиотерапевтического лечения в онкологической практике, механизмы повреждающего действия препаратов на яичники до конца неясны, что в свою очередь объясняет тот факт, что методики медикаментозной защиты до сих пор носят эмпирический характер.

1.2. Методы сохранения репродуктивной функции, их эффективность и безопасность

Сегодня в мире исследуется и апробируется ряд методик, призванных сохранить репродуктивную функцию пациентов до начала гонадотоксичной терапии. Многие из них все еще носят экспериментальный характер. Это криоконсервация и аутотрансплантация яичниковой ткани, IVM, медикаментозная протекция яичников [122, 148, 169].

В последнее время появились работы, в которых специалисты вполне обоснованно считают, что для того, чтобы гарантировать сохранение репродуктивного материала пациенткам с онкологическими заболеваниями, необходимо использовать все имеющиеся возможности и комбинировать различные методики [60].

Один из подходов к сохранению репродуктивной функции заключается в попытках протекции фолликулов от повреждающего действия цитотоксичных препаратов во время лечения онкологического заболевания путем введения специальных лекарственных препаратов. Одним из наиболее распространенных примеров является использования агонистов ГнРГ, которые вводят за 10 дней до начала химиотерапии. Механизм их защитного действия заключается во влиянии на гипоталамо-гипофизарно-гонадную ось и подавлении функциональной активности яичников путем ингибирования активности гонадотропинов [20, 87, 89, 148].

Два мета-анализа, включающих рандомизированные исследования, позволили сделать выводы о снижении риска возникновения преждевременной недостаточности яичников (ПНЯ) при использовании агГнРГ у молодых пациенток больных раком молочной железы, в то время как протективное влияние у пациенток с онкологическими заболеваниями яичников и лимфомами не наблюдалось [19, 64]. Другое же исследование говорит о недостаточной доказательности сведений о протективном значении агонистов [68]. При этом

качества и количества проведенных на данный момент исследований недостаточно, для того чтобы делать однозначные и окончательные выводы.

Широко используемые методы назначения агГнРГ для защиты яичников перед и на фоне химиотерапии, основаны на данных, указывающих на то, что менее зрелые фолликулы в меньшей степени подвержены повреждающим воздействиям проводимого лечения, поэтому «десенситизация яичников», т.е. перевод их в неактивное состояние, может предотвратить или снизить негативные эффекты химиопрепаратов на яичники [86, 89, 148].

Тем не менее, несмотря на довольно длительное применение, нет убедительных данных об эффективности этого метода защиты яичников. Ранее, в том числе и в нашей стране, с той же целью применяли контрацептивы, но сведений об эффективности этих методик практически не существует [166].

В литературе активно рассматриваются новые методы, потенциально способствующие сохранению функции яичников. Обсуждается применение различных протективных агентов: SIP, ингибитора сфингомиелинового апоптотического сигнального пути, иматиниба, ингибитора c-abl апоптотического пути, тамоксифена, которые, помимо супрессии функциональной активности яичников, могут оказывать антиоксидантное действие. Таким образом, вопросы защиты яичников при гонадотоксичном лечении требуют новых фундаментальных исследований.

Другим подходом к сохранению репродуктивной функции у пациенток с онкологическими заболеваниями является криоконсервация ткани яичников. Она требует хирургического вмешательства, а именно удаления ткани яичника (или всего яичника) под общим наркозом. Яичниковая ткань с высокой плотностью фолликулов криоконсервируется и в дальнейшем может быть использована для следующих процедур: 1) ортотопическая (реимплантация в полость таза) или гетеротопическая трансплантация; 2) выделение незрелых фолликулов из коркового слоя для дозревания и оплодотворения *in vitro* [14, 118, 145, 154].

До 2017 года у взрослых пациенток зарегистрировано 130 случаев живорождения после аутотрансплантации криоконсервированной ткани. Однако определение частоты наступления беременности не представляется возможным ввиду отсутствия точной информации о количестве трансплантаций, выполненных на данный момент. Также опубликована информация об одном случае живорождения в результате аутотрансплантации яичниковой ткани, криоконсервированной до менархе. В 2015 году Donnez и соавторы опубликовали исследования, в которые были включены 111 пациенток, частота наступления беременности составила 29% (n=32) [8, 79, 132].

IVM и витрификация ооцитов, полученных из нестимулированных яичников, в настоящее время считается экспериментальной методикой, которая может быть предложена пациенткам в случае необходимости незамедлительного начала терапии, а также при раке и пограничных опухолях яичников. У пациенток с онкологическими заболеваниями при использовании метода *in vitro* дозревания незрелых ооцитов показатель созревания ооцитов составляет 79%, при этом частота наступления клинической беременности на перенос составляет 18-30% [73, 99]. В данной связи, рекомендуется комбинировать IVM с криоконсервацией ткани яичников [54].

Низкая эффективность программ IVM на данный момент объясняется асинхронизмом созревания ядра и цитоплазмы ооцита. Созревание ядра ооцита подразумевает повторную инициацию первого мейотического деления и переход ко второй метафазе. Этот процесс можно разделить на несколько частей, включая возобновление мейоза / разрушение зародышевых пузырьков (GVBD), конденсацию хроматина, образование веретена деления, разделение хромосомы с экстррузией первого полярного тельца и повторную остановку мейоза перед оплодотворением. Созревание цитоплазмы включает метаболические и структурные изменения, которые приводят к успешному оплодотворению и раннему развитию эмбриона. Созревание ооцитов *in vivo* – сложный процесс,

регулируемый гормональными сигналами, окружающими соматическими клетками и секретируемыми факторами транскрипции, регулирующими экспрессию генов. Данный каскад механизмов сложно в полной мере воспроизвести в условиях *in vitro* [63, 78, 83, 128].

На сегодняшний день единственной рекомендованной для клинической практики методикой является криоконсервация ооцитов и эмбрионов перед гонадотоксичной терапией у больных репродуктивного возраста, желающих сохранить функцию деторождения [76, 133].

Для выбора наиболее приемлемой и подходящей методики сохранения репродуктивного материала необходима полноценная оценка характеристик онкологического заболевания и состояния репродуктивной системы. К оцениваемым характеристикам относятся локализация и распространенность онкологического процесса, отсутствие факторов неблагоприятного прогноза, степень гонадотоксичности предполагаемой терапии, общее состояние здоровья больной, репродуктивные характеристики.

Одним из основных противоречий, длительно дискутируемых в литературе, является возможное негативное влияние стимуляции яичников, необходимое для получения достаточного числа ооцитов, на течение онкологического процесса, особенно, если это касается гормонально-зависимых опухолей. На сегодняшний день имеются достаточно убедительные публикации, посвященные этим вопросам. Так, в когортное исследование, проведенное в Стокгольме с 1999 по 2013 гг., посвященное сравнению долгосрочного прогноза у женщин больных раком молочной железы, были включены 188 женщин, прошедших процедуры предварительного забора репродуктивного материала. В сопоставимую по возрасту группу контроля вошли 378 женщин. Не обнаружено доказательств того, что контролируемая овариальная стимуляция с целью предварительного забора репродуктивного материала связана с повышенным риском рецидива рака молочной железы [67].

Было проведено несколько исследований, направленных на оценку влияния онкологического заболевания на овариальную стимуляцию. В одних исследованиях были сделаны выводы о более низком ответе на стимуляцию, по сравнению с контрольными группами (Rodgers RJ et al. 2017), в то время как в других исследованиях эти данные не подтвердились [142, 180].

В исследовании Lubna Pal et al. авторы сравнили исходы контролируемой овариальной стимуляции у 5 пациенток с онкологическими заболеваниями и 12 сопоставимыми по возрасту пациенток из группы контроля, которым проводилась программа ЭКО по трубно-перитонеальному фактору бесплодия [114]. В исследовании не было обнаружено статистически значимой разницы в числе полученных ооцитов, при этом значительно отличалось как количество зрелых ооцитов, так и процент оплодотворения, что может говорить о влиянии онкологического заболевания на процессы оогенеза.

Данные ряда ретроспективных исследований с более крупными объемами выборки также оказались весьма противоречивыми [102, 103, 141, 144, 163], однако мета-анализ перечисленных выше ретроспективных исследований, суммарно включающих 227 циклов, показал снижение как в общем количестве полученных ооцитов ($11,7 \pm 7,5$), так и в числе зрелых ооцитов ($9,0 \pm 6,5$) у пациенток с онкологическими заболеваниями, по сравнению с пациентками из группы контроля ($13,5 \pm 8,4$ и $10,8 \pm 6,7$, соответственно) [139].

Полученные результаты не являются окончательными, так как маленькие объемы выборки пациентов, чрезвычайная гетерогенность характеристик течения основного заболевания, не стандартизированные протоколы стимуляции яичников не позволяют сделать окончательных выводов. Последние исследования, включающие более крупные объемы выборки, показывают сопоставимые исходы овариальной стимуляций, при условии проведения программы до начала гонадотоксичной терапии [142].

В одном из проспективных когортных исследований пациенткам с онкологическими заболеваниями с целью предварительной криоконсервации ооцитов проводилась стимуляция функции яичников по протоколу с антагонистами ГнРГ. Было отмечено, что несмотря на сопоставимое число полученной ооцитов, у онкологических пациентов отмечается сниженное количество зрелых ооцитов [156].

Многими исследователями отмечается, что ввиду значительных различий в характеристиках течения онкологических заболеваний, их эффекты на оогенез необходимо рассматривать по отдельности [22, 43].

В частности, известно, что мутация в гене BRCA1 может ингибировать процессы репарации ДНК, приводя к повреждению ооцитов и снижению овариального резерва [40, 42, 150].

Oktaу et al. впервые зафиксировал влияние мутации в гене BRCA1 на исходы контролируемой овариальной стимуляции у больных раком молочной железы [74].

Также, по данным исследований ситуация не выглядит оптимистично у пациенток с гематологическими нозологиями. Большинство исследователей сходятся во мнении, что еще до воздействия химиотерапии у пациенток с гематологическими онкологическими заболеваниями наблюдается негативное воздействие основного заболевания на овариальный резерв [22, 72, 160].

Главная задача при проведении индукции роста фолликулов у пациенток с гормонально-зависимыми опухолями, прежде всего, раком молочной железы, – не допустить сверхвысоких уровней эстрогенов и в тоже время получить оптимальное количество зрелых ооцитов. В большинстве работ рассматривается опыт использования ингибиторов ароматазы в качестве протективных препаратов [162].

1.3. Протоколы стимуляции функции яичников у онкологических больных. Сравнительная характеристика полученных ооцитов

Выбор протокола для контролируемой овариальной стимуляции у онкологических пациенток базируется на балансе между имеющимся ограниченным временным промежутком и необходимостью получения достаточного количества ооцитов и эмбрионов, пригодных для криоконсервации. Исходя из того, что пациентки обращаются в любой день менструального цикла, сразу же после направления онколога, который, как правило, предоставляет не более 14 дней для забора ооцитов, наряду со стандартным протоколом стимуляции с начала фолликулярной фазы цикла в клинической практике стали разрабатываться и использоваться методики стимуляции в любой день менструального цикла, так называемые «random-start» протоколы [117,140]. Возможность получения зрелых ооцитов при стимуляции в любой день менструального цикла доказана в ряде исследований. Von Wolff и его коллеги были одними из первых, кто продемонстрировал, что стимуляция яичников может безопасно и эффективно начинаться вне ранней фолликулярной фазы [147]. Sonmezer et al. описали ряд случаев, документирующих успех при проведении стимуляции овуляции по random-start протоколу у трех женщин с недавно диагностированным раком молочной железы [157]. Ozkaya и его коллеги опубликовали отчет о случаях, подробно описывающих успешную стимуляцию в лютеиновую фазу у женщин с недавно диагностированной лимфомой Ходжкина [149]. Sakmak et al. показали, что между ретроспективной когортой из 125 женщин, желающих сохранить фертильность до облучения или химиотерапии, не было различий при использовании традиционных протоколов контролируемой овариальной стимуляции и random-start протоколов [66].

В дальнейшем исследователи внедрили стимуляцию в лютеиновую фазу цикла в тактику ведения пациенток с бедным ответом в анамнезе [71]. Так, количество полученных ооцитов, зрелых ооцитов, частота оплодотворения и количество

эмбрионов были статистически значимо больше у пациенток с тенденцией к снижению резерва в случае стимуляции в лютеиновую фазу менструального цикла [108].

В исследованиях Li-Hong Wei et al. было показано, что ооциты, полученные в лютеиновую фазу цикла, показывают более высокий коэффициент оплодотворения *in vitro*. Не было выявлено различий в количестве полученных ооцитов и эмбрионов в зависимости от фазы начала овариальной стимуляции. Тем не менее, частота наступления беременности в группе стимуляции в лютеиновой фазу (46,4%) была значительно выше, чем в группе стимуляции в фолликулярную фазу (в целом – 25,8%; 22,9% – в свежих циклах и 29,6% – при криопереносах) [107].

На данный момент имеется ограниченное количество достоверных сведений о исходах стимуляции функции яичников в лютеиновую фазу менструального цикла. В систематическом обзоре, включающем 8 исследований, проанализированы исходы контролируемой овариальной стимуляции 251 женщин, преимущественно в контексте сохранения фертильности. Отмечается, что циклы стимуляции, начатые во 2-ую фазу менструального цикла, были немного более длительными и требовали более высоких суммарных доз гонадотропинов [65, 146, 180].

В систематический обзор Glujovsky et al. (2020) вошли исследования, анализирующие не только исходы контролируемой овариальной стимуляции в лютеиновую фазу цикла, по сравнению с классическим подходом, но и протоколы стимуляции с любого дня менструального цикла и duo-stim протоколы. Авторами сделаны выводы о целесообразности индукции роста фолликулов с любого дня менструального цикла, а также сопоставимой эффективности модифицированных протоколов по сравнению со стимуляцией в фолликулярную фазу цикла у пациенток со сниженным резервом и у онкологических больных [95, 109].

Несмотря на то, что вопрос эффективности стимуляции с любого дня менструального цикла представляет значительный интерес для исследователей, однозначных сведений об эффективности нестандартных протоколов

контролируемой овариальной стимуляции на данный момент нет. Основные исследования, посвященные вопросу эффективности овариальной стимуляции в разные фазы и дни менструального цикла представлены в таблице № 1.

Таблица 1. Анализ результатов исследований

Авторы	Размер выборки	День начала стимуляции	Продолжительность стимуляции	Количество ОКК	Процент оплодотворения	ЧНБ, %
Von Wolffe et al. 2009	ФФ – 28 ЛФ – 3	С любого дня МЦ	10,6 ± 2,5 11,4 ± 2,6	13,1 10	51,1 60,8	-
Bedoschi et al. 2010	2	17 22	7 7	12 12	83 -	-
Sonmezer et al. 2011	3	14 11 17	9 12 9	9 17 16	87,5 83,3 69,2	-
Nayak et al. 2011	4	- 17 10 10	10 8 10 13	40 24 18 14	96,7 93,3 100 100	-
Sakmak et al. 2013	Ранняя ФФ=93 Поздняя ФФ=13 ЛФ=22	С любого дня МЦ	9,3 (9,0-9,5) 10,5 (9,6-11,4) 11,2 (10,5-12,0)	14,4 13 15,5	72 85 88	-
Buendgen et al. 2013	ФФ=30 ЛФ=10	2-3 19-21	9,1 ± 1,2 11,7 ± 1,6	10 8,8	27 33	30 10
Rashidi et al. 2014	ФФ=11 ЛФ=3	С любого дня МЦ	7,8 ± 1,0 8,7 ± 2,0	7,8	-	-
Martinez et al. 2014	ФФ=9 ЛФ=9	2 15	10,4 ± 1,7 9,9 ± 1,3	16,7 22,5	73,3 76,5	62,5 58,3

Wang et al. 2015	ФФ=2032	2-3	$9,6 \pm 2,0$	3.7	-	43.7
	ЛФ=708	2-3	$8,2 \pm 1,7$	9.1		41.9
		1-3 после ТВП	$10,4 \pm 1,8$	10.9		46.2
Kim et al. 2015	Ранняя	С	11.8 (10–13)	11.5	-	-
	ФФ=6	любого	10.7 (9–14)	18		
	Поздняя	дня МЦ	12.3 (11–13)	9		
	ФФ=11 ЛФ=5					
von Wolffe et al. 2016	Ранняя	1-5	10.8 ± 2.4	11.6	-	-
	ФФ=472	6-14	10.6 ± 2.7	13.9		
	Поздняя	≥ 15	11.5 ± 2.2	13.6		
	ФФ=109 ЛФ=103					
Li et al.2016	ФФ=98	3	$7,8 \pm 4,2$	2.0	-	17.7
	ЛФ=33	1-2 сутки после ТВП	$10,3 \pm 5,5$	2.8		20.0
Cavagna et al. 2017	Ранняя		$10,0 \pm 1,4$	9.2	-	-
	ФФ=11		$9,7 \pm 0,5$	10.9		
	Поздняя		$10,2 \pm 1,2$	13.7		
	ФФ=19 ЛФ=10					
Pereira et al. 2017	Ранняя	С	9.5 (8–11)	13.1	-	-
	ФФ=342	любого	9.5 (8.5–12)	12.7		
	Поздняя	дня МЦ	11.5 (7.5–	13.0		
	ФФ=42		13.5)	13.2		
	ЛФ=59		11 (8–12)			
Sarais et al. 2017	ФФ=80	С	10,6	11.3	-	-
	ЛФ=60	любого дня МЦ	11,4	13.7		

Cavagna et al. 2018	Ранняя ФФ=42 Поздняя ФФ=20 ЛФ=47	С любого дня МЦ	9.9 ± 1.3 9.7 ± 1.3 10.3 ± 1.5	11 10.4 12.8	-	-
Jin et al. 2018	ФФ=52 ЛФ=132	3 1-3 сутки после ТВП	8.9 ± 2.4 11.2 ± 3.0	2 (1-4) 3 (1-5)	89.3 79.4	30.4 40.0
Campos et al. 2018	ФФ=13 ЛФ=13	1-14 15-28	10.6 ± 2.1 10.0 ± 0.4	20.4 18.5	-	-
Muteshi et al. 2018	ФФ=103 Random- start=24	С любого дня МЦ	11.5 (11.2– 12.0) 12.2 (10.7– 13.7)	11.9 12.9	60.5 45.7	-
Zhang et al. 2018	ФФ=231 ЛФ=154	3 2–7 сутки после ТВП	8.1 ± 2.8 11.3 ± 3.6	2.4±1.5 2.7±2.1	80.0 83.9	33.0 28.4

Пиковый уровень эстрадиола в сыворотке крови и количество извлеченных ооцитов не различались в зависимости от фазы цикла, при которой было начато введение ФСГ. Интересно, что ооциты, полученные в циклах, инициированных в лютеиновой фазе, по некоторым сведениям, оплодотворяются более эффективно [146].

Стимуляция функции яичников в лютеиновую фазу цикла дает шанс на созревание значительно более синхронной когорты фолликулов. В свою очередь, начало стимуляции в фолликулярную фазу достаточно часто способствуют

асинхронному росту фолликулов у пациенток с бедным ответом на стимуляцию [49, 176].

В лютеиновую фазу цикла прогестерон и ингибин А, секретируемые желтым телом, ингибируют рост доминантного фолликула, при этом экзогенные гонадотропины индуцируют синхронный рост фолликулов [88].

В рандомизированном контролируемом исследовании Joaquín Llácer¹ et al. были проанализированы исходы контролируемой овариальной стимуляции у пациенток с бедным ответом на стимуляции в анамнезе. Было показано отсутствие статистически значимой разницы между эмбриологическими исходами при стимуляции в лютеиновую фазу цикла, по сравнению с фолликулярной фазой менструального цикла. Так, количество полученных зрелых ооцитов составило $2,1 \pm 2,0$ против $2,6 \pm 2,2$, $p=0,30$), длительность стимуляции – $8,35 \pm 2,8$ против $8,15 \pm 4,1$ дней, $p=0,69$ [110].

Во всех перечисленных выше исследованиях не было получено однозначных выводов о необходимости использования и времени введения ант-ГнРГ при стимуляции в лютеиновую фазу менструального цикла, ввиду недостаточного понимания влияния функционально активного желтого тела на развитие фолликулов. Во многих исследованиях рФСГ и антГнРГ вводили параллельно, начиная с любого дня лютеиновой фазы цикла [98, 110, 143, 147, 157].

Sonmezer et al. в своих исследованиях назначали антГнРГ на 5-й день стимуляции [157]. Для сравнения, Muteshi et al. сообщили о применении ант-ГнРГ в течение 3 дней с последующим приемом ФСГ на 4-й день; прием обоих препаратов продолжался до момента введения триггера [137]. В большинстве исследований описаны «гибкие» протоколы с антГнРГ, в которых назначался антГнРГ при обнаружении фолликулов размером более 12-14 мм [15, 50, 66, 125, 136, 158, 165].

В качестве альтернативного метода описаны протоколы контролируемой овариальной стимуляции в лютеиновую фазу цикла без дополнительного

назначения анТГнРГ [47, 48]. Было высказано предположение, что эндогенный прогестерон, вырабатываемый желтым телом, способен подавлять паразитарные пики ЛГ.

Таким образом, стимуляция яичников в лютеиновую фазу цикла может позволить получить большее количество ооцитов отличного качества при стимуляции в duo-stim протоколах и в случаях крайне ограниченного времени.

Несмотря на большое количество публикаций и явный интерес специалистов к этой методике, однозначных выводов и рекомендаций по проведению стимуляции в любой день менструального цикла пока нет. Связано это как с небольшим числом наблюдений, представленных в отдельных публикациях, так и с достаточно гетерогенной группой анализируемых больных. Более того, в клинических рекомендациях ESHRE 2019 г. сказано, что стимуляция в random-start режимах скорее всего не рекомендуется в стандартных протоколах ЭКО, но в то же время, рекомендуется в urgent ситуациях, при заборе и криоконсервации ооцитов/эмбрионов у онкологических больных. Скорее всего, это можно расценить как недостаток опыта использования отличных от общепринятых протоколов стимуляции [70].

Исследователи признают, что ряд вопросов, касающихся особенностей проведения стимуляции, параметров фолликуло-стероидогенеза, модификации протоколов при проведении стимуляции в режиме random-start протоколов, далеки от разрешения. Более того, получение зрелых ооцитов при стимуляции яичников в любой день менструального цикла поставило перед учеными новые фундаментальные задачи, касающиеся необходимости пересмотра существующей концепции рекрутирования одного пула фолликулов в течение менструального цикла. Исследования в этой области продолжаются [33, 34, 39, 43, 66].

1.4. Подходы к стимуляции функции яичников у больных раком молочной железы

Рак молочной железы является ведущей в мире причиной смерти от онкологических заболеваний у женщин, на его долю приходится 30% злокачественных новообразований. Последние достижения в области скрининга, диагностики и лечения привели к увеличению выживаемости пациенток больных раком молочной железы в последние несколько лет до 91% в развитых странах [19].

Увеличение ожидаемой продолжительности жизни пациентов больных раком молочной железы объясняется адъювантным лечением химиотерапевтическими средствами и гормональной терапией [129].

Важно подчеркнуть, что стимуляция яичников у этих пациентов не задерживает начало химиотерапии [159]. Более того, стимуляция, по-видимому, не является фактором риска рецидива рака [32, 43, 66]. Таким образом, криоконсервация ооцитов или эмбрионов в настоящее время является методом выбора для сохранения репродуктивного материала у больных раком молочной железы [77].

В большинстве исследований и клинических рекомендаций отмечается необходимость проведения стимуляции яичников у больных раком молочной железы на фоне назначения антиэстрогенов и ингибиторов ароматазы. В этом контексте в публикациях наиболее часто рассматривается препарат летрозол и его аналоги.

Летрозол – ингибитор ароматазы, разработанный в 1990-х годах в качестве препарата для терапии пациенток с метастатическим раком молочной железы с положительной экспрессией рецепторов эстрогена. Механизм его действия заключается в блокировании превращения андростендиона в эстрон и тестостерона в эстрадиол [164, 180].

Как селективный и обратимый ингибитор ароматазы, летрозол ингибирует пролиферацию эстроген-зависимых клеток рака молочной железы, способствуя

снижению риска развития рецидива опухоли при применении в качестве долгосрочной терапии [31, 32, 180].

В течение последних 20-ти лет исследователи проводят попытки применения ингибиторов ароматазы в протоколах стимуляции яичников, в том числе, в программах ЭКО. Было показано, что летрозол как антиэстроген может безопасно и эффективно применяется в качестве индуктора овуляции, по аналогии с кломифен цитратом, – благодаря снижению уровня эстрадиола по механизму обратной отрицательной связи стимулируется выработка гонадотропинов гипофизом [127].

Свойство стимулировать рекрутирование и рост фолликулов при сохранении низких уровней E_2 делает летрозол особенно интересным в контексте применения у женщин с E_2 -чувствительными злокачественными новообразованиями (например, рак молочной железы, рак эндометрия), желающих сохранить свой репродуктивный материал [31, 32, 93, 103, 130, 74, 127].

С другой стороны, количество ооцитов, пригодных для криоконсервации, является ключевым моментом при определении шансов на успешную отсроченную реализацию репродуктивной функции, а мнения специалистов о числе и качестве полученных ооцитов при включении в протоколы стимуляции ингибиторов ароматазы довольно-таки противоречивы.

Так, Oktay K. et al. сообщил о большем количестве полученных ооцитов при контролируемой овариальной стимуляции по протоколу с летрозолом, по сравнению с протоколами с применением тамоксифена при раке молочной железы [74]. Однако меньшее количество полученных ооцитов наблюдалось у аналогичной группы больных, использующих модифицированную стимуляцию с летрозолом, по сравнению с группой контроля, в которой стимуляцию проводили по классическим протоколам с гонадотропинами [103], а также по сравнению с пациентками с тройным негативным раком молочной железы, которым также проводилась

стимуляция яичников без добавления ингибиторов ароматазы к гонадотропинам [177].

Во многоцентровом исследовании Revelli et al. авторы сравнивали исходы стимуляции яичников с добавлением ингибиторов ароматазы (летрозол) к гонадотропинам в группе женщин с ER+ раком молочной железы с группой контроля, которую составляли женщины с тройным негативным раком молочной железы, которым проводилась стимуляция яичников по классическим протоколам [100]. Количество зрелых ооцитов было значительно (на 40%) ниже при использовании летрозола. Необходимо отметить, что авторы исследования предупреждают, что причиной высокого процента получения незрелых ооцитов в группе стимуляции с летрозолом может быть раннее введение ХГЧ [112].

С другой стороны, это может быть связано с более низкой чувствительностью яичников у пациентов с E₂-чувствительными опухолями, по сравнению с женщинами с E₂-нечувствительными опухолями, о чем сообщали некоторые исследования [140], в противовес другим данным [29].

Сегодня возникла острая необходимость решения ключевого вопроса использования ингибиторов ароматазы, а именно, сравнения их пользы, заключающейся в снижении преовуляторных уровней эстрогенов в индуцированном цикле и возможного негативного влияния на качество получаемых ооцитов.

Известно, что эстрогены активно стимулируют пролиферацию клеток рака молочной железы при повышенной экспрессии рецепторов к эстрогену в ткани опухоли [45, 82].

До недавнего времени стимуляция яичников для сохранения фертильности была запрещена у женщин с чувствительным к E₂ раком молочной железы из-за возможного стимулирующего воздействия E₂ на прогрессирование рака. Действительно, протоколы, включающие летрозол, были предложены для онкологических пациентов только с целью преодоления этого ограничения и были

связаны со сравнимой частотой рецидивов рака, наблюдаемой для больных раком молочной железы, которые не желали криоконсервации и не подвергались стимуляции яичников [112].

Кроме того, специалисты наблюдали более низкое соотношение E_2 / ооцит при стимуляции яичников по модифицированному протоколу с добавлением летрозолола. Наблюдаемое снижение циркулирующего E_2 у женщин, получавших летрозол, было достаточно значительным – примерно на 70%, по сравнению с уровнями E_2 , наблюдаемыми у пациентов, получавших только гонадотропины.

Оправдан ли риск ухудшения прогноза больных ER+ раком молочной железы при «классической» стимуляции с использованием только гонадотропинов? Пока этот вопрос не решен окончательно. Действительно, предлагаемые доводы в пользу назначения ингибиторов ароматазы носят эмпирический характер, в качестве контраргументов можно выдвинуть следующие: а) неизвестно, в какой степени короткое (несколько дней) воздействие высоких уровней E_2 может повлиять на общий прогноз больных раком молочной железы ER+ [174]; б) неизвестно, какая концентрация E_2 необходима для значительного ускорения пролиферации клеток рака молочной железы ER+.

С одной стороны, введение ингибиторов представляется разумным, нельзя допускать высоких уровней эстрадиола при проведении стимуляции, с другой, обязательное использование ингибиторов для всех больных представляется сомнительным. Ведь преовуляторный уровень эстрадиола может быть и невысоким при сниженных показателях овариального резерва и прогнозируемом малом количестве получаемых ооцитов. В этих случаях применение ингибиторов может еще в большей степени снизить шансы пациентки на успех процедуры. Кроме того, вспомогательная репродукция имеет отработанные и действенные способы снижения риска гиперстимуляции как во время стимуляции, так и после проведения трансвагинальной пункции. Также не известно, какие именно концентрации эстрадиола опасны и в течение какого периода воздействия. Может

ли кратковременное, в течение 4-5 дней, повышение концентраций эстрадиола фатально воздействовать на прогрессирование опухоли? Это вопросы пока не имеют решения, но осторожность необходима, и большинство специалистов руководствуются именно этим принципом, а не научными обоснованиями, что в данном контексте следовало бы признать верной тактикой.

1.5. Возможные патогенетические обоснования стимуляции независимо от дня менструального цикла

Успешное проведение стимуляции яичников в любой день менструального цикла, в режимах так называемых random-start протоколов, создало определенный научный парадокс. Ведь следуя классическим, сформулированным в прошлом столетии представлениям о функции яичников, это невозможно, т.к. считается, что когорта фолликулов, выходящих в гонадотропин-зависимую фазу, рекрутируется один раз в течение цикла, к концу лютеиновой фазы предыдущего цикла. Один фолликул становится доминантным и овулирует, другие атрезируются. На этом принципе основана стимуляция с ранней фолликулярной фазы, которая предотвращает гибель ненужных фолликулов. Это классика стимуляции функции яичников, существующая десятилетия. Оказывается, что клиническая практика последних лет опровергает классические представления о физиологии фолликулогенеза.

В научной и медицинской литературе при описании фолликулогенеза термин «рекрутирование» используется для описания трех совершенно разных с точки зрения физиологии событий: 1) начального периода активации фолликулов, находящихся на стадии покоя; 2) циклического рекрутирования когорты малых антральных фолликулов (2-5 мм) в течение менструального цикла; 3) преимущественного роста доминантного преовуляторного фолликула. Один фолликул из рекрутируемой когорты становится доминантным, в то время как остальные подвергаются атрезии [88, 90, 92]. Точно также термин «селекция»

используются для описания двух различных событий: 1) рекрутирование когорты малых антральных фолликулов; 2) отбор и дальнейший рост одного или нескольких доминантных фолликулов [94].

Для более реального описания функциональной активности яичника и нюансов фолликулогенеза рекомендуется использовать термин «интеровуляторный интервал». Данный термин возник благодаря исследованиям развития фолликулов у домашних животных и используется для описания промежутка времени между двумя последовательными овуляциями [33- 35, 61, 126, 135, 151].

Овуляция, являясь конечным событием в длительном процессе развития фолликула, объективно отражает эндокринную и экзокринную функциональную активность яичников [33, 34]. На данный момент многие исследователи сходятся во мнении, что для более точных и последовательных описаний фолликулогенеза с хронологической точки зрения необходимо использовать именно понятие интеровуляторного интервала, так как менструации являются лишь реакцией эндометрия на отсутствие имплантации эмбриона и весьма косвенно позволяет судить о функциональной активности яичника.

Следует признать, что в исследованиях эстрального цикла у животных достигнут большой прогресс и сформированы революционные гипотезы, которые долгое время не вызывали интереса в области репродукции человека.

На данный момент были предложены три различные теории рекрутирования фолликулов [35].

- 1) Теория непрерывного рекрутинга. Исследования, проведенные изначально на млекопитающих, в первую очередь на крупном рогатом скоте, привели к выводу о непрерывно происходящем рекрутинге фолликулов, вне зависимости от уровней ФСГ и ЛГ [36, 91].
- 2) Теория циклического рекрутинга, которая в свою очередь подразделяется на теорию единичного эпизода рекрутирования за цикл, в соответствии с

которым когорта из антральных фолликулов диаметром 2-5 мм лишь единожды за менструальный цикл (или интеровуляторный интервал) отбирается для дальнейшего развития или апоптоза, а также «волновую» теорию фолликулогенеза.

- 3) Теория «волнового» рекрутинга. Сторонники «волновой» теории фолликулогенеза считают, что несколько когорт или «волн» антральных фолликулов вступают в фазу роста за один менструальный цикл или интеровуляторный интервал.

«Волной» развития фолликулов принято считать рекрутирование группы антральных фолликулов через равные промежутки времени в течение менструального цикла или интеровуляторного интервала. Фолликулы в каждой из волн имеют схожие характеристики, но не идентичные [51, 84]. Как правило, один из рекрутируемых фолликулов становится доминантным, остальные же подвергаются атрезии. Новые волны манифестируют через равные промежутки времени, каждой из них предшествует небольшое увеличение концентрации ФСГ. В одном интеровуляторном интервале первая волна является ановуляторной, последняя же всегда оканчивается овуляцией. В самом подробном из существующих на данный момент исследований яичники 63 клинически нормально менструирующих женщин в возрасте от 19 до 43 лет (средний возраст 28 лет и 7 месяцев) были изучены при помощи трансвагинального ультразвукового исследования [34]. Целью исследования было охарактеризовать ежедневный рост и регресс фолликулов в течение одного интеровуляторного интервала. При каждом обследовании все фолликулы диаметром более 2 мм подсчитывали и измеряли. Расположение каждого фолликула диаметром более 8 мм также отмечали на карте для облегчения отслеживания развития каждого отдельно взятого фолликула. В качестве ориентиров использовали внутренние подвздошные артерии, расположение соседних фолликулов и желтого тела. Было описано 5 различных паттернов развития фолликулов.

Появление волн, состоящих из 4-14 фолликулов, фиксируется 2 или 3 раза в течение одного интеровуляторного интервала. У большинства женщин фиксируется 2 волны (68%), у оставшихся (32%) в течение одного интервала насчитывают 3 волны. Средняя продолжительность цикла у женщин с 3 волнами фолликулогенеза – 29 дней, по сравнению с 27-дневным менструальным циклом у женщин с двумя волнами фолликулогенеза [33-35].

Волны по своему характеру принято делить на основные и второстепенные. Основные волны – овуляторные, в которых отчетливо наблюдается рост доминантного фолликула. Как правило, последняя из волн фолликулогенеза является овуляторной. Манифестация новой волны фолликулогенеза также сопровождается кратковременным повышением уровня ФСГ [32, 51, 88].

Пока это лишь единичные исследования и предположения, требующие проверки на фундаментальном уровне, но в случае их подтверждения не исключен кардинальный пересмотр основных принципов стимуляции яичников в программах вспомогательной репродукции.

В последние несколько лет возникло и развивается новое междисциплинарное направление в медицине – онкофертильность, разрабатывающее методы сохранения функции деторождения у молодых женщин, заболевших раком. Социальная значимость этого направления подтверждается все более возрастающей потребностью у молодых женщин иметь детей после излечения, о чем свидетельствует увеличение «возвращаемости» вылечившихся пациенток за своим ранее криоконсервированным материалом. Здравоохранение ведущих стран мира уделяет внимание этому направлению, о чем свидетельствуют клинические рекомендации и объединённые медицинские сообщества, занимающиеся проблемой обеспечения деторождения у заболевших раком пациентов. Достижения репродуктивной медицины и технологий криоконсервации обеспечивают реальную возможность отсроченного деторождения у больных онкологическими заболеваниями. Все эти факты внушают несомненный оптимизм.

Однако период существования нового направления невелик, существует ряд вопросов, требующих решения на основе дополнительных исследований.

Проводимые фундаментальные и клинические исследования не только решают проблему онкологических больных, но и открывают широкие перспективы для исследований в области репродукции человека и эндокринологии репродуктивной системы, в которых очень много «белых пятен». Возможно, благодаря этим исследованиям некоторые фундаментальные основы репродукции человека будут пересмотрены, что, несомненно, отразится на рутинной клинической практике.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материал исследования

В соответствии с целью исследования и поставленными задачами, на базе Научно-клинического отделения ВРТ им. Ф. Паулсена-старшего (руководитель отделения – д.м.н., профессор Т.А. Назаренко) и в клинико-диагностической лаборатории (руководитель – д.б.н. Т.Ю. Иванец) Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (директор – академик РАН Г.Т.Сухих), в период с марта 2019 по сентябрь 2020 гг. осуществляли набор пациенток в соответствии с заданными критериями включения.

В исследование были включены 140 пациенток, подписавших информированное добровольное согласие. Исследование было одобрено Комиссией по этике биомедицинских исследований при ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» МЗ РФ (протокол № 5). Все пациентки были обследованы в соответствии с приказом Минздрава России №107н от 30.08.2012 г. "О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению".

Работа состояла из следующих этапов:

На 1-м этапе были изучены клинико-лабораторные характеристики пациенток, направленных онкологами для проведения программ ВРТ с целью забора и сохранения репродуктивного материала для отсроченного деторождения. Всего было проконсультировано 296 пациентов. Определены наиболее часто встречающиеся противопоказания для проведения контролируемой овариальной стимуляции и трансвагинальной пункции фолликулов. Сформированы критерии отбора пациентов. Проанализированы исходы контролируемой овариальной стимуляции в зависимости от нозологии онкологического заболевания.

На 2-м этапе проведены программы ЭКО с целью получения и криоконсервации репродуктивного материала и изучены особенности модифицированных протоколов стимуляции функции яичников у онкологических больных. Исходы контролируемой овариальной стимуляции (параметры стероидогенеза, оогенеза и эмбриогенеза) анализировались в зависимости от фазы менструального цикла на момент начала индукции роста фолликулов.

На 3-м этапе были проанализированы исходы контролируемой овариальной стимуляции с применением ингибиторов ароматазы у больных раком молочной железы.

На 4-м этапе, опираясь на данные, полученные в ходе проведения исследования, была предложена гипотеза фолликуло-стероидогенеза, объясняющая возможность стимуляции яичников в любой день менструального цикла.

На заключительном этапе работы был сформирован алгоритм ведения пациенток с онкологическими заболеваниями, нуждающихся в сохранении репродуктивного материала для отсроченного деторождения.

2.1.1. Группы пациенток

В указанный период времени по направлению онкологов для решения вопроса о возможности предварительной криоконсервации репродуктивного материала обратились 296 пациенток. На рис. № 1 представлена блок-схема распределения пациенток, направленных для решения вопроса о возможности и методах сохранения репродуктивного материала.

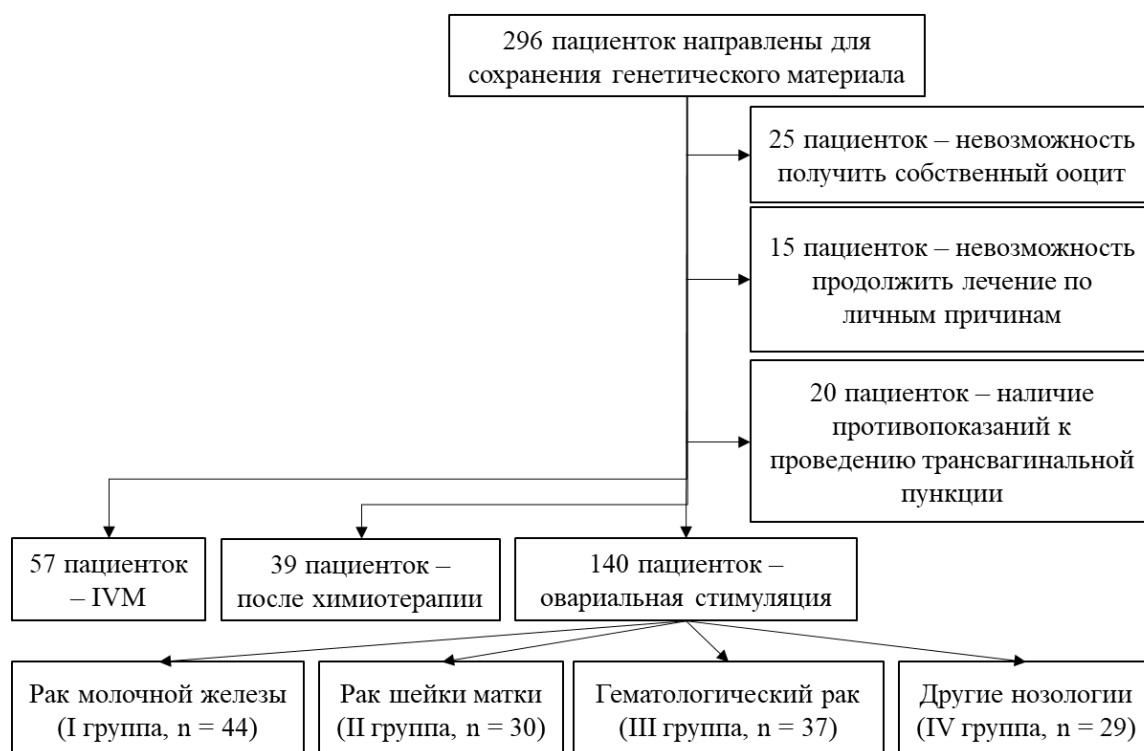


Рис. 1. Блок-схема исследовательской работы

60 пациенток, направленных онкологами до лечения, не были включены в исследование. Как видно из представленных данных, наиболее частой причиной невозможности проведения стимуляции являлись крайне сниженные параметры овариального резерва, а также наличие противопоказаний к контролируемой овариальной стимуляции и трансвагинальной пункции фолликулов.

57-ми пациенткам стимуляция яичников не могла быть проведена по причинам, связанным с основным заболеванием, а именно – при раке яичников и пограничных опухолях. Этим женщинам проведено хирургическое лечение с забором ткани яичника, извлечением из него незрелых ооцитов, их дозреванием *in vitro* с параллельной криоконсервацией ткани яичников.

Отдельно были описаны 39 женщин, которые прошли терапию и находились в состоянии стойкой ремиссии.

Таким образом, основную группу исследования составили 140 пациенток, которые были разделены на 4 группы, в зависимости от локализации

онкологического процесса. Группу I (n=44) составили женщины больные раком молочной железы; группу II (n=30) – пациентки с раком шейки матки; группу III (n=37) – пациентки с гематологическим раком, группу IV (n=29) – больные с другими онкологическими нозологиями (рак матки n=13, рак прямой кишки n=11, рак носоглотки n=4). Для большей достоверности исходы контролируемой овариальной стимуляции также оценивались по сравнению с группой контроля (n=40), в которую были включены пациентки с сопоставимым возрастом и овариальным резервом. Пациенткам из группы контроля программа ЭКО проводилась по причине наличия трубно-перитонеального фактора бесплодия.

2.2. Дизайн исследования

Для решения задач № 1, 2 построен следующий дизайн исследования:

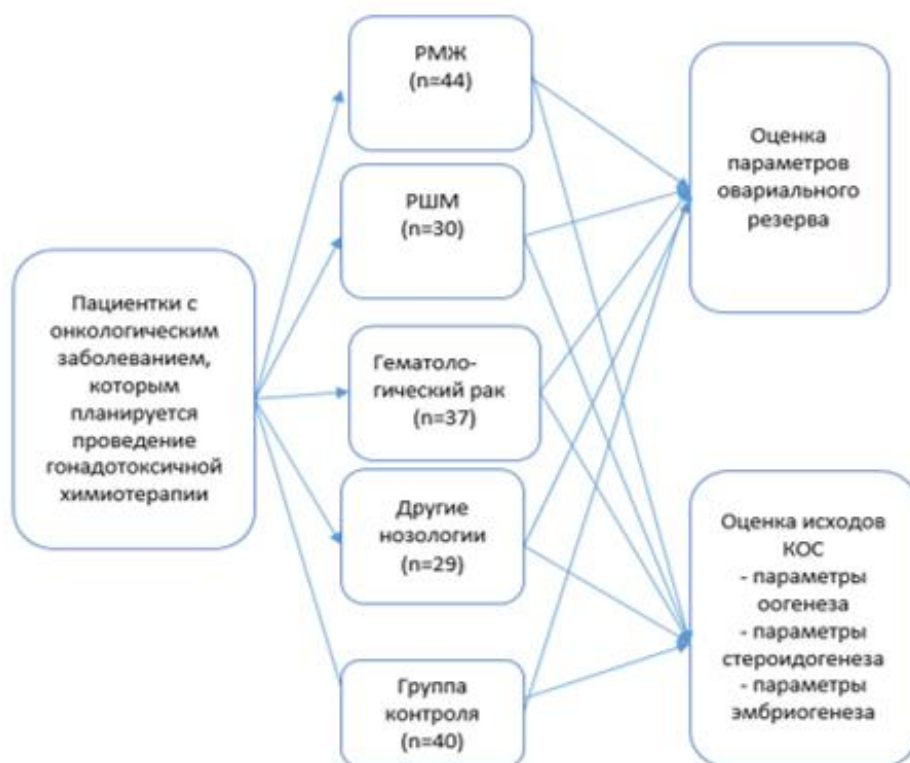


Рис. 2. Дизайн исследования для задач 1, 2

Для решения задачи № 3 построен следующий дизайн исследования:

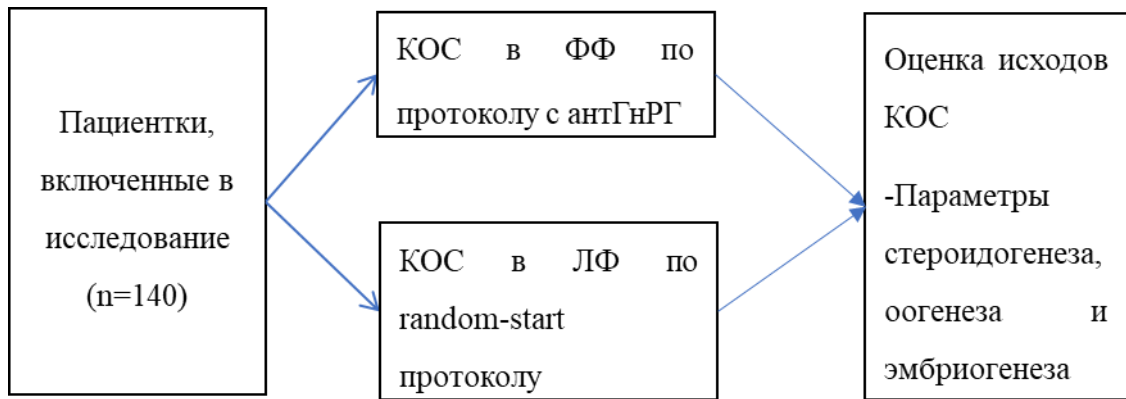


Рис. 3. Дизайн исследования для задач 3

Для решения задачи № 4 построен следующий дизайн исследования:



Рис. 4. Дизайн исследования для задачи №4

Для решения задачи № 5 построен следующий дизайн исследования:

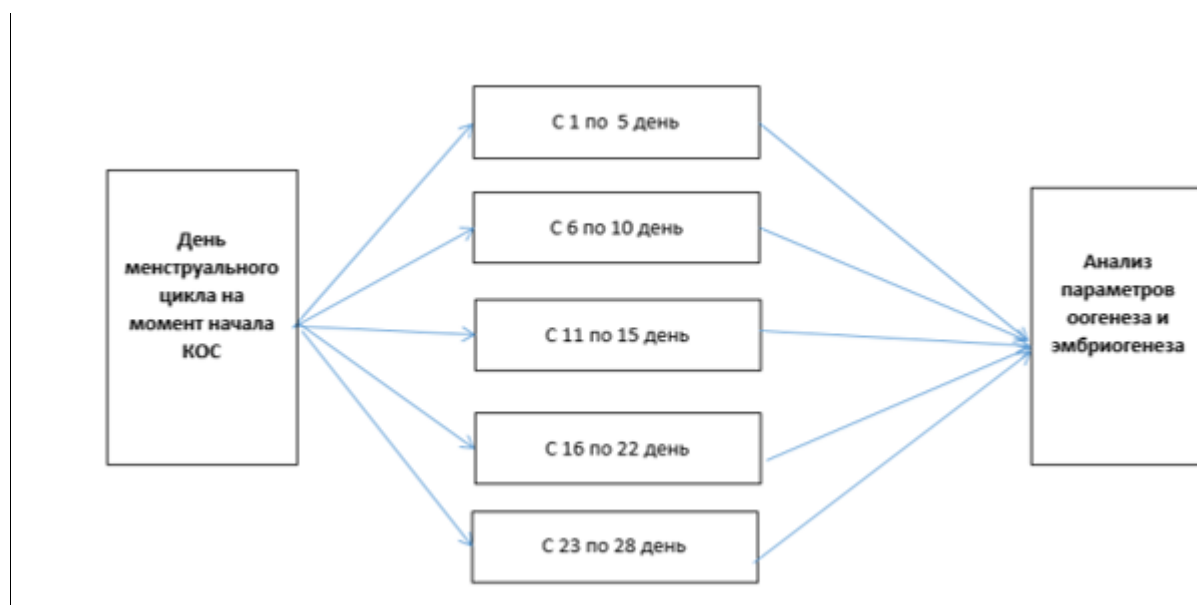


Рис. 5. Дизайн исследования для задачи № 5

2.3. Конечные точки

Первичные конечные точки:

- 1) возраст;
- 2) индекс массы тела (ИМТ);
- 3) локализация онкологического процесса;
- 4) характеристики онкологического заболевания (стадия, степень дифференцировки, молекулярно-биологический подтип для рака молочной железы);
- 5) gravidность;
- 6) паритет;
- 7) наличие бесплодия;
- 8) гинекологические заболевания;
- 9) овариальный резерв (количество антральных фолликулов – КАФ, уровень антимюллера гормона – АМГ, ФСГ);
- 10) протокол овариальной стимуляции;
- 11) параметры стероидогенеза.

Анализируемые исходы программ ВРТ:

- 1) число полученных ооцит-кумулясных комплексов (ОКК);
- 2) частота встречаемости наиболее распространенных дисморфизмов ооцитов;
- 3) число зигот, бластоцист и бластоцист отличного качества по Гарднеру.

2.4. Критерии включения и невключения в исследование

Критериями включения в исследование явились:

- 1) Возраст пациенток от 18 до 42 лет;
- 2) Достоверно установленный диагноз онкологического заболевания;
- 3) Запланированное проведение гонадотоксичной терапии (химио, лучевой терапии), радикального хирургического лечения по поводу онкологического заболевания;
- 4) Заключение онколога о возможности проведения программ ВРТ;
- 5) Информированное добровольное согласие на участие в исследовании.

Критерии невключения в исследование:

- 1) Крайне сниженные показатели овариального резерва и невозможность получить собственный ооцит;
- 2) Рецидивирующие онкологические заболевания;
- 3) Отдаленные метастазы;
- 4) Тяжелое состояние пациентки на фоне основного заболевания.

2.5. Методы исследования

Перед началом лечения с применением методов ВРТ в ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» МЗ РФ проводили междисциплинарный консилиум, состоящий из врачей онкологов и гинекологов-репродуктологов, где подробно оценивали онкологические и репродуктивные характеристики, характер предстоящего лечения, прогноз лечения, возможность и методы забора и криоконсервации репродуктивного материала.

Диагноз заболевания был установлен при помощи стандартных методов диагностики, в соответствии с клиническими рекомендациями по лечению злокачественных опухолей Российского общества клинических онкологов (RUSSCO, 2018-2019 гг.) и Европейского общества медицинской онкологии (ESMO, 2015-2017 гг.).

Степень дифференцировки опухоли или гистологическая степень злокачественности (Grade, G) определялась с помощью Ноттингемской комбинированной классификации (Nottingham Prognostic Index, система градирования Scarff-Bloom-Richardson в модификации Elston-Ellis), которая была одобрена Коллегией американских Патологоанатомов и Всемирной Организацией Здравоохранения (ВОЗ).

Для описания анатомической распространенности процесса применялась система TNM 8 (2017) и комитета FIGO (2009).

Для определения распространенности как Ходжкинских, так и неходжкинских лимфом использовалась классификация, предложенная Ann Arbor в 1971 г.

Согласно приказу № 107н Минздравсоцразвития России от 30 августа 2012 года «О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), противопоказаниях и ограничениях к их применению» в рамках подготовки к стимуляции функции яичников проводили предварительное обследование.

Для оценки анамнеза пациенток из исследуемых групп были использованы данные опроса, общего осмотра, ультразвукового и гормонального исследования, гистологического и иммуногистохимического исследований, а также результаты рентгенографии органов грудной клетки, УЗИ брюшной полости и малого таза, результаты КТ и ПЭТ-КТ, МРТ и остеосцинтиграфия. По данным обследования и заключениям онколога оценивали распространенность опухоли (метастазы в регионарные лимфатические узлы и отдаленные метастазы). Оценивали результаты гистологического и иммуногистохимического исследований,

позволяющие определить гистологическое строение опухоли, характер роста, степень злокачественности, рецепторный статус.

Все перечисленные выше данные ложились в основу принятия решения о возможности и характере лечения, направленного на сохранение репродуктивного материала. Решающее мнение принадлежало онкологам, которые разрешали использование методов ВРТ для сохранения репродуктивного материала больных.

2.5.1. Мониторинг индуцированного цикла

Мониторинг индуцированного цикла проводили при помощи динамических УЗ-исследований. Оценивали размер и структуру тела матки, толщину и структуру эндометрия, размеры и структуру яичников, КАФ, наличие или отсутствие объемных образований в полости малого таза в день начала контролируемой овариальной стимуляции. Далее УЗ-мониторинг выполняли на 6-й день овариальной стимуляции. В последующем, в зависимости от динамики роста фолликулов, для своевременной коррекции дозы гонадотропинов и назначения триггера овуляции. Мониторинг проводили раз в 2-3 дня.

2.5.2. Гормональное обследование

Исследование гормонов в крови осуществляли в клинико-диагностической лаборатории ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (заведующий – д.м.н. Т.Ю. Иванец) радиоиммунологическим методом (тест-системы «Hoffmann La Roche, Ltd.», Швейцария).

Исходно проводилась оценка концентраций следующих гормонов в плазме крови: ФСГ (фолликулостимулирующий гормон), ЛГ (лютеинизирующий гормон), эстрадиола (E₂), прогестерона (P) антимюллерового гормона (АМГ), тиреотропного гормона (ТТГ), свободного тироксина (Т₄св), пролактина (ПРЛ). В процессе мониторинга индуцированного цикла оценивались уровни ФСГ, E₂, ЛГ, прогестерона в динамике.

Забор крови для исследования производили в день вступления в программу, на 6-й день стимуляции, а также в день назначения триггера финального созревания ооцитов.

2.5.3. Овариальная стимуляция и трансвагинальная пункция фолликулов

Пациенткам, обратившимся в раннюю фолликулярную фазу, проводили контролируемую стимуляцию яичников по стандартному протоколу с антГнРГ со 2-3 д.м.ц. В качестве гонадотропинов использовали препараты рФСГ, ЧМГ или их комбинацию. Женщинам, больным раком молочной железы, с высокой экспрессией рецепторов к эстрогенам в схему стимуляции включали ингибиторы ароматазы (Летрозол) в дозе 2,5 мг, согласно международным клиническим рекомендациям.

Пациенткам, обратившимся в лютеиновую фазу цикла, проводили стимуляцию яичников по random-start протоколу гонадотропинами (рФСГ или ЧМГ), без дополнительного назначения антГнРГ. Специальные программы с включением ингибиторов ароматазы в этой группе были проведены женщинам, имеющим рак молочной железы с высокой экспрессией рецепторов к эстрогенам.

Пациенткам, направленным в позднюю фолликулярную фазу цикла при наличии доминантного фолликула диаметром более 12 мм, проводили стимуляция функции яичников по модифицированному random-start протоколу с предварительной десенситизацией ГГЯ системы путем трехдневного введения антГнРГ.

2.5.4. Овариальная стимуляция и трансвагинальная пункция фолликулов у больных раком молочной железы

Больные раком молочной железы с сохранным овариальным резервом, направленные онкологом до начала гонадотоксичной терапии, были поделены на

подгруппы на основании данных иммуногистохимического исследования и молекулярного подтипа опухоли. Суррогатный молекулярный подтип РМЖ определялся на основании результатов иммуногистохимического исследования.

Таблица 2. Иммуногистохимический фенотип молекулярных подтипов РМЖ

Молекулярный подтип	Иммуногистохимический портрет			Ki-67
	ER	PR	HER2/neu	
Люминальный А	+	+	-	Менее 14 %
Люминальный В, HER2+ негативный	+	+	-	Более 14 %
Люминальный В, HER2+ позитивный	+	+	+	Любой
HER2+	-	-	+	Любой
Тройной негативный	-	-	-	Любой

В настоящей работе отправными точками для назначения ингибиторов ароматазы считали не только молекулярно-биологический подтип опухоли и наличие экспрессии рецепторов к эстрогенам в клетках опухоли, но и состояния овариального резерва.

2.5.5. Эмбриологический этап

В аспирированной фолликулярной жидкости осуществляли поиск ооцит-кумуляусных комплексов (ОКК). После предварительной инкубации и обработки ооцитов энзимным и механическим методами оценивали степень зрелости клеток. В соответствии с критериями оценки ооциты были поделены на соответствующие группы:

- 1) GV (germinal vesicle) – в ооците визуализируется ядро, полярное тельце отсутствует;
- 2) МI (ооцит на стадии метафазы мейоза I) – в ооците отсутствует и ядро, и полярное тельце;
- 3) МII (ооцит на стадии II мейотического деления) – в перивителлиновом пространстве визуализируется полярное тельце.

После оценки степени зрелости ооцитов эмбриологи проводили морфологическую оценку ооцитов и оценивали наличие дисморфизмов.

Оплодотворение ооцитов проводили путем ЭКО при нормозооспермии или посредством ИКСИ при патоспермии I-II ст.

Морфологическую оценку качества бластоцист производили на основании классификации эмбрионов, разработанной Gardner D.K. и Schoolcraft W.B. в 1999 году, которая учитывает размеры бластоцисты, степень «вылупления» (hatching), а также выраженность клеток внутренней клеточной массы и трофэктодермы.

2.6. Статистический анализ полученных данных

Статистический анализ данных проводили в программе GraphPad Prism (GraphPad Software, США). Качественные показатели мы приводили как абсолютное значение и относительное значение, выраженное в процентах. Для сравнения переменных в двух группах использовали точный тест Фишера. Для сравнения переменных в трёх и более группах использовали точный тест Фишера с поправкой Сидака. Количественные показатели проверяли на нормальность распределения с применением теста Колмогорова-Смирнова. В случае нормального распределения количественного показателя мы приводили среднее значение и стандартное отклонение. Для сравнения переменных в двух группах использовали тест Стьюдента. Для сравнения переменных в трёх и более группах использовали тест ANOVA с поправкой Тьюки. В случае распределения количественного показателя, отличного от нормального, мы приводили медиану и

интерквартильный размах. Для сравнения переменных в двух группах использовали тест Манна-Уитни. Для сравнения переменных в трёх и более группах использовали тест Краскела-Уоллиса с поправкой Данна. Различия между группами считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Клинико-лабораторная характеристика пациенток

3.1.1. Клинико-лабораторная характеристика пациенток, направленных до лечения онкологического заболевания

Пациентки, направленные до лечения на процедуру предварительного забора и криоконсервации репродуктивного материала, были поделены на группы в зависимости от локализации онкологического процесса. Данные пациенток после лечения онкологического заболевания анализировали отдельно (n=39). В таблице № 3 представлены клинико-anamнестические характеристики пациенток, включенных в исследование.

Распределение пациенток по локализации онкологического процесса представлено на рис. № 6

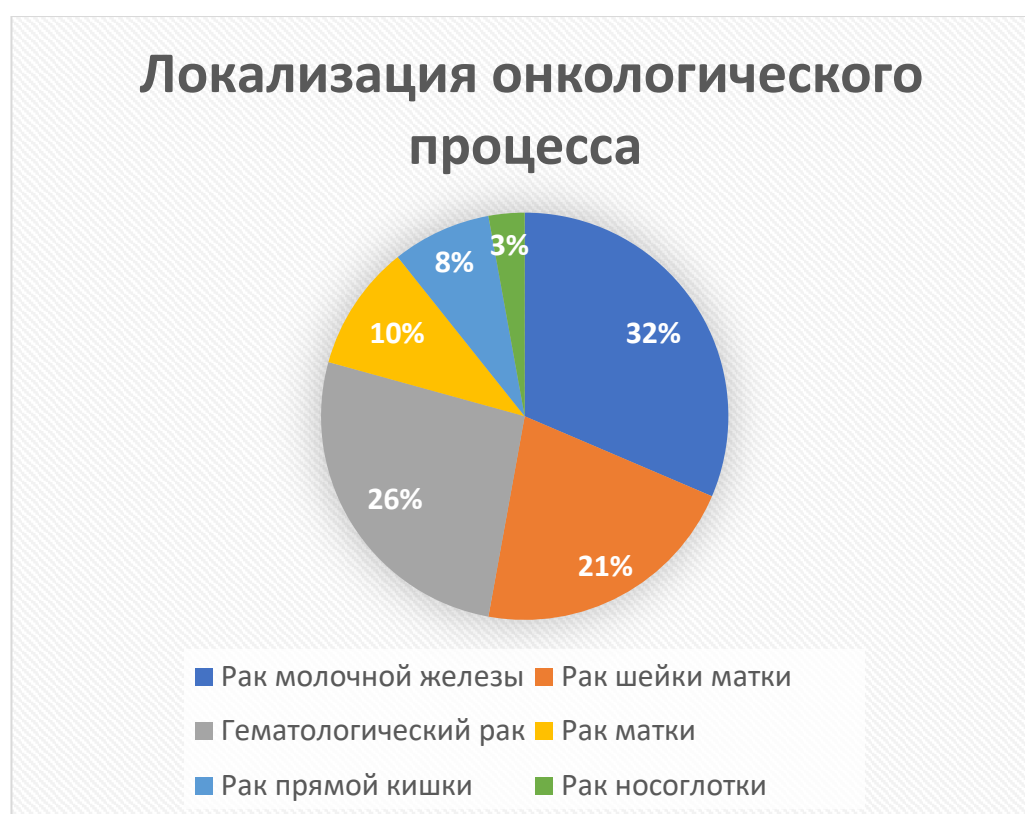


Рис. 6. Локализация онкологического процесса у пациенток, включенных в исследование

Как представлено на рис. № 6 наиболее частым показанием для предварительного забора и криоконсервации репродуктивного материала являлся рак молочной железы, диагностированный у 32% пациентов, включенных в исследование.

Таблица 3. Клинико-анамнестические характеристики пациенток, включенных в исследование

Показатели	I группа (n=44)	II группа (n=30)	III группа (n=37)	IV группа (n=29)	Группа контроля (n=40)	p- value
Возраст, лет	35,4±4,9	34,4±4,4	32,4±6,0	34,5±4,4	34,2±3,5	0,067
ИМТ, кг/м ²	22,4±2,4	22,5±2,3	22,7±2,1	22,4±2,2	22,4±2,5	0,841
Возраст менархе, лет	13,7±1,2	13,4±1,2	13,6±1,3	13,3±1,2	13,5±1,3	0,213
Продолжительность цикла, дней	28,0 (26,0 – 28,0)	28,0 (28,0 – 30,0)	28,0 (28,0 – 29,0)	28,0 (26,25 – 28,75)	28,0 (28,0 – 30,0)	0,311

Как видно из представленных данных, пациентки исследуемых групп были сопоставимы по возрасту, возрасту менархе и продолжительности менструального цикла.

Анализ параметров овариального резерва, а именно уровня АМГ, ФСГ, ЛГ, эстрадиола и КАФ, показал отсутствие статистически значимой разницы между пациентками исследуемых групп.

Таблица 4. Анализ параметров овариального резерва

Показатели	I группа (n=44)	II группа (n=30)	III группа (n=37)	IV группа (n=29)	Группа контроль (n=40)	p-value
АМГ, нг/мл	1,7 (1,2 – 4,1)	1,5 (1,1 – 2,8)	1,8 (1,2 – 3,1)	1,3 (1,1 – 2,2)	1,5 (1,3– 3,2)	0,224
ЛГ-1, МЕ/л	5,3 (2,0 – 7,5)	4,4 (1,6 – 6,9)	5,8 (3,0 – 8,2)	5,1 (2,6 – 7,5)	4,3 (2,5– 7,4)	0,723
ФСГ, МЕ/л	8,0 (4,6 – 11,3)	9,4 (5,7 – 14,0)	8,4 (6,3 – 12,6)	8,1 (4,7 – 14,6)	7,6 (4,6 – 10,5)	0,406
Количество антральных фолликулов	7,5 (5,0 – 13,75)	6,0 (4,75 – 7,25)	6,0 (5,0 – 10,0)	5,0 (5,0 – 10,0)	6,0 (5,0 – 10,0)	0,600

¹ – p<0,05 при сравнении с группой 1.

Значительная доля пациенток, включенных в исследование, имела нарушения менструального цикла, а также гинекологические заболевания. В частности, СПКЯ наблюдался у 13,6% пациенток в I группе, у 6,7% пациенток II группы, у 13,5% у пациенток III группы и в 20,7% пациенток IV группы. Указанные сведения позволяют высказать предположение, что возникновение некоторых онкологических заболеваний, в частности, гормон-зависимых опухолей сопряжено с неблагоприятным гинекологическим и репродуктивным анамнезом пациенток.

Отмечались низкая gravidность и паритет у всех включенных в исследование пациенток, также довольно высокая частота бесплодия как первичного, так и вторичного. Анализ репродуктивного анамнеза показал, что подавляющее

большинство были бездетны, что послужило несомненным стимулом для прохождения процедуры предварительного забора и сохранения репродуктивного материала.

Таблица 5. Анализ репродуктивной функции и наследственности пациенток

Показатели	I группа (n=44)	II группа (n=30)	III группа (n=37)	IV группа (n=29)	p-value
Первичное бесплодие	16 (36,4%)	10 (33,3%)	19 (51,4%)	18 (62,1%)	0,075
Вторичное бесплодие	10 (22,7%)	15 (50,0%)	7 (18,9%)	5 (17,2%)	0,017
Программы ЭКО в анамнезе	6 (13,6%)	9 (30,0%)	10 (27,0%)	5 (17,2%)	0,269
Беременности (всего):	5 (11,4%)	8 (26,7%)	4 (10,8%)	2 (6,9%)	0,153
-Неразвивающиеся	1 (2,3%)	3 (10,0%)	3 (8,1%)	1 (3,4%)	0,479
- Внематочные	1 (2,3%)	0	0	1 (3,4%)	0,697
- Роды	3 (6,8%)	5 (16,7%) ⁴	1 (2,7%)	0	0,051
СПКЯ	6 (13,6%)	2 (6,7%)	5 (13,5%)	6 (20,7%)	0,819
НГЭ	3 (6,8%)	1 (3,3%)	5 (13,5%)	3 (10,3%)	0,467
Миома матки	3 (6,8%)	3 (10,0%)	3 (8,1%)	3 (10,3%)	0,931

Первичная аменорея	0 ⁴	0 ⁴	1 (2,7%)	4 (13,8%)	0,007
Вторичная аменорея	0	0	0	1 (3,4%)	0,207
Отягощенная наследственность по онкологическим заболеваниям	10 (22,7%)	8 (26,7%)	8 (21,6%)	2 (6,9%)	0,203

⁴ – $p < 0,05$ при сравнении с группой 4

У 10 (22,7%) пациенток из I группы, 8 (26,7%) из II группы, 8 (21,6%) из III группы и 2 (6,9%) пациенток IV группы ближайшие родственники страдали онкологическими заболеваниями.

В некоторых случаях наследственная отягощенность, в частности у пациенток со злокачественными новообразованиями молочной железы, подтверждена обнаружением носительства мутаций генов, играющих значительную роль в формировании онкологических заболеваний. Так, из 44 пациенток, обследованных на наличие герминальных мутаций, у 10 (22,7%) обнаружена мутация гена BRCA-1 и BRCA-2. При исследовании мутаций в гене CHEK2 положительные результаты обнаружены у одной больной раком молочной железы.

Данные по стадийности онкологического процесса у пациенток с солидными образованиями (пациентки I, II и IV групп) представлены в таблице № 6.

Таблица 6. Распределение пациенток по стадиям онкологического процесса

		Группа 1 (n=44)		Группа 2 (n=30)		Группа 4 (n=29)	
		Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
I	T1N0M0	12	27,3%	9	30,0%	13	44,8%
IIА	T1N1M0	5	11,3%	8	26,6%	9	31%
	T2N0M0	16	36,3%	7	23,3%	2	6,9%
IIВ	T2N1M0	7	15,9%	4	13,3%	2	6,9%
	T3N0M0	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
IIIА	T1N2M0	0	0,0%	0	0,0%	1	3,4%
	T2N2M0	3	6,8%	1	3,3%	1	3,4%
	T3N1M0	1	2,3%	1	3,3%	0	0,0%
	T3N2M0	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
IIIВ	T4N0M0	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
	T4N1M0	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
	T4N2M0	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
IIIС	T1N3M0	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
	T2N3M0	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
	T4N3M0	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
ДРУГОЕ	cr in situ	0	0,0%	0	0,0%	1	3,4%

Степени гистопатологической дифференцировки опухоли, оцениваемая по классификации UICC 2009 года представлена в таблице № 7. Высокая степень гистопатологической дифференцировки опухоли (G1) наблюдалась у 7 (15%) пациенток I группы, 16 (53,4%) пациенток II группы и у 23 (79,4%) пациенток IV группы. Средняя степень гистопатологической дифференцировки (G2) – у 26

(59,1%) пациенток I группы, 10 (33,3%) пациенток II группы и у 5 (17,2%) пациенток IV группы. Низкая степень дифференцировки (G3) – у 11 (25,0%) пациенток I группы, 4 (13,3%) пациенток II группы и у 1 (3,4%) пациенток IV группы. Недифференцированный рак (G4) не встречался ни у одной из пациенток, включенных в исследование.

Таблица 7. Степень гистопатологической дифференцировки опухоли

Показатели	I группа (n=44)	II группа (n=30)	IV группа (n=29)
G1	7 (15,9%)	16 (53,4%)	23 (79,4%)
G2	26 (59,1%)	10 (33,3%)	5 (17,2%)
G3	11 (25,0%)	4 (13,3%)	1 (3,4%)

Результаты иммуногистохимического исследования, на основании которого определяется биологических подтип опухоли молочной железы представлены в таблице (табл. № 8). Наиболее часто встречающимся молекулярно-биологическим подтипом рака молочной железы был люминальный В HER2-негативный рак.

Таблица 8. Биологический подтип опухоли у пациенток исследуемой группы

Биологический подтип	Абсолютное число	(%)
Люминальный А	5	11,4%
Люминальный В, HER2-негативный	19	43,2%
Люминальный В, HER2-позитивный	10	22,7%

HER2-позитивный, не люминальный	2	4,5%
Тройной негативный	8	18,2%
Всего	44	100%

В группе пациенток с гематологическим раком распределение лимфомами Ходжкина и неходжкинскими лимфомами по гистологическим вариантам представлено в таблице № 9.

Таблица 9. Распределение гистологических вариантов лимфом

Гистологический вариант	Абсолютное число	(%)
Варианты Ходжкинской лимфомы	21	56,8%
Смешанноклеточный вариант	1	2,7%
Нодулярный склероз	20	54,1%
Варианты неходжкинской лимфомы	16	43,2%
Диффузная В-крупноклеточная	3	8,1%
Первичная медиастенальная В-крупноклеточная	5	13,5%
Смешанно-клеточный вариант	7	18,9%
Фолликулярная	1	2,7%

Для определения распространённости как Ходжкинских, так и неходжкинских лимфом использовали классификацию, предложенную Ann Arbor в 1971 г. Стадийность процесса в представлена на рис. № 7.

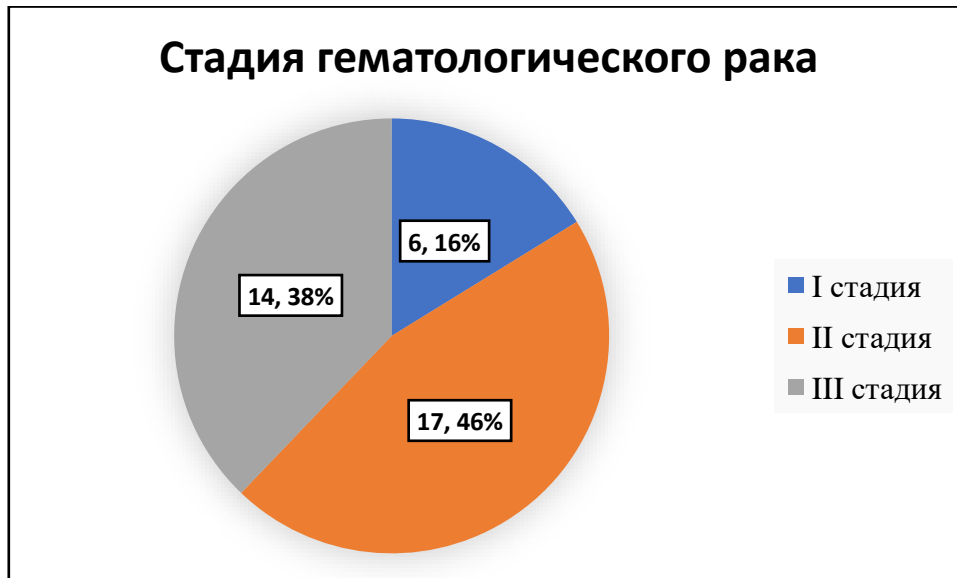


Рис. 7. Распределение пациенток с гематологическим раком по стадиям

Результаты обследования показали, что подавляющее большинство пациенток имели I и II стадии рака и благоприятный прогноз выживаемости. Все женщины высказывали настойчивое желание сохранить свои яйцеклетки и в будущем иметь детей.

3.1.2. Клинико-лабораторная характеристика пациенток, направленных после лечения онкологического заболевания

39 пациенток, находившихся в стадии стойкой ремиссии, были направлены онкологом для достижения беременности с использованием вспомогательных репродуктивных технологий. У 19 пациенток, которым проводилась химиотерапия, диагностировано преждевременное истощение яичников.

Попытки стимуляции функции яичников проведены 20 пациенткам из 39, у которых регистрировались регулярные менструации, а уровень АМГ был выше 0,7

нг/мл. Средний уровень АМГ в группе пациенток в стойкой ремиссии составил 1,1 (0,2 – 1,3) нг/мл, уровень ФСГ – 9,0 (8,0 – 19,1) МЕ/л.

У 20 пациенток проведена программа ЭКО. При этом у 7 не отмечалось ответной реакции яичников на введение гонадотропинов, у 13 удалось получить от 1 до 3 ооцитов. Однако оплодотворение не произошло у 4 женщин, у остальных 9 отмечен арест раннего эмбриогенеза на 2-3 сутки культивирования, то есть, ни у одной из 20 пациенток не удалось получить эмбрион, пригодный для переноса.

Указанные факты бесспорно подтверждают необходимость предварительной консервации ооцитов даже в тех случаях, когда лечение не относится к разряду гонадотоксичного, как, например, при длительной терапии тамоксифеном.

3.1.3. Клинико-лабораторная характеристика пациенток, направленных на программу IVM

Всего 57 пациенток были направлены на процедуру IVM, заключающуюся в извлечении незрелых ооцитов из коркового слоя яичников с последующим дозреванием в условиях *in vitro* до стадии зрелых. В дальнейшем проводилась как витрификация ооцитов, так и оплодотворение с последующей криоконсервацией эмбрионов. Указанная процедура проведена при хирургической лапароскопии с удалением яичника или его части.

Показаниями для выполнения программы явились: рак яичников у 17 пациенток (n=17), пограничные опухоли яичников у 6 пациенток, у 14 – рак эндометрия, у 11 рак шейки матки, в 6 случаях – рак молочной железы, преимущественно его BRCA-ассоциированный вариант, у одной пациентки – рак влагалища, также в 1 случае – первично-множественный рак яичников и эндометрия. Таким образом, по результатам проведенного исследования, рак яичников и пограничные опухоли, требующие немедленного хирургического лечения, явились основным показанием для использования программы IVM. Другие нозологические формы, представленные в настоящем исследовании, имели

более выраженную стадию онкологического процесса, что потребовало незамедлительного радикального хирургического лечения.

Проведена криоконсервация 31 образца ткани яичника, криоконсервирован 161 ооцит и 13 бластоцист.

3.2. Характеристики проведенного лечения в программах ЭКО/ИКСИ в зависимости от локализации онкологического процесса

140 больных исследуемых групп подвергались стимуляции яичников и трансвагинальной пункции с целью предварительного забора репродуктивного материала в программах ЭКО. На рис. № 8 представлено распределение протоколов стимуляции в зависимости от дня их начала у исследуемых пациенток. Различия в частоте применения того или иного протокола в исследуемых группах объясняются случайным распределением, т.е. временем обращения пациенток.

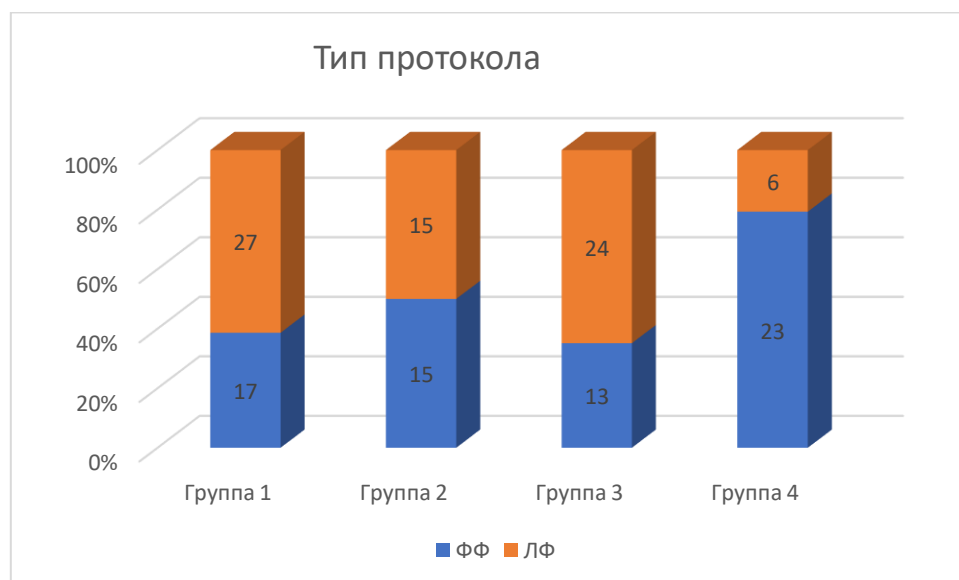


Рис. 8. Распределение протоколов стимуляции в зависимости от дня их начала у исследуемых групп пациенток

ФФ – начало овариальной стимуляции в фолликулярную фазу, ЛФ – начало овариальной стимуляции в лютеиновую фазу, $p=0,001$

($p < 0,05$ для сравнения группы 1 и группы 4, $p < 0,05$ для сравнения группы 3 и группы 4).

Характеристики протоколов стимуляции представлены в таблице № 10.

Таблица 10. Характеристики протоколов контролируемой овариальной стимуляции

Показатели	I группа (n=44)	II группа (n=30)	III группа (n=37)	IV группа (n=29)	Группа контроля (n=40)	p- value
Стимуляция в ФФ	17 (38,6%) 4	15 (50,0%)	13 (35,1%) 4	23 (79,3%)	20 (50%)	0,001
Стимуляция в ЛФ	27 (61,4%) 4	15 (50,0%)	24 (64,9%) 4	6 (20,7%)	20 (50%)	
Длительность стимуляции, дней	9 (8 – 10)	7 (6,5 – 10,0)	10 (7 – 11)	8 (6 – 10)	7 (6 – 10)	0,482
Суммарная доза ГТ, МЕ	2325 (2000 – 2900) ⁴	2025 (1800 – 2419)	2250 (1950 – 2500)	2025 (1413 – 2500)	2225 (1850 – 2500)	0,061

¹ – $p < 0,05$ при сравнении с группой 1.

⁴ – $p < 0,05$ при сравнении с группой 4.

Как видно из таблицы № 10, выбор протокола контролируемой овариальной стимуляции основывался в первую очередь на состоянии овариального резерва и фазе менструального цикла на момент обращения.

В случае обращения пациентки в раннюю фолликулярную фазу менструального цикла проводилась стимуляция функции яичников по

стандартному протоколу с антГнРГ. В случае обращения в лютеиновую фазу цикла, вне зависимости от локализации онкологического процесса, проводилась стимуляция функции яичников по random-start протоколу, без дополнительного назначения антГнРГ.

Из онкологических характеристик, влияющих на выбор протокола стимуляции, ключевую роль играла экспрессия рецепторов к эстрогену в тканях опухоли. Так, 27 (61,4%) пациенткам из I-й группы проводилась стимуляция с применением ингибитора ароматазы (летрозол) в суточной дозе 2,5 мг одновременно с гонадотропинами.

Остальные параметры протоколов, а именно длительность стимуляции, суммарная доза гонадотропинов, стартовая доза гонадотропинов не отличались в сравниваемых группах и не зависели от локализации онкологического процесса.

3.2.1 Характеристики оогенеза и раннего эмбриогенеза у пациенток в исследуемых группах

Изучены эмбриологические исходы у пациенток в зависимости от локализации онкологического процесса. Данные представлены в таблице № 11.

Таблица 11. **Параметры оогенеза у пациенток в зависимости от локализации онкологического процесса**

Показатели	I группа (n=44)	II группа (n=30)	III группа (n=37)	IV группа (n=29)	Группа контроль я (n=40)	p- value
Среднее число ОКК на 1 пациентку	11 (6 – 15)	8 (4,5 – 12,5)	10 (5 – 15)	7 (2,5 – 16)	8 (4,5 – 16)	0,238
Всего ОКК	545	265	398	273	320	---
МП	374 (68,6%)	205 (77,4%) ¹	304 (76,4%) ¹	194 (71,0%) ¹	240 (75%)	0,005

MI	62 (11,4%) 3	23 (8,7%)	24 (6,0%)	43 (15,8%) ³	32 (10%)	<0,0 01
GV	81 (14,9%)	29 (10,9%)	39 (9,8%)	24 (8,8%) ¹	30 (9,38%)	0,033
Deg	28 (5,1%)	8 (3,0%)	31 (7,8%)	12 (4,4%)	18 (5,63%)	0,051
Дисморфизмы зрелых ооцитов (MI)						
Ооциты с аномалиями полярного тельца	0	1 (0,5%)	0	0	1 (0,31%)	0,371
Ооциты с зонами гладкого ЭПР	2 (0,5%)	5 (2,4%)	2 (0,7%)	0	0	0,059
Ооциты с некротическим и участками цитоплазмы	3 (0,8%)	0	5 (1,6%)	3 (1,5%)	2 (0,63%)	0,226
Ооциты с вакуолями	5 (1,3%) ³	1 (0,5%) ³	23 (7,6%)	4 (1,5%) ³	1 (0,31%)	<0,0 01
Ооциты с центральной гранулярностью	24 (6,4%) ²	1 (0,5%)	11 (3,6%) ²	10 (5,2%) ²	11 (3,44%)	0,001
Ооциты с повышенной	0	0	3 (1,0%)	1 (0,5%)	2 (0,63%)	0,103

ВЯЗКОСТЬЮ ЦИТОПЛАЗМЫ						
Ооциты с расширенным перивителлино вым пространством	5 (1,3%)	0	0	0	0	0,056

¹ – $p < 0,05$ при сравнении с группой 1.

² – $p < 0,05$ при сравнении с группой 2.

³ – $p < 0,05$ при сравнении с группой 3.

Число полученных зрелых ооцитов было значимо ниже в группе пациенток больных раком молочной железы (374 (68,6%), 205 (77,4%), 304 (76,4%), 194 (71,0%) и соответственно 240 (75%) в контрольной группе, $p = 0,005$).

Как видно из полученных данных, в группе I наблюдается высокое количество незрелых клеток (ооцитов на стадии MI), а также дегенеративных ооцитов, что может быть обусловлено назначением в этой группе препарата группы ингибиторов ароматазы (летрозол).

Проведен анализ частоты встречаемости наиболее распространенных дисморфизмов ооцитов. В группе пациенток с гематологическим раком статистически значимо чаще встречались цитоплазматические вакуоли, а у больных II группы обнаруживалось меньшее количество клеток с центральной гранулярностью.

Большинство пациенток, включенных в I группу (30 пациенток, что составляет 68,2% от общего количества пациенток в группе) предпочли криоконсервировать ооциты, что было статистически значимо выше частоты витрификации ооцитов во II и IV группах (7(23,3%), 10 (34,5%), $p < 0,001$).

Пациентки II группы гораздо чаще находились в стойких партнерских отношениях и предпочитали криоконсервировать эмбрионы (24 (80,0%), по сравнению с 18 (40,9%) I группы).

В таблице 12 представлены показатели эмбриогенеза у пациенток исследуемых групп.

Таблица 12. Параметры эмбриогенеза у пациенток в зависимости от локализации онкологического процесса

Показатели	I группа (n=44)	II группа (n=30)	III группа (n=37)	IV группа (n=29)	Группа контроля (n=40)	p-value
2pn всего*	62 (81,6%)	110 (80,9%)	83 (80,6%)	104 (80,0%)	192 (80,0%)	0,996
Число бластоцист, всего**	32 (51,6%)	65 (59,1%)	49 (59,0%)	62 (59,6%)	132 (55%)	0,745
Среднее число бластоцист на 1 пациентку	2 (1 – 3)	3 (2 – 4)	2 (1 – 4)	3 (1 – 4)	3 (1 – 4)	0,573
Число бластоцист отличного качества, всего**	20 (32,3%)	24 (21,8%)	21 (25,3%)	39 (37,5%)	60 (25%)	0,064
Число бластоцист отличного качества, среднее на 1 пациентку	2 (1 – 3)	1,5 (1 – 2)	2 (1 – 2)	2,5 (1 – 3)	2 (1 – 3)	0,320

¹ – $p < 0,05$ при сравнении с группой 1.

³ – $p < 0,05$ при сравнении с группой 3.

* % указан от числа оплодотворяемых ооцитов (процент оплодотворения);

** % указан от числа 2pn ооцитов.

Результаты проведенного исследования не выявили различий по ключевым показателям фолликуло-, оо- и эмбриогенеза в исследуемых группах пациенток,

что подтверждает зависимость результатов стимуляции от состояния овариального резерва и возраста пациенток, а не от типа онкологического заболевания. Вместе с тем, были выявлены некоторые особенности по числу полученных зрелых клеток в протоколах с добавлением ингибиторов ароматазы больным раком молочной железы. Развитие дисморфизмов ооцитов у женщин, имеющих гематологический рак, может быть объяснено худшим общим состоянием пациенток и приемом лекарственных препаратов, рекомендованных гематологом. Частота оплодотворения, число бластоцист, а также число бластоцист отличного качества не отличались в зависимости от локализации онкологического процесса.

3.3. Характеристика протоколов стимуляции в зависимости от фазы менструального цикла

Были проанализированы результаты стимуляции яичников двух групп пациенток, обратившихся в раннюю фолликулярную или в лютеиновую фазы цикла.

В 1-ой группе пациенткам проводили контролируемую овариальную стимуляцию по стандартному протоколу с анГнРГ в фолликулярную фазу цикла (n=68).

Во 2-й группе проводили стимуляцию в лютеиновую фазу менструального цикла по random-start протоколу (n=72).

Характеристики протоколов стимуляции функции яичников в зависимости от фазы менструального цикла представлены в таблице № 13. Не было выявлено статистически значимой разницы по длительности стимуляции и стартовым дозам рФСГ и ЧМГ при начале стимуляции в различные дни менструального цикла. При этом суммарная доза затраченных гонадотропинов была статистически значимо выше при стимуляции во вторую фазу менструального цикла. Так, в фолликулярную фазу она составила 2025 МЕ (1706-2288), а в лютеиновую 2400 МЕ (2013-2725), $p=0,047$.

Таблица 13. Характеристики протоколов стимуляции в зависимости от фазы менструального цикла

Показатели	Стимуляция в ФФ (n=68)	Стимуляция в ЛФ (n=72)	p
Длительность стимуляции, дни	8 (7 – 10)	9 (6,5 – 11)	0,477
Суммарная доза ГТ, МЕ	2025 (1706 – 2288)	2400 (2013 – 2725)	0,002
Стартовая доза ФСГ, МЕ	225 (150 – 225)	225 (150 – 225)	0,221
Стартовая доза ЧМГ, МЕ	150 (75 – 150)	150 (75 – 150)	0,509

3.3.1. Динамические гормональные показатели индуцированных циклов

При проведении стимуляции яичников в различных протоколах особое внимание было уделено уровням гормонов в течение индуцированного цикла. Мы исследовали концентрации ФСГ, ЛГ, E₂ и прогестерона в 3-х точках в течение индуцированного цикла.

Эти данные представлены в таблице № 14.

Пациентки, стимулированные в разные фазы менструального цикла, были сопоставимы по параметрам овариального резерва, определяемого уровнем АМГ и КАФ. В день начала стимуляции уровень ФСГ был статистически значимо выше у пациенток в фолликулярной фазе цикла (9,1 (5,7 – 14,2) МЕ/л, 7,3 (4,8 – 11,4) МЕ/л, соответственно), по сравнению с значением этих гормонов при стимуляции в лютеиновую фазу. Это можно объяснить снижением уровня ФСГ в ответ на более высокие уровни эстрадиола и прогестерона, секретируемые желтым телом в лютеиновую фазу менструального цикла.

Важно отметить, что концентрация ЛГ во всех 3-х точках была сопоставимой, что не было ассоциировано с уровнями другого гонадотропина – ФСГ. Также ни в одном из случаев контролируемой овариальной стимуляции в лютеиновую фазу цикла нами не наблюдалась преждевременная овуляция, связанная с паразитарными пиками ЛГ. Этот факт можно объяснить протективным действием эндогенного прогестерона, продуцируемого функционально активным желтым телом при стимуляции в лютеиновую фазу цикла. Следовательно, при стимуляции в лютеиновую фазу менструального цикла можно обойтись без дополнительного назначения анГнРГ для предотвращения паразитарных пиков ЛГ, что является общепринятым при проведении классической стимуляции в фолликулярную фазу.

Анализ уровня E_2 показал статистически значимо более высокие значения гормона на начало стимуляции в лютеиновую фазу цикла, что закономерно при функционирующем желтом теле.

При этом, уже на 6-й день стимуляции и в день введения триггера овуляции уровень эстрадиола во второй группе был статистически значимо ниже, что может указывать на происходящие процессы лютеолиза и снижения функциональной активности желтым телом.

Уровень прогестерона также был значимо выше во вторую фазу менструального цикла, как на момент начала стимуляции функции яичников – 1,2 (0,6 – 1,6) нмоль/л и 14,0 (2,7 – 36,3) нмоль/л, $p < 0,001$, также и на 6-й день стимуляции функции яичников 1,5 (1,2 – 2,4) нмоль/л и 7,8 (2,2 – 21,3) нмоль/л, соответственно ($p < 0,001$). Однако в день введения триггера овуляции разницы в уровне прогестерона не обнаружено, что подтверждает произошедшую редукцию функциональной активности желтого тела.

Таблица 14. Гормональные показатели индуцированных циклов у пациенток двух групп

Показатели	Стимуляция в ФФ (n=68)	Стимуляция в ЛФ (n=72)	p-value
АМГ, нг/мл	1,5 (1,1 – 3,2)	1,8 (1,2 – 3,5)	0,196
ЛГ-1, МЕ/л	4,5 (2,6 – 7,3)	5,2 (1,9 – 8,3)	0,608
ЛГ-2, МЕ/л	2,4 (1,7 – 7,7)	2,8 (0,8 – 6,9)	0,739
ЛГ-3, МЕ/л	1,8 (1,0 – 3,1)	1,4 (0,3 – 2,8)	0,163
ФСГ, МЕ/л	9,1 (5,7 – 14,2)	7,3 (4,8 – 11,4)	0,018
Эстрадиол-1, пмоль/л	186 (155 – 284)	332 (222 – 570)	<0,001
Эстрадиол-2, пмоль/л	2765 (1200 – 5336)	1827 (936 – 2988)	0,010
Эстрадиол-3, пмоль/л	7800 (4139 – 12943)	5544 (3047 – 8126)	0,050
Прогестерон-1, нмоль/л	1,2 (0,6 – 1,6)	14,0 (2,7 – 36,3)	<0,001
Прогестерон-2, нмоль/л	1,5 (1,2 – 2,4)	7,8 (2,2 – 21,3)	<0,001
Прогестерон-3, нмоль/л	3,1 (1,3 – 5,7)	3,7 (2,0 – 6,1)	0,323
Количество антральных фолликулов	3 (4 – 10)	6 (5 – 8)	0,744

3.3.2. Характеристики оогенеза и раннего эмбриогенеза у пациенток исследуемых групп

Данные, приведенные в таблице № 15, показывают отсутствие различий в количестве полученных ооцитов, а также зрелых ооцитов при начале стимуляции разные фазы менструального цикла.

Таблица 15. Параметры оогенеза у пациенток в зависимости от фазы менструального цикла

Показатели	Стимуляция в ФФ (n=68)	Стимуляция в ЛФ (n=72)	p-value
Среднее число ОКК на 1 пациентку	7 (4 – 16)	10 (7 – 14)	0,236
Всего ОКК	715	766	
МII	520 (72,8%)	557 (72,6%)	0,521
MI	84 (11,7%)	68 (8,9%)	0,042
GV	73 (10,2%)	100 (13,1%)	0,052
Deg	38 (5,3%)	41 (5,4%)	0,182
Дисморфизмы ооцитов (MII)			
Ооциты с аномалиями полярного тельца	0	1 (0,2%)	0,517
Ооциты с зонами гладкого ЭПР	1 (0,2%)	8 (1,4%)	0,024
Ооциты с некротическими участками цитоплазмы	2 (0,4%)	9 (1,6%)	0,041
Ооциты с вакуолями	23 (4,4%)	10 (1,8%)	0,010
Ооциты с центральной гранулярностью	9 (1,7%)	37 (6,6%)	<0,001

Ооциты с повышенной вязкостью цитоплазмы	0	4 (0,7%)	0,074
Ооциты с расширенным перивителлиновым пространством	3 (0,6%)	2 (0,4%)	0,468

Как видно из анализируемых данных, в группе пациенток, стимулированных в фолликулярную фазу менструального цикла, было получено статистически значимое большее количество незрелых ооцитов (84 (11,7%) в 1-й группе и 68 (8,9%) во 2-й группе, $p=0,042$).

Не было выявлено значимых различий в результатах эмбриологического этапа – по количеству оплодотворенных ооцитов, количеству бластоцист, а также бластоцист отличного качества.

Обнаружена статистически значимо более частая встречаемость ооцитов с зонами гладкого ЭПР (8 (1,4%) против 1 (0,2%), $p=0,024$), с некротическими участками цитоплазмы (9 (1,6%) против 2 (0,4%), $p=0,041$) и с центральной грануляцией (37 (6,6%) против 9 (1,7%), $p < 0,001$) при стимуляции в лютеиновую фазу цикла, по сравнению с фолликулярной фазой, соответственно. При этом в фолликулярную фазу статистически значимо чаще выявлялись ооциты с вакуолями (23 (4,4%) против 10 (1,8%), $p=0,010$).

Таблица 16. Параметры эмбриогенеза у пациенток в зависимости от фазы менструального цикла

Показатели	Стимуляция в ФФ (n=68)	Стимуляция в ЛФ (n=72)	p-value
МП	520 (72,8%)	557 (72,6%)	0,521
Оплодотворение, пациентов*	45 (66,2%)	38 (52,8%)	0,075

Оплодотворение, ооцитов**	241 (46,4%)	204 (36,6%)	0,001
2pn всего***	194 (80,5%)	165 (80,9%)	0,508
Число бластоцист, всего****	110 (56,7%)	98 (59,4%)	0,342
Среднее число бластоцист на 1 пациентку	2 (1 – 4)	3 (2 – 4)	0,160
Число бластоцист отличного качества, всего	58 (29,9%)	46 (27,9%)	0,381
Число бластоцист отличного качества, среднее на 1 пациентку (из тех, у кого есть)	1,5 (1 – 3)	2 (1 – 2)	0,936

* % указан от числа пациенток;

** % указан от числа МП-ооцитов;

*** % указан от числа оплодотворяемых ооцитов (процент оплодотворения);

**** % указан от числа пациентов с оплодотворенными ооцитами;

***** % указан от числа 2pn ооцитов.

Представленные данные продемонстрировали сопоставимую эффективность стимуляции яичников в лютеиновую фазу цикла в сравнении с классической стимуляцией в фолликулярную фазу. Значимых различий по основным показателям индуцированного цикла, количеству и качеству полученных ооцитов/эмбрионов не выявлено, что позволяет оценивать этот способ стимуляции как эффективный не только у онкологических больных, но и в общеклинической практике. Вместе с тем, при анализе показателей стероидогенеза и динамических значений гонадотропинов возникает ряд вопросов, касающихся патогенетического обоснования возможности стимуляции яичников в лютеиновую фазу цикла, что потребовало дальнейшего анализа.

3.4. Характеристика протоколов стимуляции с добавлением ингибиторов ароматазы

Большинство специалистов рекомендуют использовать ингибиторы ароматазы в протоколах стимуляции больных раком молочной железы как гормонально-зависимой опухоли. Вместе с тем, объективного обоснования указанной тактики не приведено, а риск получения меньшего числа зрелых ооцитов имеет место. Решению указанных вопросов был посвящен следующий этап работы. В исследовании мы использовали дифференцированный подход к назначению ингибиторов ароматазы.

При обнаружении положительной экспрессии рецепторов к эстрогенам ER+ у пациенток с предполагаемым нормальным или чрезмерным ответом на стимуляцию функции яичников, к гонадотропинам, с целью протекции от возможного негативного влияния высоких уровней эстрадиола на течение основного заболевания, добавляли – ингибитор ароматазы (летрозол) в суточной дозе 2,5 мг.

Для определения исходов контролируемой овариальной стимуляции в модифицированных протоколах с ингибиторами ароматазы пациентки больные раком молочной железы (n=44) были поделены на 2 группы. В 1-ую группу (n=27) вошли пациентки, которым добавляли летрозол к гонадотропинам во время стимуляции, во 2-ую группу (n=17) которым проводилась стимуляция без добавления ингибиторов ароматазы.

В настоящем исследовании отправными точками для включения в протокол стимуляции ингибиторов ароматазы мы считали молекулярно-биологический подтип опухоли, наличие положительных рецепторов к эстрогенам и высокие показатели овариального резерва, предполагающие сверхфизиологические концентрации эстрадиола в преовуляторном периоде.

В таблице представлена сравнительная характеристика индуцированных циклов.

Таблица 17. Сравнительная характеристика протоколов стимуляции с добавлением ингибитора ароматазы

Показатели	Летрозол + (n=27)	Летрозол - (n=17)	p
Длительность стимуляции, дни	9 (8,75 – 10,25)	7 (5 – 10)	0,039
Стимуляция в ФФ	9 (33,3%)	8 (47,1%)	0,276
Стимуляция в ЛФ	18 (66,7%)	9 (52,9%)	
Суммарная доза ГТ, МЕ	2175 (2000 – 2850)	2363 (1660 – 2963)	0,893
Суммарная доза ФСГ, МЕ	1800 (135 – 2025)	1800 (1500 – 2100)	0,688
Суммарная доза ЧМГ, МЕ	900 (475 – 1200)	975 (544 – 2325)	0,465
Стартовая доза ФСГ, МЕ	225 (150 – 225)	225 (150 – 225)	0,422
Стартовая доза ЧМГ, МЕ	150 (75 – 125)	150 (93,75 – 262,5)	0,280

Как видно из данных, представленных в таблице № 17, длительность стимуляции яичников при добавлении ингибиторов была статистически значимо больше (9 (8,75 – 10,25) дней против 7 (5 – 10) дней, $p=0,039$), что можно объяснить более поздним созреванием ооцитов, происходящим на фоне блокирования конверсии андрогенов в эстрогены. Также триггер овуляции при стимуляции с добавлением ингибиторов ароматазы назначали при достижении как минимум 3-мя фолликулами диаметра 20 мм (а не 18 мм, как при стимуляции по стандартному протоколу). По остальным характеристикам статистически значимой разницы обнаружено не было.

3.4.1. Гормональные параметры индуцированных циклов с добавлением ингибиторов ароматазы

Для получения более достоверных данным нами отдельно были проанализированы пациентки с высокими параметрами овариального резерва (АМГ больше 3 нг/мл) и пациентки с нормальным овариальным резервом (от 1,0 до 3,0 нг/мл).

У пациенток со сниженным резервом, учитывая предполагаемое количество фолликулов (менее 4), и, как следствие, невысокие уровни эстрадиола, проводилась стимуляции без назначения ингибиторов, так как ожидаемый пиковый уровень эстрадиола практически не отличался от допустимых физиологических значений.

Таблица 18. Параметры овариального резерва

Показатели	Летрозол + (n=27)	Летрозол - (n=17)	p-value
АМГ, нг/мл	2,1 (1,5 – 4,2)	1,5 (1,1 – 2,3)	0,049
Количество антральных фолликулов	7 (6 – 10)	5 (4 – 7,5)	0,013

Анализируемые данные у пациенток с нормальным овариальным резервом представлены в таблице № 19.

Таблица 19. Гормональные параметры индуцированного цикла у пациенток с нормальным овариальным резервом

Показатели	Летрозол + (n=14)	Летрозол - (n=12)	p-value
АМГ, нг/мл	1,6 (1,4 – 1,7)	1,4 (1,1 – 1,9)	0,453

ЛГ-1, МЕ/л	2,9 (1,4 – 6,4)	3,1 (1,0 – 8,5)	0,987
ЛГ-2, МЕ/л	3,6 (2,1 – 6,8)	1,7 (0,4 – 2,4)	0,066
ЛГ-3, МЕ/л	1,8 (1,7 – 3,7)	0,4 (0,1 – 1,6)	0,003
ФСГ, МЕ/л	4,5 (3,1 – 9,5)	9,7 (6,0 – 12,4)	0,035
Эстрадиол-1, пмоль/л	350 (210 – 1272)	326 (282 – 355)	0,690
Эстрадиол-2, пмоль/л	1827 (750 – 2048)	1160 (828 – 2824)	0,849
Эстрадиол-3, пмоль/л	4164 (3597 – 6140)	6833 (1936 – 9864)	0,454
Прогестерон-1, нмоль/л	38,5 (27,1 – 54,6)	1,9 (0,8 – 22,3)	0,029
Прогестерон-2, нмоль/л	15 (1,3 – 35,8)	2,8 (0,7 – 16,0)	0,287
Прогестерон-3, нмоль/л	4,3 (1,6 – 6,2)	3,5 (1,5 – 14,5)	0,942
Количество антральных фолликулов	6 (5 – 7)	5 (4 – 6,75)	0,307

Как видно из анализируемых параметров, статистически значимой разницы преовуляторных уровней эстрадиола и прогестерона в лютеиновую фазу цикла в протоколах с назначением ингибиторов или же без них у пациенток с нормальным овариальным резервом не обнаружено.

У пациенток с высокими параметрами овариального резерва (АМГ более 3,0 нг/мл) уровень эстрадиола в 3-й контрольной точке (в день назначения триггера овуляции) был статистически значимо ниже, по сравнению с аналогичной группой пациенток, проходящих стимуляцию без назначения ингибиторов ароматазы. Вместе с тем, преовуляторные значения эстрадиола продолжали оставаться выше физиологической нормы.

Анализируемые параметры стероидогенеза у пациенток с высоким овариальным резервом представлены в таблице № 20.

Таблица 20. Гормональные параметры индуцированного цикла у пациенток с высоким овариальным резервом

Показатели	Летрозол + (n=12)	Летрозол - (n=26)*	p-value
АМГ, нг/мл	4,5 (3,6 – 5,3)	4,4 (3,5 – 5,8)	0,834
ЛГ-1, МЕ/л	7,2 (6,0 – 9,2)	7,9 (5,8 – 9,6)	0,638
ЛГ-2, МЕ/л	1,7 (0,3 – 7,8)	4,1 (2,6 – 8,4)	0,112
ЛГ-3, МЕ/л	2,0 (1,4 – 3,7)	2,0 (0,7 – 4,4)	0,682
ФСГ, МЕ/л	5,2 (4,7 – 12,4)	6,7 (4,7 – 7,4)	0,670
Эстрадиол-1, пмоль/л	348 (153 – 539)	193 (150 – 344)	0,148
Эстрадиол-2, пмоль/л	1795 (1253 – 3621)	3328 (1171 – 5224)	0,850
Эстрадиол-3, пмоль/л	7824 (5815 – 8551)	10608 (6171 – 15497)	0,045

Прогестерон-1, нмоль/л	2,1 (1,2 – 37,6)	1,1 (0,9 – 2,1)	0,040
Прогестерон-2, нмоль/л	4,5 (1,4 – 44,1)	4,1 (1,5 – 4,6)	0,612
Прогестерон-3, нмоль/л	4,2 (3,6 – 14,9)	4,1 (2,6 – 8,6)	0,336
Количество антральных фолликулов	10 (6,5 – 15)	9 (5 – 10)	0,140

Таким образом, включение ингибиторов ароматазы в протоколы стимуляции способствует некоторому снижению преовуляторного уровня эстрадиола (в среднем на 20%) при высоком овариальном резерве и гиперэргическом ответе яичников. Однако это снижение не обеспечивает физиологические концентрации, поэтому вопрос о значимости некоторого снижения уровней эстрадиола на фоне приема ингибиторов ароматазы продолжает оставаться спорным. При нормальных и сниженных показателях овариального резерва, когда преовуляторного периода достигают не более 4-7 фолликулов, а уровни эстрадиола незначительно превышают физиологические значения, использование ингибиторов ароматазы не сказывается на этих значениях.

3.4.2. Характеристики оогенеза и раннего эмбриогенеза в модифицированных протоколах с добавлением ингибиторов ароматазы

С целью практического обоснования нашей тактики дифференцированного и персонализированного назначения ингибиторов ароматазы в циклах контролируемой овариальной стимуляции были проанализированы основные параметры оо- и эмбриогенеза в группах пациенток с назначением ингибитора ароматазы и без него.

Таблица 21. Анализ параметров оогенеза у пациенток с нормальным овариальным резервом

Показатели	Летрозол + (n=14)	Летрозол - (n=12)	p-value
Среднее число ОКК на 1 пациентку	12 (11 – 13)	6,5 (3,5 – 9)	0,0005
Всего ОКК	174	80	
МII	103 (59,2%)	65 (81,3%)	<0,0001
MI	31 (17,8%)	6 (7,5%)	0,021
GV	28 (16,1%)	6 (7,5%)	0,043
Deg	12 (6,9%)	2 (2,5%)	0,127
Дисморфизмы ооцитов (MII)			
Ооциты с аномалиями полярного тельца	0	0	---
Ооциты с зонами гладкого ЭПР	2 (0,8%)	0	0,486
Ооциты с некротическими участками цитоплазмы	3 (1,2%)	0	0,339
Ооциты с вакуолями	5 (1,9%)	0	0,164
Ооциты с центральной гранулярностью	20 (7,7%)	4 (3,5%)	0,099
Ооциты с повышенной вязкостью цитоплазмы	0	0	---
Ооциты с расширенным перивителлиновым пространством	2 (0,8%)	3 (2,7%)	0,164

Эмбриологические результаты контролируемой овариальной стимуляции в модифицированном протоколе с ингибитором ароматазы (летрозолом) показали, что добавление ингибиторов к гонадотропинам приводит к статистически

значимому увеличению количества незрелых ооцитов. Так в 1-й группе число зрелых ооцитов – 103 (59,2%), во 2-й группе 65 (81,3%), $p < 0,0001$. При этом число незрелых ооцитов, как на стадии MI, так и GV в 1-й группе статистически значимо выше.

Не было выявлено статистически значимого повышения частоты встречаемости наиболее распространенных дисморфизмов ооцитов.

Анализ параметров эмбриогенеза у пациенток с нормальным овариальным резервом не показал статистически значимой разнице ни в частоте оплодотворения, ни в количестве полученных бластоцист.

Таблица 22. Анализ параметров эмбриогенеза у пациенток с нормальным овариальным резервом

Показатели	Летрозол + (n=14)	Летрозол - (n=12)	p-value
Криоконсервировано ооцитов, всего*	57 (55,3%)	29 (41,5%)	0,056
Среднее число криоконсервированных ооцитов на 1 пациентку	7 (4 – 10)	8 (1,5 – 9)	0,250
Количество оплодотворенных ооцитов*	46 (44,7%)	36 (58,5%)	0,056
2pn, всего**	34 (73,9%)	32 (88,9%)	0,076
Число бластоцист, всего***	17 (50,0%)	16 (50,0%)	0,597
Среднее число бластоцист на 1 пациентку	2 (2 – 3,5)	2 (1 – 4)	0,591

* % указан от числа МII-ооцитов;

** % указан от числа оплодотворяемых ооцитов (процент оплодотворения);

*** % указан от числа 2pn ооцитов.

У пациенток с высоким овариальным резервом, негативное влияние ингибиторов ароматазы на процесс созревания клеток компенсируется их количеством.

Таблица 23. Анализ параметров эмбриологического этапа у пациенток с высоким овариальным резервом

Показатели	Летрозол + (n=12)	Летрозол - (n=26)	p-value
Среднее число ОКК на 1 пациентку	15 (9 – 27)	16 (10 – 21)	0,834
Всего ОКК	221	420	
МII	146 (66,1%)	304 (72,4%)	0,059
MI	24 (10,8%)	38 (9,0%)	0,273
GV	39 (17,7%)	50 (11,9%)	0,031
Deg	12 (5,4%)	28 (6,7%)	0,334
Криоконсервировано ооцитов всего*	141 (96,6%)	212 (79,7%)	<0,0001
Среднее число криоконсервированных ооцитов на 1 пациентку	13 (10 – 19,5)	10,5 (6 – 14)	0,106
Количество оплодотворенных ооцитов*	5	92	<0,0001
2pn всего**	4 (80,0%)	68 (73,9%)	0,616

* % указан от числа MII-ооцитов;

** % указан от числа оплодотворяемых ооцитов (процент оплодотворения);

Результаты исследования показали, что включение ингибиторов ароматазы в протоколы стимуляции способствует получению меньшего количества зрелых ооцитов.

Полученные данные продемонстрировали возможность использования ингибиторов ароматазы в протоколах стимуляции при прогнозируемом гиперответе яичников, что сопряжено с высокими характеристиками овариального резерва пациенток. При этом, получение большого количества ооцитов компенсирует значимый процент незрелых клеток, т.к. для криоконсервации остается достаточное количество зрелых ооцитов. В случаях прогнозируемого получения не более 7 ооцитов (нормальные и сниженные параметры овариального резерва) значительная доля незрелых ооцитов может явиться причиной отсутствия материала, пригодного для криоконсервации, что делает сомнительной необходимость добавлять ингибиторы ароматазы в протоколы стимуляции при нормальных и сниженных показателях резерва.

3.5. Характеристики оогенеза и раннего эмбриогенеза у пациенток с BRCA-мутацией

Нами были проанализированы исходы контролируемой овариальной стимуляции в зависимости от носительства герминальной мутации в гене BRCA у больных раком молочной железы (табл. № 24).

Как видно из представленных данных, количество полученных клеток, зрелых ооцитов, ооцитов на стадии MII в обеих группах пациентов было сопоставимым. При этом количество дегенеративных ооцитов было статистически значимо больше в группе пациенток-носительниц герминальной мутации в гене BRCA. Вопрос о влиянии носительства герминальной мутации в гене BRCA на репродуктивную функцию женщины, качество ооцитов, их способность к оплодотворению и формированию полноценного эмбриона поднимается в литературе, однако, консолидированного мнения на сегодня нет. Есть упоминания о худшем качестве гамет и эмбрионов у женщин, носительниц герминальной мутации в гене BRCA.

Полученные нами данные подтверждают эту точку зрения, однако недостаточный объем материала настоящего исследования позволяет говорить лишь о возможном влиянии носительства мутации в гене BRCA на репродуктивную систему женщины.

Таблица 24. Анализ параметров эмбриологического этапа у пациенток с обнаруженной мутацией в гене BRCA

Показатели	BRCA + (n=10)	BRCA - (n=34)	p- value
Среднее число ОКК на 1 пациентку	15 (10 – 27)	11 (6 – 13)	0,033
Всего ОКК	197	348	
МП	128 (65,1%)	246 (70,7%)	0,100
MI	20 (10,1%)	42 (12,1%)	0,298
GV	32 (16,2%)	49 (14,1%)	0,287
Deg	17 (8,6%)	11 (3,1%)	0,006
Дисморфизмы ооцитов (МП)			
Ооциты с аномалиями полярного тельца	0	0	---
Ооциты с зонами гладкого ЭПР	1 (0,8%)	1 (0,4%)	0,568
Ооциты с некротическими участками цитоплазмы	3 (2,3%)	0	0,039
Ооциты с вакуолями	0	5 (2,0%)	0,121
Ооциты с центральной гранулярностью	2 (1,6%)	22 (8,9%)	0,003
Ооциты с повышенной вязкостью цитоплазмы	0	0	---

Ооциты с расширенным перивителлиновым пространством	0	5	0,121
---	---	---	-------

3.6. Возможное патогенетическое обоснование стимуляции в разные фазы и дни менструального цикла

Одним из ключевых вопросов репродуктивной медицины является изучение фундаментальных аспектов биологии фолликулогенеза. Клиническая практика, показавшая возможность стимуляции яичников с любого дня менструации, заставила пересмотреть существующую теорию однократного рекрутирования пула фолликулов в течение менструального цикла и способствовала возникновению новых предположений о «волновом» или «непрерывном» характере рекрутирования когорты фолликулов.

Для иллюстрации правомочности «волновой» теории фолликулогенеза и, возможно, непрерывно происходящего рекрутинга фолликулов, нами были проанализированы исходы контролируемой овариальной стимуляции, а именно: характеристики протоколов стимуляции, параметры стероидогенеза индуцированного цикла, показатели этапа у пациенток, которым стимуляция функции яичников проводилась с любого дня менструального цикла.

Пациентки, в зависимости от дня начала стимуляции были поделены на 5 групп. В 1-ую группу вошли пациентки, которым была начата контролируемая овариальная стимуляция с 1 по 5 день цикла; во 2-ую группу с 6 по 10 день, в 3-ю группу с 11 по 15, в 4-ю с 16 по 22, в 5-ю с 23 по 28 день цикла.

Анализируемые данные представлены в таблице № 25.

Таблица 25. Характеристики протоколов стимуляции с любого дня менструального цикла

Показатели	1-5 (n=65)	6-10 (n=7)	11-15 (n=9)	16-22 (n=44)	23-28 (n=15)	p-value
Длительность стимуляции, дни	8 (7 – 10)	7 (4,5 – 9,5)	9 (8 – 11)	9 (6 – 11)	10 (7 – 12)	0,480
Суммарная доза ГТ, МЕ	2063 (1800 – 2363)	1650 (825 – 2100)	3000 (2250 – 3050) ²	2400 (1969 – 2775)	2400 (1963 – 2700)	0,002
Стартовая доза ФСГ, МЕ	225 (150 – 225)	150	225 (150 – 225)	225 (150 – 225)	150 (150 – 225)	0,180
Стартовая доза ЧМГ, МЕ	150 (75 – 150)	150	150 (112,5 – 150)	150 (75 – 150)	75 (75 – 112,5)	0,340

¹ – p<0,05 при сравнении с группой 2.

Не было обнаружено статистически значимой разницы в длительности стимуляции, стартовой дозе ФСГ и ЧМГ. Суммарная доза затраченных гонадотропинов было статистически значимо выше в случае начала контролируемой овариальной стимуляции с 11 по 15 день менструального цикла.

Основными изучаемыми параметрами являлись исходы эмбриологического этапа программ ВРТ.

Исходя из данных, представленных в таблице № 26, наибольшее количество ОКК было получено у пациенток 5-й группы, которым стимуляция функции яичников начиналась с 23 по 28 день менструального цикла. Наибольшее же

количество зрелых ооцитов, было получено в 4-й и 1-й группах пациенток, начало стимуляции которых выпало на 16-22 день цикла и на 1-5 день цикла. Во 2-й группе было получено наибольшее количество незрелых ооцитов (GV) по сравнению с 4-й группой (37 (9,1%) и 21 (20,2%).

Таблица 26. Анализ параметров оо- и эмбриогенеза у пациенток, стимуляция которым проводилась вне зависимости от дня менструального цикла

Показатели	1-5 (n=65)	6-10 (n=7)	11-15 (n=9)	16-22 (n=44)	23-28 (n=15)	p-value
Среднее число ОКК на 1 пациентку	7 (3,5 – 15,5)	22 (2 – 24)	8 (7 – 11)	9,5 (5,5 – 12,5)	11 (9 – 21) ¹	0,030
Всего ОКК	675	104	79	405	109	
МII	492 (72,9%) ²	64 (61,5%)	55 (69,6%)	314 (77,5%) ²	152 (69,7%)	0,001
MI	78 (11,5%)	8 (7,7%)	14 (17,7%)	36 (8,9%)	16 (7,3%)	0,072
GV	76 (11,3%)	21 (20,2%)	7 (8,9%)	37 (9,1%) ²	32 (14,7%)	0,028
Deg	29 (4,3%) ²	11 (10,6%)	3 (3,8%)	18 (4,5%) ²	9 (4,1%) ²	0,029

¹– p<0,05 при сравнении с группой 1.

²– p<0,05 при сравнении с группой 2

Результаты исследования подтвердили возможность проведения стимуляции с любого дня менструального цикла и получения ооцитов при произвольном начале стимуляции. Однако, эффективность протоколов по числу полученных зрелых ооцитов незначительно различалась. Наиболее благоприятными оказались 1-5 день цикла, 16-22 и 23-28 дни цикла. 1-5 день – ранняя фолликулярная фаза, когда еще

нет доминантного фолликула; 16-22 день – период после овуляции, характеризующийся падением концентраций эстрадиола и 23-28 дни – конец лютеиновой фазы, характеризующийся физиологическим падением эстрадиола перед менструальным кровотечением.

Полученные данные позволили предположить, что рекрутинг фолликулов происходит постоянно, но на этом фоне формируются благоприятные «волны», манифестацией которых является снижение концентраций эстрадиола.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ данных мировой литературы свидетельствует об усиливающемся интересе специалистов к проблеме сохранения репродуктивного материала онкологических больных для отсроченного деторождения. Если на первых этапах, по мнению некоторых авторов, методики предварительной консервации ооцитов носили больше характер психологической поддержки молодых больных, т.к. частота востребованности сохраненного материала не превышала 10%, то сейчас 35% больных возвращаются для реализации репродуктивной функции [171, 182-185]. Эта цифра непременно будет расти, что делает сохранение репродуктивного материала онкологических больных клинически значимым направлением медицины.

Оправданность проведения подобных работ определяется социальными и этическими позициями, которые представлены в настоящей работе и соответствуют мировым данным. Это женщины в возрасте от 18 до 42 лет, 71% из них не имеют детей, а 57% состоят в стойких партнерских отношениях. Пациенткам планировали проведение химиотерапии как первого этапа лечения, при этом риск потери или резкого снижения репродуктивной функции составляет не менее 70%, о чем свидетельствуют и результаты настоящего исследования.

39 женщин обратились после лечения онкологического заболевания, при этом, несмотря на репродуктивный возраст, у 19 из них диагностировано истощение яичников, у 20 – резкое снижение овариального резерва. Ни в одном случае не было получено эмбриона «отличного» морфологического качества и беременности. Все это несомненно свидетельствует о необходимости предварительной криоконсервации репродуктивного материала, что подчеркивается всеми специалистами и внесено в клинические рекомендации многих стран [16, 69].

Конечно, в недалеком будущем будут разработаны и использованы в клинической практике новые методы таргетной терапии, способные сохранить функцию яичников, но сейчас используют химиотерапевтические агенты,

имеющие гонадотоксическое воздействие, что подтверждено настоящим исследованием.

Непреложным условием проведения программ ВРТ, направленных на сохранение репродуктивного материала онкологических пациенток, является разрешение онкологов, которые определяют стадию заболевания и перспективы выживаемости пациенток. Эти условия в полной мере соблюдены в настоящем исследовании. Все обратившиеся пациентки имели начальную стадию рака, хороший прогноз излечения, заключение онколога и прошли междисциплинарный консилиум. Проведенное исследование позволило выделить ряд онкологических показаний для направления пациенток на программы ВРТ, перед началом гонадотоксичной терапии:

- отсутствие факторов неблагоприятного прогноза: T3–4, N+, G3, гиперэкспрессия/амплификация HER2, высокий уровень Ki67, выраженная лимфоваскулярная инвазия;
- высокая и умеренная степени гонадотоксичности предстоящего лечения.

После обследования 296 больных были отобраны 140 пациенток, которым было возможно проведение программ ВРТ с целью забора и криоконсервации репродуктивного материала. Ключевыми моментами определения показаний для стимуляции яичников в программах ВРТ явились онкологические данные, высокий риск потери репродуктивной функции, состояние овариального резерва, дающее возможность получить ооциты, молодой возраст женщины и ее осознанное желание сохранить свой биологический материал.

57-ми пациенткам предложены другие методы, а именно забор яичника или его части при хирургическом лечении с последующим выделением незрелых ооцитов и проведением программ IVМ. Показаниями явились рак яичника, а также другие онкологические процессы органов малого таза, предполагающие радикальное оперативное вмешательство и невозможность трансвагинальной пункции фолликулов. Кроме того, лечение не проводилось пациенткам позднего

репродуктивного возраста с крайне низкими показателями овариального резерва. Выполнение этой части работы позволило сформулировать показания для проведения стимуляции яичников в программах ЭКО с целью получения и сохранения репродуктивного материала. Ими явились: молодой возраст пациенток с любой локализацией онкологического процесса начальной стадии, кроме рака яичников.

Определение нозологической формы рака у исследуемой когорты больных (n=140), позволило выделить группы пациенток в зависимости от локализации онкологического процесса. В I группу включены больные раком молочной железы (n=44), во II группы с диагностированным раком шейки матки (n=30), в III группу пациентки с гематологическим раком (n=37), в IV были объединены пациентки с другими онкологическими нозологиями (n=29).

Наиболее частой онкологической нозологией, встречающейся у пациенток, был рак молочной железы, а именно его люминальный В HER2-негативный подтип (19/44 пациенток), что полностью подтверждает данные других специалистов, определяющих рак молочной железы как наиболее часто встречающуюся патологию в программах онкофертильности [67, 77].

Все пациентки соответствовали критериям включения, имели нормальные или высокие показатели овариального резерва, обеспечивающие получение достаточного количества ооцитов.

Вопрос о возможном влиянии онкологического заболевания на репродуктивную систему, особенно, если речь идет о раке молочной железы и гематологическом раке, поднимается в литературе [22, 40, 41, 42, 72, 160]. Однако, каких-либо доказательных данных не приведено в изучаемых источниках.

Мы попытались оценить число и качество полученных ооцитов у больных с различными нозологическими формами рака. Для получения более достоверных данных сравнение проводилось не только в основных группах исследования, но и

с контрольной группой, в которую входили сопоставимые по возрасту и овариальному резерву пациентки с трубно-перитонеальным фактором бесплодия.

Статистически значимая разница в количестве полученных зрелых ооцитов наблюдалась в группе больных раком молочной железы (374 (68,6%) и 205 (77,4%), 304 (76,4%), 194 (71,0%), 240 (75%) в оставшихся группах, соответственно, $p=0,005$). Это в первую очередь можно объяснить частым назначением препаратов группы ингибиторов ароматазы (летрозол) и его негативным влиянием на оогенез.

Также по представленным данным, в группе пациенток с гематологическим раком статистически значимо чаще встречались ооциты с цитоплазматическими вакуолями (в 3-й группе в 23 (7,6%) клетках, в 1-й группе у 5 (1,3%), во 2-й группе у 1 (0,5%) клетки и в 4-й группе в 4 (1,5%) клетках, в 1-й (0,31%) у пациенток 5-й группы, $p<0,001$).

Однако эти данные сложно считать объективными вследствие небольшой выборки и того факта, что больные гематологическим раком имели худшие показатели общего здоровья и получали терапию, назначенную гематологом.

Таким образом, был сделан вывод, что нозологическая форма рака не влияет на количество и качество полученных яйцеклеток, которые определяются в первую очередь возрастом и состоянием овариального резерва пациенток. Тем не менее, нужно иметь в виду, что лечению подвергались женщины с начальными формами рака, когда состояние их общего здоровья не страдало.

Важным этапом работы был анализ числа и качества ооцитов, полученных у больных раком молочной железы с выявленной мутацией BRCA. Этот вопрос довольно широко обсуждается в литературе, но ни в одной из публикаций не представлены убедительные и объективные данные о влиянии данной мутации на репродуктивную систему женщины [40-42, 150]. В настоящем исследовании лечение проводили 10 женщинам, больным раком молочной железы, с выявленной мутацией BRCA. Полученные нами данные подтверждают точку зрения о возможном негативном влиянии мутации на исходы контролируемой овариальной

стимуляции, однако недостаточный объем материала настоящего исследования позволяет говорить лишь о возможном влиянии носительства мутации в гене BRCA на репродуктивную систему женщины.

Основной задачей настоящего исследования явилось разработка протоколов стимуляции с любого дня менструального цикла – random-start протоколов, и оценка их эффективности.

Необходимость модификации протоколов стимуляции у онкологических больных объясняется ургентностью ситуации, когда онкологи направляют больную, не учитывая день ее менструального цикла и определяя срок лечения 12-14 днями до начала химиотерапии. Вынужденность ситуации привела к формированию нового направления в репродуктивной медицине и породила интерес к осмыслению и пересмотру сложившихся представлений о эндокринной регуляции фолликулогенеза и овуляции.

В последние годы публикуется много работ, оценивающих результаты стимуляции яичников в Random-start режимах [66, 107, 110, 111, 137, 147, 149, 157]. Если обобщить данные имеющихся исследований, то вывод о возможности и эффективности стимуляции яичников в лютеиновую фазу цикла не вызывает сомнения, что является крайне важным для онкологических больных. Вместе с тем, многие вопросы решены не до конца: одинаково ли количество и качество ооцитов, полученных при начале стимуляции в разные дни цикла, как проводить стимуляцию в лютеиновую фазу цикла при наличии функционирующего желтого тела и другие [66, 110, 137, 147, 149, 157]. Практически нет исследований относительно характера стероидогенеза при стимуляции в лютеиновую фазу цикла, при функционирующем желтом теле. Все это порождает неопределенность практических подходов, а именно, нужно ли назначать антагонисты ГнРГ при стимуляции в лютеиновую фазу цикла.

Решению этих вопросов посвящен ключевой раздел настоящего исследования. Были отобраны группы больных, репрезентативные по возрасту и состоянию

овариального резерва. 68 пациенткам проведена стимуляция в раннюю фолликулярную фазу цикла, 72 стимуляция в лютеиновую фазу, при констатации желтого тела в яичниках. Было выявлено статистически значимое отличие в суммарной дозе затраченных гонадотропинов (2025 (1706-2288) МЕ в фолликулярную фазу цикла и 2400 (2013-2725) МЕ – в лютеиновую, $p=0,047$). При этом длительность стимуляции не зависела от фазы цикла.

Полученные нами данные не вполне совпадают с мнением некоторых специалистов, в частности М. van Wolff, который является авторитетом в этой области и считает, что стимуляция в лютеиновую фазу требует более длительного введения гонадотропинов [78, 147]. Наши данные указывают, что как при стимуляции в фолликулярную фазу цикла, так и в лютеиновую, определяющим фактором является состояние овариального резерва. По числу и качеству полученных ооцитов также не было выявлено различий при стимуляции в разные фазы цикла (520 (72,8%) и 557 (72,6%) зрелых ооцитов, соответственно, $p=0,521$). Таким образом, результаты проведенного исследования подтвердили возможность и эффективность стимуляции яичников в лютеиновую фазу цикла, что крайне важно для снятия ограничений при лечении онкологических больных.

Вместе с тем, дискуссионными являются вопросы тактики проведения стимуляции в лютеиновую фазу менструального цикла, а именно наличие паразитарных пиков ЛГ и необходимость использования антГнРГ при стимуляции во вторую фазу цикла. Для разрешения этих противоречий мы исследовали динамические уровни гормонов при стимуляции в лютеиновую фазу, сравнивая их с таковыми в течение классической стимуляции в раннюю фолликулярную фазу.

Уровень ФСГ на момент начала стимуляции яичников в лютеиновую фазу цикла был ниже, по сравнению с фолликулярной фазой (9,1 (5,7 – 14,2) в ФФ и 7,3 (4,8 – 11,4) в ЛФ, $p=0,018$), что объясняется механизмов обратной отрицательной связи и более высокими уровнями половых стероидов, секретлируемых желтым

телом. По всей видимости, этот факт способствует «естественной» синхронизации роста фолликулов, что подтверждено результатами настоящего исследования.

Закономерно при начале стимуляции в ЛФ регистрировались высокие уровни половых стероидов (E_2 : 186 (155 – 284) пмоль/л против 332 (222 – 570) пмоль/л, $p < 0,001$; Р: 1,2 (0,6 – 1,6) нмоль/л против 14,0 (2,7 – 36,3) нмоль/л, соответственно, $p < 0,001$).

Интересно отметить отсутствие паразитарных пиков ЛГ при стимуляции без добавления антагонистов в лютеиновую фазу цикла, что обеспечивается протективным действием высокого уровня эндогенного прогестерона. Этот факт отметили и другие исследователи [47, 48]. При этом к моменту введения триггера овуляции зафиксированы сопоставимые значения прогестерона в обеих группах (3,1 (1,3 – 5,7) нмоль/л против 3,7 (2,0 – 6,1) нмоль/л, $p = 0,323$, соответственно). Вместе с тем, явления снижения функциональной активности желтого тела, зарегистрированы с 6-7 дня лютеиновой фазы, что манифестировалось начинающимся снижением уровня прогестерона (1,5 (1,2 – 2,4) нмоль/л против 7,8 (2,2 – 21,3) нмоль/л, соответственно, $p < 0,001$). Этот факт, по нашему мнению, имеет практическое значение в решении вопроса назначения антГнРГ при стимуляции в лютеиновую фазу. Если стимуляция начинается в раннюю секреторную фазу, при активном желтом теле, то можно обойтись без назначения антГнРГ, если начало стимуляции приходится на позднюю секреторную фазу, в период начинающегося лютеолиза, то антГнРГ надо вводить в протокол стимуляции, особенно при сниженном резерве яичников. Механизм предположительного защитного эффекта эндогенного прогестерона представлен на рис. № 9.

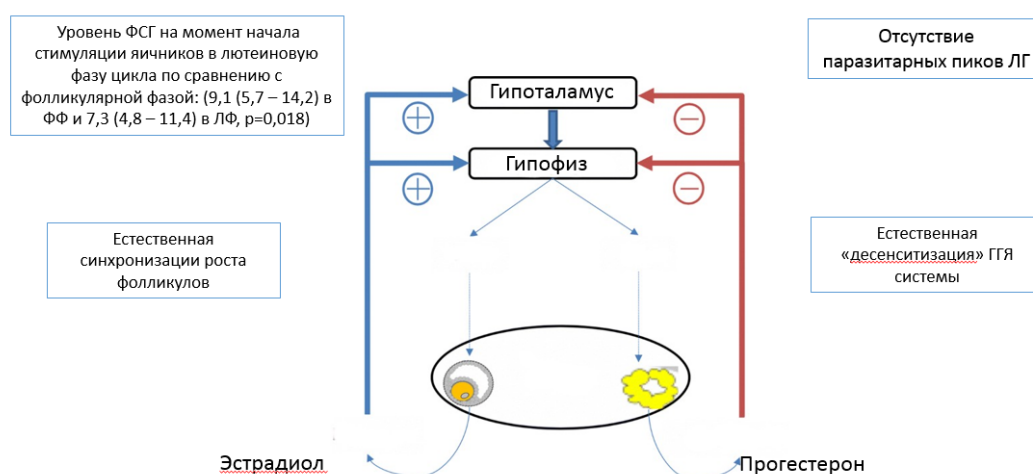


Рис. 9. Особенности стероидогенеза в циклах контролируемой овариальной стимуляции в лютеиновую фазу менструального цикла.

Нерешенным вопросом является необходимость добавления антиэстрогенов в протоколы стимуляции у больных раком молочной железы. В большинстве клинических рекомендаций антиэстрогены рекомендуют назначать при этих ситуациях [32, 177], при этом тамоксифен и ингибиторы ароматазы рекомендуются в равной степени [74]. В настоящем исследовании у небольшой группы больных мы провели попытку овариальной стимуляции на фоне приема тамоксифена, при этом ни в одном случае не было получено зрелого ооцита. Кроме того, условия для проведения стимуляции были неудовлетворительные: персистировали фолликулярные кисты, регистрировалась гиперплазия эндометрия. Мы считаем, что тамоксифен нельзя рассматривать как препарат «защиты» при проведении стимуляции яичников. Мы, как и большинство исследователей, рассматривали ингибиторы ароматазы (летрозол) как протективное средство в протоколах стимуляции при раке молочной железы [50, 100, 103, 157].

Основными вопросами, обсуждаемыми в литературе, являются следующие. Действительно ли назначение летрозола снижает преовуляторные уровни эстрадиола вплоть до физиологических значений и не снижается ли количество качественных ооцитов при использовании такого протокола? Мнения специалистов по этим вопросам противоречивы. В настоящем исследовании были

проанализированы протоколы стимуляции у пациенток с различными параметрами овариального резерва. Ведь при значительной гиперстимуляции, росте и получении более 15 ооцитов предполагается высокие уровни преовуляторного эстрадиола, что теоретически, нежелательно при гормоночувствительных опухолях. Сравнив преовуляторные уровни эстрадиола и число полученных ооцитов в других группах пациенток с высоким овариальным резервом с добавлением летрозолла и без такового, было показано, что летрозол снижает преовуляторные уровни эстрадиола, но не до физиологических значений у пациенток с высокими параметрами овариального резерва (E_2 : 7824 (5815 – 8551) пмоль/л против 10608 (6171 – 15497) пмоль/л, $p = 0,045$). При этом назначение летрозолла не приводило к статистически значимому снижению количества зрелых ооцитов. В случае же нормального и сниженного овариального резерва статистически значимого снижения преовуляторных значений эстрадиола не зафиксировано, в то же время зрелых ооцитов получено меньше (103 (59,2%) и 65 (81,3%), $p < 0,0001$ соответственно), что может играть критическую роль для пациенток со сниженными показателями овариального резерва. По нашему мнению, назначение ингибиторов ароматазы является оправданным у пациенток с высокими параметрами овариального резерва и ожидаемым чрезмерным ответом на контролируемую овариальную стимуляцию, когда прогнозируется получение более 15 ооцитов. В других ситуациях польза назначения ингибиторов ароматазы не очевидна, в тоже время можно не выполнить основную задачу – криоконсервацию достаточного количества ооцитов для обеспечения отсроченного деторождения.

Положительные клинические результаты, демонстрирующие возможность стимуляции яичников в любой день менструального цикла и получения достаточного количества зрелых ооцитов, заставляют задуматься о физиологии фолликулогенеза в течение менструального цикла и, возможно, пересмотреть фундаментальные позиции этого процесса, сформулированные в середине

прошлого столетия. По классическим представлениям, стимуляция яичников в любой день менструального цикла невозможна. Физиология фолликулогенеза сформулирована так: формирование когорты фолликулов в середине ЛФ предыдущего цикла, вступление этой когорты в гонадотропинзависимую фазу в начале следующего цикла (начало цикла – первый день менструации), формирование доминантного фолликула и атрезия остальных в середине фолликулярной фазы, овуляция доминантного фолликула, формирование желтого тела и апоптоз других фолликулов, формирование нового пула в середине лютеиновой фазы, что предполагает рекрутирование лишь одного пула фолликулов, овуляция одного и гибель остальных [52].

В настоящем исследовании мы попытались обосновать возможность стимуляции яичников в любой день менструального цикла в противовес классической клинической тактики стимуляции с начала фолликулярной фазы, базирующейся на формировании одного пула фолликулов, способных подвергаться стимуляции гонадотропинами.

Были сформированы группы больных, которым стимуляция проводилась начиная с 1-5 дня менструального цикла, с 6 по 10, с 11 по 15, с 16 по 22 и с 23 по 28 дни. Меньшее число зрелых ооцитов (64 (61,5%) по сравнению с 492 (72,9%) и 314 (77,5%), $p=0,001$) было получено во 2-й группе, у пациенток, которым овариальная стимуляция проводилась с 6-10 день менструального цикла, по сравнению с пациентками, которым введение гонадотропинов начинали с 1 по 5 день менструального цикла и с 16 по 22 дни цикла.

При анализе полученных данных и сопоставлении их с динамикой фолликулогенеза, по данным УЗ-мониторинга, было выявлено, что меньшее число зрелых ооцитов было получено, когда стимуляцию начинали при наличии доминантного фолликула, когда еще не произошла овуляция. Эти периоды совпадали с более высокими концентрациями эстрадиола и, соответственно, более низкими уровнями ФСГ.

Представленные результаты позволяют сделать вывод о том, что формирование пула фолликулов, более чувствительных к гонадотропной стимуляции, происходит при снижении уровня эстрадиола и, соответственно, повышении значений ФСГ. При 28-30-дневном менструальном цикле эти периоды соответствуют 1-5-му дню, 16-22-му дням цикла и 23-28-м дням цикла.

Интересным явилось наблюдение удачной стимуляции, начатой на 25-26-27 день, к концу секреторной фазы, накануне менструации. Но именно в этот период отмечено падение E_2 до самых низких значений и повышение уровня ФСГ. Указанные сведения позволили предположить, что начало цикла или ранняя фолликулярная фаза, это момент падения уровня эстрадиола, а кровяные выделения (менструация), что принято считать началом нового цикла, запаздывают от дня падения эстрадиола приблизительно на 48 часов.

Обобщая полученные данные, мы позволили себе сформулировать следующую гипотезу фолликулогенеза.

1. Ключевым моментом фолликулогенеза является овуляция, вследствие этого цикл логично расценивать не как менструальный, а как интеровуляторный, т.к. кровяные выделения (менструация) являются лишь следствием уже произошедшего падения уровней половых стероидов.
2. Ранняя фолликулярная фаза – период от момента падения уровней гормонов (за 2 дня до кровяных выделений) и в течение первых 2-3-дней кровяных выделений, является благоприятным периодом для стимуляции яичников.
3. Начиная с 8-9-ого дня от момента кровяных выделений до констатации овуляции – период формирования и роста доминантного фолликула, является неблагоприятным для получения достаточного количества зрелых ооцитов, вследствие возрастающих концентраций эстрадиола и низких уровней ФСГ.
4. Период формирования желтого тела после овуляции является благоприятным для стимуляции яичников, когда мы можем получить достаточное количество

зрелых ооцитов и использовать протективное действие прогестерона, секретируемого желтым телом, для предотвращения паразитарных пиков ЛГ.

Вместе с тем, представленные позиции разработаны в основном, для пациенток молодого возраста, имеющих хорошие показатели овариального резерва, которые составили основную группу исследования. В случаях низких показателей овариального резерва, коротких циклов и ранней овуляции вопросы благоприятных точек для проведения стимуляции должны решаться индивидуально.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенная работа показала заинтересованность молодых пациенток, заболевших раком, в сохранении репродуктивного материала для отсроченного деторождения, медицинскую целесообразность этого направления с учетом онкологических характеристик, благоприятного прогноза выживаемости и излечения, современных репродуктивных технологий. Определена структура больных, нуждающихся в этом виде лечения. Продемонстрирована необходимость предварительной криоконсервации ооцитов/эмбрионов в программах ЭКО у онкологических больных. Разработаны протоколы стимуляции, не зависящие от дня менструального цикла, оценена их эффективность. Исследование параметров фолликуло-стероидогенеза в течение индуцированного цикла при разных временных точках начала стимуляции позволило уточнить патогенетические аспекты фолликулогенеза, что может служить теоретическим обоснованием клинических методик проведения стимуляции яичников в разные дни менструального цикла.

ВЫВОДЫ

1. Анализ онкологических, клинико-anamнестических, лабораторных данных обследования пациенток с начальными формами рака подтвердил социальную и медицинскую целесообразность проведения программ ВРТ с целью забора и предварительной криоконсервации репродуктивного материала: средний возраст женщин составил $34,2 \pm 5,1$ лет, 71,4% не имели детей, у 85 % регистрировались высокие и нормальные показатели овариального резерва, пациентки имели хороший прогноз выживаемости и излечения, а также высокий риск потери или резкого снижения овариального резерва, все женщины желали сохранить репродуктивный материал для отсроченного деторождения.
2. В структуре обращения по поводу предварительного забора и криоконсервации репродуктивного материала преобладает рак молочной железы, а именно его люминальный В HER2-негативный подтип. Анализ состояния репродуктивной системы и исходов контролируемой овариальной стимуляции показал отсутствие зависимости результатов стимуляции яичников от наличия онкологического заболевания и его нозологической формы.
3. Проведение ургентного ЭКО, предполагающего стимуляцию яичников с любого дня менструального цикла, показало сопоставимую эффективность по основным показателям индуцированного цикла; а также по количеству полученных ооцитов (520 (72,8%) и 557 (72,6%), $p = 0,521$ соответственно), что позволяет считать разработанные методики эффективными для сохранения репродуктивного материала онкологических больных.
4. Показатели половых стероидов достоверно различались при начале стимуляции в фолликулярную и лютеиновую фазы цикла (E2 – 186 (155-284) пмоль/л и 332 (222 – 570) пмоль/л $p < 0,001$ соответственно, прогестерон 1,2 (0,6-1,6) нмоль/л и 14,0 (2,7-36,3) нмоль/л $p < 0,001$ соответственно), однако с 6-7 дня лютеиновой фазы зарегистрированы процессы лютеолиза и снижения

функциональной активности желтого тела. К преовуляторному периоду уровни гормонов не различались (Е2 – 7800 (4139 – 12943) пмоль/л и 5544 (3047 – 8126) пмоль/л $p=0,05$ соответственно, прогестерон 3,1 (1,3-5,7) нмоль/л и 3,7 (2,0-6,1) нмоль/л $p=0,323$ соответственно). Выявленные особенности позволяют проводить стимуляцию в лютеиновую фазу под протективным действием экзогенного прогестерона, без дополнительного назначения анТГнРГ.

5. Использование ингибиторов ароматазы у больных раком молочной железы приводит к уменьшению количества получаемых зрелых ооцитов при снижении преовуляторного уровня эстрадиола на 20% в зависимости от числа полученных ооцитов. В этой связи целесообразно включать в протокол стимуляции ингибиторы ароматазы у женщин с высоким овариальным резервом, при прогнозируемом получении не менее 15 ооцитов. В случае сниженных показателей овариального резерва использование ингибиторов ароматазы может привести к неполучению зрелых ооцитов.

6. Результаты проведенного исследования, оценивающие показатели фолликуло-стероидогенеза при проведении стимуляции яичников в различные дни менструального цикла позволили выделить периоды более успешной стимуляции – ранняя фолликулярная фаза цикла, постовуляторный период, ранняя фаза секреции.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Решение о возможности сохранения репродуктивного материала принимают совместно онкологи и гинекологи-репродуктологи, исходя из онкологических показаний – стадии процесса, прогноза выживаемости, степени риска потери репродуктивной функции; а также репродуктивных характеристик, подтверждающих нормальные или высокие показатели овариального резерва, обеспечивающие получение и сохранение зрелых ооцитов.
2. Показаниями для стимуляции яичников являются: молодой возраст пациенток с любой локализацией рака начальной стадии, за исключением рака яичников, рецидивирующих пограничных опухолей яичников, других формы рака, требующих немедленного хирургического лечения или проведения химио-/лучевой терапии.
3. Учитывая крайне ограниченный временной промежуток перед началом гонадотоксичной терапии, длительность лечения, направленного на сохранение репродуктивного материала не должна составлять более 14 дней. Алгоритм ведения пациенток представлена ниже на рис. № 10.
4. При стимуляции яичников в лютеиновую фазу менструального цикла и наличии функционально активного желтого тела, не требуется дополнительного назначения антагониста ГнРГ, ввиду протективного действия высокого уровня эндогенного прогестерона
5. Назначение ингибиторов ароматазы в дозе 2.5 мг в сутки целесообразно у пациенток с высоким овариальным резервом, при прогнозируемом получении не менее 15 ооцитов, учитывая его негативное влияние на количество зрелых ооцитов.



Рис. 10. Алгоритм ведения онкологических больных, нуждающихся в сохранении репродуктивной функции

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- аГнРГ – агонисты гонадотропного релизинг гормона
- АМГ – антимюллеров гормон
- антГнРГ – антагонисты гонадотропного релизинг гормона
- АФ – антральные фолликулы
- ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения
- ВПЧ – вирус папилломы человека
- ВИЧ – вирус иммунодефицита человека
- ВРТ – вспомогательные репродуктивные технологии
- ГнРГ – гонадотропин релизинг гормон
- д.м.ц. – день менструального цикла
- ДГЭА-С – дигидроэпиандростерона сульфат
- ДИ – доверительный интервал
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ДНС – день начала стимуляции
- ДТ – день введения триггера
- ДТВП – день трансвагинальной пункции яичников
- Е₂ – эстрадиол
- ИКСИ – инъекция сперматозоида в цитоплазму ооцита
- ИМТ – индекс массы тела
- ИППП – инфекции, передающиеся половым путем
- КАФ – количество антральных фолликулов
- КИО – контролируемая индукция овуляции
- КТ – компьютерная томография
- КОС – контролируемая овариальная стимуляция
- ЛГ – лютеинизирующий гормон
- ЛФ – лютеиновая фаза

ЛХ – лимфома Ходжкина

МРТ - магнитно-резонансная томография

НГЭ – наружный генитальный эндометриоз

ОКК – ооцит-кумулюсный комплекс

П – прогестерон

ПНЯ – преждевременная недостаточность яичников

ПЭТ-КТ – позитронно-эмисионная томография

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РМЖ – рак молочной железы

рФСГ – рекомбинантный фолликулостимулирующий гормон

СТГ – соматотропный гормон

СПКЯ – синдром поликистозных яичников

Т – тестостерон

Т4 – тироксин

ТВП – трансвагинальная пункция

ТТГ – тиреотропный гормон

ТФЭ – трофэктодерма

УЗИ – ультразвуковое исследование

ФСГ – фолликулостимулирующий гормон

ФФ – фолликулярная фаза

ХГЧ – хорионический гонадотропин человека

ХТ – химиотерапия

ЧМГ – человеческий менопаузальный гормон

ЭКО – экстракорпоральное оплодотворение

ЭР – эндоцитоплазматический ретикулум

ABVD – доксорубицин, блеомицин, винбластин, дакарбазин

ASRM – American Society for Reproductive Medicine (Американское общество репродуктивной медицины)

BAX – BCL2-associated X protein

Bcl-2 – *Apoptosis regulator Bcl-2*

c-abl – Abelson tyrosine kinase

COPP – циклофосфамид, винкристин, прокарбазин, преднизолон

ER – estrogen receptor

ESHRE – European Society of Human Reproduction and Embryology (Европейское общество по вопросам репродукции человека и эмбриологии)

ESMO – Европейское Общество Клинических Онкологов

FIGO – The International Federation of Gynecology and Obstetrics

FSH – Follicle-stimulating hormone (фолликулостимулирующий гормон)

G – grade

GV – germinal vesicle (герминальный везикул)

HER-2/neu – human epidermal growth factor receptor 2

ICSI – IntraCytoplasmic Sperm Injection (инъекция сперматозоида в цитоплазму ооцита)

IVM – in vitro maturation

LH – luteinizing hormone

MII – metaphase II (метафаза второго деления мейоза)

OC – oncofertility consortium

PARP1 – Поли(АДФ-рибоза)-полимераза 1

PI3K/PTEN/Akt – внутриклеточный сигнальный путь, центральными компонентами которого являются ферменты фосфоинозитид-3-киназа (PI3K), киназа АКТ и фосфатаза с двойной субстратной специфичностью PTEN

PN – пронуклеус

pATM – мутантный при атаксии-телеангиэктазии белок – серин/треониновая протеинкиназа, которая рекрутируется и активируется двунитевыми разрывами ДНК

RAD51 – белок, являющийся гомологом бактериального белка RecA, основного белка системы репарации двухцепочечных разрывов ДНК

RUSSCO – общество онкологов-химиотерапевтов (Россия)

SIP – signaling inositol phosphatase

TNM - tumor, nodus, metastasis

VEGF – vascular endothelial growth factor (фактор роста эндотелия сосудов)

ZP – zona pellucida (зона пеллюцида)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бохман, Я.В. Гормональное лечение больных атипической гиперплазией эндометрия. Гормонотерапия рака эндометрия. Гормональное лечение больных / Я.В.Бохман, Л.В.Арсенова, А.А.Никонов. - СПб.: Гиппократ.- 1992. - С. 50-57.
2. Возможности сохранения генетического материала у больных раком молочной железы / Т.А.Назаренко, Н.Ю.Шарипова, А.А.Пароконная [и др.] // Вестник РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН. - 2011. - Т.22, № 1. - С. 60-65.
3. Волочаева, М.В. Влияние противоопухолевого лечения на репродуктивную систему женщин: методы защиты и сохранения функции яичников / М.В.Волочаева, Р.Г.Шмаков, Е.А.Демина // Клиническая онкогематология. -2014. - Т.7, № 2. - С. 114- 121.
4. Восстановление репродуктивной функции методами криоконсервации и аутотрансплантации ткани яичников как важное составляющее психического здоровья онкологических пациенток. Рак и репродукция / О.В.Быстрова, А.С.Калугина, Н.С.Бакунина [и др.]; Под ред. А.А.Пароконной. - М.: Общество онкологов - химиотерапевтов, 2011. - 208 С.
5. Каприн, А.Д. Злокачественные новообразования в России в 2018 году (заболеваемость и смертность) / А.Д.Каприн, В.В.Старинский, Г.В.Петровой. - М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2019. - 250 С.
6. Каприн, А.Д. Состояние онкологической помощи населению России в 2019 году / А.Д.Каприн, В.В.Старинский, А.О.Шахзадова - М.: МНИОИ им. П.А. Герцена - филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2020. - 239 С.
7. Пронин, С.М. Сохранение фертильности при лечении начального рака эндометрия. Рак и репродукция / С.М.Пронин, О.В.Новикова; Под ред. А.А.Пароконная А.А. - М.: Галеон, 2012. - 130 С.

8. Случай восстановления репродуктивной функции с использованием метода криоконсервации и аутотрансплантации ткани яичника у пациентки с диагнозом лимфомы Ходжкина / О.В.Быстрова, Е.Н.Лапина, А.С.Лисянская [и др.] // Вопросы онкологии. - 2016. - Т. 62, №1. - С. 150.
9. Современные возможности органосохраняющего лечения больных раком шейки матки / К.Ю.Морхов, З.Т.Абдурагимова, В.М.Нечушкина [и др.] // Онкогинекология. - 2017. - N1. - С. 45-54.
10. Способы сохранения биологического материала для отсроченной реализации репродуктивной функции у пациенток, имеющих и перенесших онкологические заболевания: информационно-методические письмо.- 2019.- 23 С.
11. Сухих, Г.Т. Репродуктивное здоровье женщин с онкогематологическими заболеваниями: монография / Под ред. Г.Т.Сухих, М.И.Давыдов, В.Г.Савченко. - М.: Боргес, 2012. - 308 С.
12. Шарипова Н.Ю. Возможности сохранения репродуктивной функции у женщин, больных раком молочной железы: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. - М., 2013. - 28 С.
13. Шмаков Р.Г. Репродуктивное здоровье женщин с онкогематологическими заболеваниями: Дис. ... докт. мед. наук. - М., 2008. - 273 С.
14. Эффективность дозревания ооцитов, полученных в ходе овариэктомии, у онкологических пациенток / Е.В.Ковальская, А.О.Кириллова, Е.С.Буняева [и др.] // Акушерство и гинекология. - 2019. - N 9. - С. 87-91.
15. A specific controlled ovarian stimulation (COS) protocol for fertility preservation in women with breast cancer undergoing neoadjuvant chemotherapy / F.Cavagna, A.Pontes, M.Cavagna [et al.] // Contemporary Oncology. - 2017. - N 21. - P. 290-294.
16. ACOG Committee Opinion No. 747: Gynecologic Issues in Children and Adolescent Cancer Patients and Survivors // Obstetrics & Gynecology. - 2018.- Vol.132,N2. – P. e 67-e77.

17. Activation of dormant ovarian follicles to generate mature eggs / J.Li, K.Kawamura, Y.Cheng [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. - 2010. - N 107. - P. 10280-10284.
18. Adhikari, D. Molecular mechanisms underlying the activation of mammalian primordial follicles / D.Adhikari, K.Liu // Endocrine Reviews. - 2009. - N 30. - P. 438-464.
19. Adjuvant gonadotropin-releasing hormone analogues for the prevention of chemotherapy-induced premature ovarian failure in premenopausal women / H.Chen, L.Xiao, J.Li. [et al.] // Cochrane Database of Systematic Reviews. - 2019. - N 3.
20. Adjuvant ovarian suppression in premenopausal breast cancer / P.A.Francis, M.M.Regan, G.F.Fleming, I.Láng [et al.] // The New England Journal of Medicine. - 2015. - Vol. 372, №5. - P. 436-446.
21. Almog, B. Effects of cancer on ovarian response in controlled ovarian stimulation for fertility preservation / B.Almog, F.Azem, D.Gordon // Fertility and Sterility. - 2012. - N 98. - P. 957-960.
22. AMH prevents primordial ovarian follicle loss and fertility alteration in cyclophosphamide-treated mice / C.Sonigo, I.Beau, M.Grynberg [et al.] // FASEB J. - 2018. - N 33. - P. 1278.
23. Analysis of chemotherapy-induced amenorrhea rates by three different anthracycline and taxane containing regimens for early breast cancer / H.S.Han, J.Ro, K.S.Lee [et al.] // Breast Cancer Res Treat. - 2009. - N 115. - P. 335 -342.
24. Anazodo, A.C. A Study Protocol for the Australasian Oncofertility Registry: Monitoring Referral Patterns and the Uptake, Quality, and Complications of Fertility Preservation Strategies in Australia and New Zealand / A.C.Anazodo // Journal of Adolescent and Young Adult Oncology. - 2016. - Vol. 5, № 3. - P. 215-225.
25. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975-2014, featuring survival / Jemal A., Ward E.M., Johnson C.J., [et al.] // Journal of the National Cancer Institute. - 2017. - Vol. 109, №9. - P.1-22

26. Anti-müllerian hormone and ovarian reserve in systemic lupus erythematosus / N.F.E.Martins, M.I.Seixas, J.P.Pereira [et al.] // *Clinical Rheumatology*. - 2017. - Vol. 36, №12. - P. 2853-2854.
27. Anti-Mullerian hormone follow-up in young women treated by chemotherapy for lymphoma: preliminary results / C.Decanter, F.Morschhauser, P.Pigny [et al.] // *Reproduction Biomed Online*. - 2010. - N 20. - P. 280-285.
28. Antral follicle responsiveness to FSH, assessed by the follicular output rate (FORT), is altered in Hodgkin's lymphoma when compared with breast cancer candidates for fertility preservation / C.Sonigo, M.Comtet, S.Duros [et al.] // *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. - 2018. - N 35. - P. 91-97.
29. Awareness and current knowledge of breast cancer / M.Akram, M.Iqbal, M.Daniyal [et al.] // *Biological Research*. - 2017. - N 50. - P. 33-33.
30. Awareness of Female Cancer Patients About the Risk of Impaired Fertility / A. Ameri, K.Novin, A.Sourati [et al.] // *Journal of Adolescent and Young Adult Oncology*. - 2019.- Vol., N 3. - P.342-348.
31. Azim, A. Letrozole for ovulation induction and fertility preservation by embryo cryopreservation in young women with endometrial carcinoma / A. Azim, K. Oktay // *Fertility and Sterility*. - 2007. - N 88. - P. 657- 664.
32. Azim, A.A. Safety of fertility preservation by ovarian stimulation with letrozole and gonadotropins in patients with breast cancer: a prospective controlled study / A.A.Azim, M.Costantini-Ferrando, K.Oktay // *Journal of Clinical Oncology*. - 2008. - N 26. - P. 2630-2635.
33. Baerwald, A.R. A new model for ovarian follicular development during the human menstrual cycle / A.R. Baerwald, G. Adams // *Fertility and Sterility*. - 2003. - N 80. - P. 116-122.
34. Baerwald, A.R. Characterization of ovarian follicular wave dynamics in women / A.R.Baerwald, G.P.Adams, R.A.Pierson // *Biology of Reproduction*. - 2003. - N 69. - P. 1023-1031.

35. Baerwald, A.R. Ovarian antral folliculogenesis during the human menstrual cycle: a review / A.R.Baerwald, G.P.Adams, R.A.Pierson // *Human Reproduction*. - 2012. - N 18. - P. 73-91.
36. Baird, D. T. Factors regulating the growth of the preovulatory follicle in the sheep and human / D.T.Baird // *Reproduction*. - 1983. - Vol. 69, №1. - P. 343-352.
37. Bedoschi, G. Chemotherapy-induced damage to ovary: Mechanisms and clinical impact / G.Bedoschi, P.A.Navarro, K.Oktay // *Future Oncology*. - 2016. - N 12. - P. 2333-2344.
38. Birth outcomes among adolescent and young adult cancer survivors / C.Anderson, S.M.Engel, J.E.Mersereau [et al.] // *JAMA Oncology*. - 2017. N 3. - P. 1078-1084.
39. Block, E. Quantitative morphological investigations of the follicular system in women: variations in the different phases of the sexual cycle / E.Block // *Acta Endocrinology*. - 1951. - N 8. - P. 33-54.
40. BRCA1 germline mutations may be associated with reduced ovarian reserve./ E.T.Wang, M.D.Pisarska, C.Bresee [et al.] // *Fertility and Sterility*. - 2014. - N 102. - P. 1723- 1728.
41. BRCA1 mutation carriers have a lower number of mature oocytes after ovarian stimulation for IVF/PGD / I.A.P.Derks-Smeets, T.C.van Tilborg, A.van Montfoort [et al.] // *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. - 2017. - N 34. - P. 1475-1482.
42. BRCA mutation carriers show normal ovarian response in in vitro fertilization cycles / M.Shapira, H.Raanani, B.Feldman [et al.] // *Fertility and Sterility*. - 2015. - N 104. - P. 1162-1167.
43. Cakmak H, Rosen MP. Ovarian stimulation in cancer patients / H.Cakmak, M.P.Rosen // *Fertility and Sterility*. – 2013.- Vol.99, N 6. - P.1476-1474.
44. Cancer treatment and gonadal function: experimental and established strategies for fertility preservation in children and young adults / R.A. Anderson, R.T. Mitchell, T.W. Kelsey [et al.] // *The Lancet Diabetes & Endocrinology*.- 2015. - N 3. - P. 556-567.

45. Chang, M. Dual roles of estrogen metabolism in mammary carcinogenesis / M.Chang // *BMB Reports*. - 2011. - N 44. - P. 423-434.
46. Cisplatin Induces Overactivation of the Dormant Primordial Follicle through PTEN/AKT/FOXO3 a Pathway which Leads to Loss of Ovarian Reserve in Mice / E.M.Chang, E.Lim, S.Yoon [et al.] // *PLOS ONE*. - 2015. - Vol. 10, №12. - e0144245
47. Comparison between follicular stimulation and luteal stimulation protocols with clomiphene and HMG in women with poor ovarian response / Y.Li, W.Yang, X.Chen [et al.] // *Gynecological Endocrinology*. – 2016. – N 32. – P. 74–77.
48. Comparison of clinical outcomes among dual ovarian stimulation, mild stimulation and luteal phase stimulation protocols in women with poor ovarian response / B.Jin, Z.Niu, B.Xu [ET AL.] // *Gynecological Endocrinology*. - 2018. - Vol. 34, №8. - P. 694-697.
49. Comparison of different ovarian hyperstimulation protocols efficacy in poor ovarian responders according to the Bologna criteria / L.Hu, Z.Bu, Y.Guo [et al.] // *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*. - 2014. - Vol. 7, №4. - P. 1128-1134.
50. Comparison of ovarian stimulation response in patients with breast cancer undergoing ovarian stimulation with letrozole and gonadotropins to patients undergoing ovarian stimulation with gonadotropins alone for elective cryopreservation of oocytes / N.Pereira, K.Hancock, C.N.Cordeiro[et al.] // *Gynecological Endocrinology*. - 2016. - N 32. - P. 823-826.
51. Comparative study of the dynamics of follicular waves in mares and women / O.J.Ginther, E.L.Gastal, M.O.Gastal [et al.] // *Biology of Reproduction*. - 2004. - Vol, 71 №4. - P. 1195-1201.
52. Correlation of ultrasonic and endocrinologic assessment of human follicular development / B.J.Hackeloer, R.Fleming, H.P.Robinson [et al.] // *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. - 1979. - N 135. - P. 122-128.

53. Cortical fibrosis and blood-vessels damage in human ovaries exposed to chemotherapy. Potential mechanisms of ovarian injury / D.Meiorow, J.Dor, B.Kaufman [et al.] // Human Reproduction. - 2007. - N 22. - P. 1626-1633.
54. Cryopreservation of in vitro matured oocytes in addition to ovarian tissue freezing for fertility preservation in paediatric female cancer patients before and after cancer therapy / R.Abir, I.Ben-Aharon, R. Garor [et al.] // Human Reproduction. - 2016. - N 31. - P. 750-762.
55. Cyclophosphamide therapy in systemic lupus erythematosus and polymyositis / J.F.Fries, G.C.Sharp, H.O.McDevitt [et al.] // Arthritis Rheumatology. - 1973. - N16. - P. 154-162.
56. Cyclophosphamide triggers follicle activation and “burnout”; AS101 prevents follicle loss and preserves fertility / L.Kalich-Philosoph, H.Roness, A.Carmely [et al.] // Science Translational Medicine. - 2013. - Vol. 5, №185. - P. 62.
57. Cyclophosphamide-induced ovarian failure and its therapeutic significance in patients with breast cancer / H.Koyama, T.Wada, Y.Nishizawa[et al.] // Cancer. - 1977. - N 39. - P. 1403-1409.
58. Davis, A.L. Chemotherapy-induced amenorrhea from adjuvant breast cancer treatment: the effect of the addition of taxanes / A.L.Davis, M.Klitus, D.M.Mintzer // Clin Breast Cancer. - 2005. - N 6. - P. 421-424.
59. De Vos, M. / M.De Vos, J.Smitz, T.K.Woodruff // The Lancet. - 2014. - Vol. 384, № 9950. - P. 1302-1310.
60. Donnez, J. Fertility Preservation in Women / J.Donnez, M.M.Dolmans // The New England Journal of Medicine. - 2017. - Vol. 377, №17. - P. 1657-1665.
61. Douglas. Route of prostaglandin F₂alpha injection and luteolysis in mares (38519) / R.H.Douglas, O.J.Ginther // Proc Soc Exp Biol Med. - 1975. - Vol. 148, №1. - P. 263-269.

62. Early port-site metastasis during neoadjuvant chemotherapy in advanced stage ovarian cancer: report of two cases / B.Ozmen, Y.E.Sükür, C.S.Atabekoglu [et al.] // Journal of Gynecologic Oncology. - 2011. - Vol. 22, №1. - P. 57-60.
63. Edwards, R.G. Maturation in vitro of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes / R.G.Edwards // Nature. - 1965. - N 208. - P. 349-351.
64. Effect of gonadotropin-releasing hormone agonist against chemotherapy-induced ovarian dysfunction: A meta-analysis / F.Zheng, B.Zhu, Q.Feng [et al.] // Oncology Letters. - 2019. - Vol. 17, №6. - P. 5319-5326.
65. Efficacy of random-start controlled ovarian stimulation in cancer patients / J.H.Kim, S.K.Kim, H.J.Lee[et al.] // Journal of Korean Medical Science. - 2015. - Vol. 30, №3. - P. 290-295.
66. Effective method for emergency fertility preservation: random-start controlled ovarian stimulation / H.Cakmak, A.Katz, M.I.Cedars [et al.] // Fertility and Sterility. - 2013. - N 100. - P. 1673-1680.
67. Efficacy and safety of controlled ovarian stimulation using GnRH antagonist protocols for emergency fertility preservation in young women with breast cancer - a prospective nationwide Swedish multicenter study/ A.Marklund, S.Eloranta, I.Wikander [et al.] // Human Reproduction. - 2020. - Vol. 35, №4. - P. 929-938.
68. Epigenetics in breast cancer: what's new? / Y.Huang, S.Nayak, R.Jankowitz [et al.] // Breast Cancer Research. - 2011. - Vol. 13, №6. - P. 225.
69. ESHRE Guideline Group on Female Fertility Preservation, ESHRE guideline: female fertility preservation / R.A.Anderson, F.Amant, D.Braat [et al.] // Human Reproduction Open. – 2020.- N 14.- P.1-17.
70. ESHRE guideline: ovarian stimulation for IVF/ICSI / E.Bosch, S.Broer, G.Griesinger [et al.] // Human Reproduction Open. - 2020. - N 2 .- P.1-13.
71. ESHRE consensus on the definition of 'poor response to ovarian stimulation for in vitro fertilization: The Bologna criteria / A.P.Ferraretti, A.LaMarca, B.C.J.M.Fauser [et al.] // Human Reproduction. - 2011. - Vol. 26, №7. - P.1616-1624.

72. Female patients with lymphoma demonstrate diminished ovarian reserve even before initiation of chemotherapy when compared with healthy controls and patients with other malignancies / J.Lekovich, A.L.S.Lobel, J.D.Stewart [et al.] // Journal of Assisted Reproduction and Genetics. - 2016. - N 33. - P. 657-662.
73. Fertility preservation for medical reasons in girls and women: British fertility society policy and practice guideline / E.Yasmin, N.Balachandren, M.C.Davies [et al.] Andersonon behalf of the British Fertility Society // Human Fertility. - 2018. - Vol.21, N 1. - P. 3-26.
74. Fertility preservation in breast cancer patients: a prospective controlled comparison of ovarian stimulation with tamoxifen and letrozole for embryo cryopreservation / K.Oktay, E.Buyuk, Z.Akar [et al.] // Fertility and Sterility. - 2004. - N 82. - P. 1.
75. Fertility preservation in patients with cancer: ASCO clinical practice guideline update / K.Oktay, B.E.Harvey, A.H.Partridge [et al.] // Journal of Clinical Oncology. - 2018. - Vol. 36, №19. - P. 1994-2001.
76. Fertility preservation for patients with cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update / A.W.Loren, P.B.Mangu, L.N.Beck [et al.] // Journal of Clinical Oncology. - 2013. - N 31. - P. 2500-2510.
77. Fertility preservation options in breast cancer patients / M.Kasum, M.vonWolff, D.Franulić, E.Čehić, T.Klepac-Pulanić[et al.] // Gynecological Endocrinology. – 2015. - N. 31. - P. 846-851.
78. FertiPROTEKT study group. Timing of ovarian stimulation in patients prior to gonadotoxic therapy: an analysis of 684 stimulations / M.von Wolff, E.Capp, J.Jauckus [et al.] // European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology. - 2016. - N 199. - P. 146-149.
79. First reported clinical pregnancy following heterotopic grafting of cryopreserved ovarian tissue in a woman after a bilateral oophorectomy / C.J.Stern, D.Gook, L.G.Hale [et al.] // Human Reproduction. - 2013. - N 28. - P. 2996-2999.

80. Follicle loss and apoptosis in cyclophosphamide-treated mice: what's the matter? / X.Y.Chen, H.X.Xia, H.Y.Guan [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. - 2016. - N 17. - P. 836.
81. Genetic and teratogenic effects of cancer treatments on gametes and embryos / J. Arnon, D. Meirow, H. Lewis-Roness [et al.] // Human Reproduction. update 2001. - N 7. - P. 394–403. - 2018. - N 22. P. 193-198.
82. Germain D. Estrogen carcinogenesis in breast cancer / D.Germain // Endocrinology Metabolism Clinics of North America. - 2011. - N 40. - P. 473-484.
83. Gilchrist, R.B. Recent insights into oocyte-follicle cell interactions provide opportunities for the development of new approaches to in vitro maturation / R.B.Gilchrist // Reproduction, Fertility and Development. - 2011. - N 23. - P. 23-31.
84. Ginther O.J. Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle / O.J.Ginther, J.P.Kastelic, L.Knopf // Animal Reproduction Science. - 1989. - N 20. - P. 187-200.
85. Gonadal function and fertility in survivors after Hodgkin lymphoma treatment within the German Hodgkin Study Group HD13 to HD15 trials / K.Behringer, H.Mueller, H.Goergen [et al.] // Journal of Clinical Oncology. - 2013. - N 31. - P. 231 -239.
86. Gonadotropin-releasing hormone agonists for ovarian protection during cancer chemotherapy: systematic review and meta-analysis / J.C.Senra, M.C.Roque, M.C.T.Talim [et al.]. - Vol. 51, №1 - P. 77-86.
87. Gonadotropin releasing hormone agonists have an anti-apoptotic effect on cumulus cells / P.Scaruffi, S.Stigliani, B.Cardinali [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. - 2019. - Vol. 20, №23. - P. 6045.
88. Gougeon, A. Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results / A.Gougeon // Human Reproduction. - 1986. - N 1. - P. 81-87.
89. Goserelin for ovarian protection during breast-cancer adjuvant chemotherapy / H.C.Moore, J.M.Unger, K.A.Phillips [et al.] // The New England Journal of Medicine. - 2015. - Vol. 372, №10. - P. 923-932.

90. Gougeon, A. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses / A.Gougeon // *Endocrine Reviews*. - 1996. - Vol. 17. - P. 121 - 155.
91. Green, S.H. The number of oocytes in the mature rhesus monkey (*macaca mulatta*) / S.H.Green, S.Zuckerman // *Journal of Endocrinology J Endocrinol*. - 1951. - Vol. 7, №2. - P. 194-202.
92. Growth patterns of nondominant ovarian follicles during the normal menstrual cycle / T.Pache, J.Wladimiroff, F.DeJong [et al.] // *Fertility and Sterility*. - 1990. - Vol. 54, №4. - P. 638-342.
93. High yield of oocytes without an increase in circulating estradiol levels in breast cancer patients treated with follicle-stimulating hormone and aromatase inhibitor in standard gonadotropin-releasing hormone analogue protocols / A.Ben-Haroush, J.Farhi, I.Ben-Aharon [et al.] // *Israel Medical Association Journal*. - 2011. - N 13. - P. 753-756.
94. Hodgen, G. The dominant ovarian follicle / G.Hodgen // *Fertility and Sterility*. - 1982. - N 38. - P. 281-300.
95. How effective are the non-conventional ovarian stimulation protocols in ART? A systematic review and meta-analysis / D.Glujovsky, R.Pesce, M.Miguens C.E.Sueldo, [et al.] // *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. - 2020. - Vol. 37, №12. - P. 2913-2928.
96. Hysterectomy-corrected uterine corpus cancer incidence trends and differences in relative survival reveal racial disparities and rising rates of nonendometrioid cancers / M.A.Clarke, S.S.Devesa, S.V.Harvey [et al.] // *Journal of Clinical Oncology*. - 2019. - N 37. - P. 1895-1908.
97. Incidence, time course, and determinants of menstrual bleeding after breast cancer treatment: a prospective study / J.A.Petrek, M.J.Naughton, L.D.Cas [et al.] // *Journal of Clinical Oncology*. - 2006. - N 24. - P. 1045-1051.
98. Initiation of ovarian stimulation independent of the menstrual cycle: a case-control study / N.K.Buendgen, A.Schultze-Mosgau, T.Cordes [et al.] // *Arch Gynecology Obstetrics*. -2013. - Vol. 288, №4. - P. 901-904.

99. In vitro maturation for patients with repeated in vitro fertilization failure due to “oocyte maturation abnormalities” / A.Hourvitz, E.Maman, M.Brengauz [et al.] // *Fertility and Sterility*. - 2010. - N 94. - P. 496-501.
100. Is letrozole needed for controlled ovarian stimulation in patients with estrogen receptor-positive breast cancer? / A.Revelli, E.Porcu, P.E.Levi Setti [et al.] // *Gynecological Endocrinology*. - 2013. - N 11. - P. 993-996.
101. Jiang, X. Epidemiology of gynecologic cancers in China / X.Jiang, H.Tang, T.Chen // *Journal of Gynecologic Oncology*. – 2018. - Vol. 29, №1.- e.7
102. Klock, S.C. Fertility preservation for female cancer patients: early clinical experience / S.C.Klock, J.X.Zhang, R.R.Kazer // *Fertility and Sterility*. - 2010. - N 94. - P. 149-155.
103. Letrozole reduces estrogen and gonadotropin exposure in women with breast cancer undergoing ovarian stimulation before chemotherapy / K.Oktay, A.Hourvitz, G.Sahin [et al.] // *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. - 2006. - N 9. - P. 3885-3890.
104. Lindegaard, J.C. The European Society of Gynaecological Oncology/European Society for Radiotherapy and Oncology/European Society of Pathology Guidelines for the Management of Patients With Cervical Cancer / J.C.Lindegaard [et al.] // *International Journal of Gynecological Cancer*. - 2018. - N 28. - P. 641-655.
105. Lortet-Tieulent, J. International patterns and trends in endometrial cancer incidence, 1978-2013 / J.Lortet-Tieulent, J.Ferlay, F.Bray , A.Jemal // *Journal of the National Cancer Institute*. - 2018. - N 110. - P. 354 -361.
106. Luteal phase ovarian stimulation for poor ovarian responders / W.Zhang, M.Wang, S.Wang[et al.] // *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. - 2018. - Vol. 22, №3. - P. 193-198.
107. Luteal-phase ovarian stimulation is a feasible method for poor ovarian responders undergoing in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection-embryo transfer treatment compared to a GnRH antagonist protocol: A retrospective study / L.H.Wei,

- W.H.Ma, N.Tang[et al.] // Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology. - 2016. - Vol. 55, №1. - P. 50-54.
108. Luteal Phase Ovarian Stimulation May Improve Oocyte Retrieval and Oocyte Quality in Poor Ovarian Responders Undergoing In Vitro Fertilization: Preliminary Results from a Single-Center Prospective Pilot Study / L.T.Lin, S.G.Vitale, S.N.Chen [et al.] // Advances in Therapy. - 2018. - Vol. 35, №6. - P. 847-856.
109. Luteal phase stimulation, the future of fertility preservation? Retrospective cohort study of luteal phase versus follicular phase stimulation / F.Jochum, N.Sananès, M.Teletin[et al.] // Journal of Gynecology Obstetrics and Human Reproduction. - 2019. - Vol. 48, №2. - P. 91-94.
110. Luteal phase stimulation versus follicular phase stimulation in poor ovarian responders: results of a randomized controlled trial / J.Llácer, B.Moliner, L.Luque [et al.] // Reproductive Biology and Endocrinology. - 2020. - Vol. 18, № 9. - P.1-8
111. Luteal-phase ovarian stimulation vs conventional ovarian stimulation in patients with normal ovarian reserve treated for IVF: a large retrospective cohort study / N.Wang, Y.Wang, Q.Chen [et al.] // Clinical Endocrinology. - 2016. - Vol.84. - P. 720-728.
112. Mahajan, N. Fertility preservation in female cancer patients: An overview / N.Mahajan // Journal of Human Reproductive Sciences. - 2015. - Vol. 8, №1. - P. 3-13.
113. Mailhes, J.B. Important biological variables that can influence the degree of chemical-induced aneuploidy in mammalian oocyte and zygotes / J.B.Mailhes // Mutation Research. - 1995. - N 339. - P. 155 -176.
114. Malignancy may adversely influence the quality and behaviour of oocytes / L.Pal, L.Leykin, J.L.Schifren [et al.] // Human Reproduction. - 1998. - N 7. - P. 1837- 1840.
115. Mandating Coverage for Fertility Preservation – A Step in the Right Direction / E.R.Cardozo, W.J.Huber, A.R.Stuckey [et al.] // The New England Journal of Medicine. - 2017. - Vol. 377, №17. - P. 1607-1609.

116. Matthews, M.L. Cancer, Fertility Preservation, and Future Pregnancy: A Comprehensive Review / M.L.Matthews // *Obstetrics and Gynecology International*. - 2012. - P. 1-11.
117. Medical hope, legal pitfalls: potential legal issues in the emerging field of oncofertility / G.Dolin, D.E.Roberts, L.M.Rodriguez [et al.] // *Cancer Treatment and Research*. - 2010. - N 156. - P. 111-134.
118. Meirow, D. Ovarian injury and modern options to preserve fertility in female cancer patients treated with high dose radio-chemotherapy for hemato-oncological neoplasias and other cancers / D.Meirow // *Leukemia & Lymphoma*. - 1999. - Vol. 33, №1-2. - P. 65-76.
119. Meirow, D. Reproduction post-chemotherapy in young cancer patients / D.Meirow // *Molecular and Cellular Endocrinology*. - 2000. - N 169. - P. 123 -131.
120. Menstrual and hormone patterns in women treated with high-dose cisplatin and bleomycin / F.Maneschi, P.Benedetti-Panici, G.Scambia [et al.] // *Gynecologic Oncology*. - 1994. - N 54. - P. 345-348.
121. Miller, J.J. 3rd. Multiple late complications of therapy with cyclophosphamide, including ovarian destruction / J.J.Miller 3rd, G.F.Williams, J.C.Leissring // *The American Journal of Medicine*. - 1971. - N 50. - P. 530-535.
122. Moffat, R. Neue Strategien zur Fertilitätserhaltung bei jungen Frauen mit malignen Erkrankungen [New strategies for fertility preservation in young women with cancer] / R.Moffat, C.De Geyter, M.von Wolff // *Therapeutische Umschau*. - 2009. - Vol. 66, №12. - P. 831-838.
123. Mortality trends for cervical squamous and adenocarcinoma in the United States. Relation to incidence and survival / M.E.Sherman, S.S.Wang, J.Carreon[et al.] // *Cancer*. - 2005. - N 103. - P. 1258-1264.
124. Multimodal treatment of locoregionally advanced breast cancer / G.N.Hortobagyi, G.R.Blumenschein, W.Spanos [et al.] // *Cancer*. - 1983. - Vol. 51, №5. - P. 763-768.

125. Nayak, S.R. Random-start gonadotropin-releasing hormone (GnRH) antagonist-treated cycles with GnRH agonist trigger for fertility preservation / S.R.Nayak, A.N.Wakim // *Fertility and Sterility*. - 2011. - Vol. 96, №1. - P. 51-54.
126. O'Herlihy C. Monitoring ovarian follicular development with real-time ultrasound / C.O'Herlihy // *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*. - 1980. - N 87. - P. 613-618.
127. Oktay, K. Further evidence on the safety and success of ovarian stimulation with letrozole and tamoxifen in breast cancer patients undergoing in vitro fertilization to cryopreserve their embryos for fertility preservation / K. Oktay // *Journal of Clinical Oncology*. - 2005. - N 23. - P. 3858-3859.
128. Oocyte maturation and quality: Role of cyclic nucleotides / R.B.Gilchrist, A.M.Luciano, D.Richani [et al.] // *Reproduction*. - 2016. - N 152. - P. 143-157.
129. Orvieto, R. Triggering final follicular maturation--hCG, GnRH-agonist or both, when and to whom? / R.Orvieto // *Journal of Ovarian Research*. - 2015. - N 8. - P. 60-60.
130. Outpatient hysteroscopy / R.Campo, F.Santangelo, S.Gordts [et al.] // *Facts Views Vis Obgyn*. - 2018. - Vol.10,N 3. - P.115-122.
131. Ovarian cancer statistics, 2018 / L.A.Torre, B.Trabert, C.E.DeSantis [et al.] // *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. - 2018. - Vol. 68, №4. - P. 284-296.
132. Ovarian cortex transplantation: time to move on from experimental studies to open clinical application / J.Donnez, M.M.Dolmans, C.Diaz [et al.] // *Fertility and Sterility*. - 2015. - N 104. - P. 1097-1098.
133. Ovarian cryopreservation / K.Jeong, E.Aslan, E.Ozkaya [ET AL.] // *Minerva Medica*. - 2012. - Vol. 103, №1. - P. 37-46.
134. Ovarian follicle burnout: A universal phenomenon? / H.Roness, Z.Gavish, Y.Cohen[et al.] // *Cell Cycle*. - 2013. - N 12. - P. 3245-3246.
135. Ovarian follicular dynamics in heifers: test of two-wave hypothesis by ultrasonically monitoring individual follicles / L.Knopf, J.P.Kastelic, E.Schallenberger [et al.] // *Domestic Animal Endocrinology*. - 1989. - Vol. 6, №2. - P. 111-119.

136. Ovarian response after random-start controlled ovarian stimulation to cryopreserve oocytes in cancer patients / A.P.C.Campos, G.P.Geber, R.Hurtado [et al.] // *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. - 2018. - N 22. - P. 352-354.
137. Ovarian response and follow-up outcomes in women diagnosed with cancer having fertility preservation: comparison of random start and early follicular phase stimulation—cohort study / C.Muteshi, T.Child, E.Ohuma[et al.] // *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. - 2018. - N 230. - P. 10-14.
138. Ovarian response to controlled ovarian hyperstimulation in women with cancer is as expected according to an age-specific nomogram / M.Devesa, F.Martínez, B.Coroleu [et al.] // *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. - 2014. - Vol. 31, №5. - P. 583-588.
139. Ovarian response to stimulation for fertility preservation in women with malignant disease: a systematic review and meta-analysis / S.Friedler, O.Koc, Y.Gidoni [et al.] // *Fertility and Sterility*. - 2012. - N 97. - P. 125-133.
140. Ovarian response to controlled ovarian hyperstimulation in cancer patients is diminished even before oncological treatment / J.Domingo, V.Guillén, Y.Aylo'n [et al.] // *Fertility and Sterility*. - 2012. - N 97. - P. 930-934.
141. Ovarian stimulation and emergency in vitro fertilization for fertility preservation in cancer patients / N.Michaán, G.Ben-David, D.Ben-Yosef [et al.] // *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. - 2010. - N 149. - P. 175-177.
142. Ovarian stimulation and in-vitro fertilization outcomes of cancer patients undergoing fertility preservation compared to age matched controls: a 17-year experience / E.R.Cardozo, A.P.Thomson, A.E.Karmonn [et al.] // *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. - 2015. - Vol. 32, № 4. - P. 587 - 596.
143. Ovarian stimulation during the luteal phase for fertility preservation of cancer patients: case reports and review of the literature / G.M.Bedoschi, F.O.de Albuquerque, R.A.Ferriani [et al.] // *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. - 2010. - Vol.27. - P.491-494.

144. Ovarian stimulation for fertility preservation in patients with cancer / R.B.Quintero, A.Helmer, J.Q.Huang[et al.] // *Fertility and Sterility*. - 2010. - N 93. - P. 865-868.
145. Ovarian transplantation in a series of monozygotic twins discordant for ovarian failure / S.J.Silber, R.G.Gosden, J.Donnez [et al.] // *The New England Journal of Medicine*. - 2007. - N 356. - P. 1382-1384.
146. Ovarian stimulation in the luteal phase: systematic review and meta-analysis / C.E.Boots, M.Meister, A.R.Cooper [et al.] // *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. - 2016.- Vol.33. - P.971-980.
147. Ovarian stimulation to cryopreserve fertilized oocytes in cancer patients can be started in the luteal phase / M.vonWolff, C.J.Thaler, T.Frambach [et al.] // *Fertility and Sterility*. - 2009. - N 92. - P. 1360-1365.
148. Ovarian suppression with triptorelin during adjuvant breast cancer chemotherapy and long-term ovarian function, pregnancies, and disease-free survival: a randomized clinical trial / M.Lambertini, L.Boni, A.Michelotti [et al.] // *JAMA Oncology*. - 2015. - Vol. 314, №24. - P. 2632-2640.
149. Ozkaya, E. Luteal phase GnRHa trigger in random start fertility preservation cycles / E.Ozkaya, G.San Roman, K.Oktay // *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. - 2012. - N 29. - P. 503-505.
150. Petrucelli, N. BRCA1- and BRCA2-Associated Hereditary Breast and Ovarian Cancer. 1998 Sep 4 A, editors / N.Petrucelli, M.B.Daly, T.Pal // *GeneReviews* [Internet]. - Seattle. - (WA): University of Washington. – 1993. -2020.
151. Pierson, R.A. Follicular populations during the estrous cycle in heifers I. Influence of day / R.A.Pierson, O.J.Ginther // *Animal Reproduction Science*. - 1987. - N 14. - P. 165-176.
152. Practical recommendations for fertility preservation in women by the FertiPROTEKT network. Part II: fertility preservation techniques / M.vonWolff, A.Germeyer, J.Liebenthron[et al.] // *Archives of Gynecology and Obstetrics*. - 2017. - Vol. 297, №1. - P. 257-267.

153. Pregnancy after chemotherapy in male and female survivors of childhood cancer treated between 1970 and 1999: a report from the childhood cancer survivor study cohort / E.J.Chow, K.L.Stratton, W.M.Leisenring [et al.] // *Lancet Oncology*. - 2016. - N 17. - P. 567-576.
154. Pregnancy and live birth after autotransplantation of frozen-thawed ovarian tissue in a patient with metastatic disease under- going chemotherapy and hematopoietic stem cell transplantation / J.Donnez, J.Squiflet, P.Jadoul, D.Demylle [et al.] // *Fertility and Sterility*. - 2011. - N 95. - P. 1787-e1-4.
155. Prolonged lung cancer screening reduced 10-year mortality in the MILD trial: new confirmation of lung cancer screening efficacy / U.Pastorino, M.Silva, S.Sestini [et al.] // *Annals of Oncology*. - 2019. - N 30. - P. 1162-1169.
156. Prospective assessment of follicular growth and the oocyte cohort after ovarian stimulation for fertility preservation in 90 cancer patients versus 180 matched controls / C.Decanter, G.Robin, A.Mailliez [et al.] // *Reproduction Biomed Online*. - 2018. - N 36. - P. 543- 551.
157. Random-start controlled ovarian hyperstimulation for emergency fertility preservation in letrozole cycles / M.Sönmezer, I.Türkçüoğlu, U.Coskun[et al.] // *Fertility and Sterility*. - 2011. - N 2125. - P. 9-11.
158. Rashidi, B.H. Ovarian stimulation for emergency fertility preservation in cancer patients: a case series study / B.H.Rashidi, E.S.Tehrani, F.Ghaffari // *Gynecologic Oncology Reports*. - 2014. - N 10. - P. 19-21.
159. Reddy, J. Ovarian stimulation and fertility preservation with the use of aromatase inhibitors in women with breast cancer / J.Reddy, K.Oktay // *Fertility and Sterility*. - 2012. - N 98. - P. 1363-1369.
160. Reduced pretreatment ovarian reserve in premenopausal female patients with Hodgkin lymphoma or non-Hodgkin-lymphoma—evaluation by using antimüllerian hormone and retrieved oocytes / B.Lawrenz, T.Fehm, M.vonWolff [et al.] // *Fertility and Sterility*. - 2012. - N 98. - P. 141-144.

161. Reproductive function and outcomes in female survivors of childhood, adolescent, and young adult cancer: a review / W.Dorp, R.Haupt, R.A.Anderson [et al.] // *Journal of Clinical Oncology*. - 2018. - N 36. - P. 2169-2180.
162. Response to ovarian stimulation in patients facing gonadotoxic therapy / L.N.Johnson, K.E.Dillon, M.D.Sammel [et al.] // *Reproductive BioMedicine Online*. - 2013. - Vol. 26, №4. - P. 337- 344.
163. Robertson, A.D. Embryo yield after in vitro fertilization in women undergoing embryo banking for fertility preservation before chemotherapy / A.D.Robertson, S.A.Missmer, E.S.Ginsburg // *Fertility and Sterility*. - 2011. - N 95. - P. 588-591.
164. Rodgers, R.J. Fertility preservation in breast cancer patients / R.J.Rodgers // *Minerva Gynecology*. - 2019. - Vol. 71, №3. - P. 196-206.
165. Sarais, V. Long-acting recombinant follicle-stimulating hormone in random-start ovarian stimulation protocols for fertility preservation in women with cancer / V.Sarais, A.Paffoni // *Acta Obstet Gynaecol Scand*. - 2017. - N 96. - P. 949-953.
166. Secondary amenorrhea after Hodgkin's lymphoma is influenced by age at treatment, stage of disease, chemotherapy regimen, and the use of oral contraceptives during therapy: a report from the German Hodgkin's Lymphoma / K.Behringer, K.Breuer, T.Reineke [et al.] // Study Group. *Journal of Clinical Oncology*. - 2005. - N 23. - P. 7555 -7564.
167. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2016 / N.Howlader, A.M.Noone, M.Krapcho [et al.] // National Cancer Institute. - 2019.
168. Schüring, A.N. Practical recommendations for fertility preservation in women by the FertiPROTEKT network. Part I: Indications for fertility preservation / A.N.Schüring [et al.] // *Archives of Gynecology and Obstetrics*. - 2017. - Vol. 297, №1. - P. 241-255.
169. Shirasawa, H. In vitro maturation of human immature oocytes for fertility preservation and research material / H.Shirasawa, Y.Terada // *Reproductive Medicine and Biology*. - 2017. - Vol. 16, №3. - P. 258-267.

170. Siegel, R.L. Cancer statistics [Internet] / Siegel, R.L. K.D.Miller, A.Jemal.- 2020. - Vol.70.- P. 7-30.
171. Survey of fertility preservation options available to patients with cancer around the globe / T.K.Woodruff, A.S.Rashedi, S.F.deRoo [et al.] // Journal of Global Oncology. - 2020. - N 4. - P. 1-16.
172. Survey of third-party parenting options associated with fertility preservation available to patients with cancer around the globe / A.S.Rashedi, S.F.deRoo, L.M.Ataman[et al.] // Journal of Global Oncology. - 2018. - N 4. - P. 1-7.
173. Systemic methotrexate to treat ectopic pregnancy does not affect ovarian reserve / B.Oriol, A.Barrio, A.Pacheco [et al.] // Fertility and Sterility. - 2008. - N 90. - P. 1579-1582.
174. The effects of paclitaxel, dose density, and trastuzumab on treatment-related amenorrhea in premenopausal women with breast cancer / M.E.Abusief, S.A.Missmer, E.S.Ginsburg [et al.] // Cancer, 2010. - N 116. - P. 791 -798.
175. The impact of cancer on subsequent chance of pregnancy: a population-based analysis / R.A. Anderson, D.H.Brewster, R.Wood [et al.] // Human Reproduction. - 2018. - Vol. 33, №7. - P. 1281-1290.
176. The comparision of effect of microdose GnRH-a flare-up, GnRH antagonist/aromatase inhibitor letrozole and GnRH antagonist/clomiphene citrate protocols on IVF outcomes in poor responder patients / O.P.Cenksoy, C.Ficicioglu, O.Kizilkale[et al.] // Gynecological Endocrinology. - 2014. - Vol. 30, №7. - P. 485-489.
177. The effects of letrozole on ovarian stimulation for fertility preservation in cancer-affected women / M.A.Checa Vizca'ino, A.R.Corchado, I.Sastre [et al.] // Reproduction Biomed Online. - 2012. - N 24. - P. 606-610.
178. The importance of DNA repair for maintaining oocyte quality in response to anti-cancer treatments, environmental toxins and maternal ageing / A.L.Winship, J.M.Stringer, S.H.Liew[et al.] // Human Reproduction. - 2018. - N 24. - P. 119-134.

179. The ovarian reserve of primordial follicles and the dynamic reserve of antral growing follicles: What is the link? / D.Monniaux, F.Clément, R.Dalbiès-Tran [et al.] // *Biology of Reproduction*. - 2014. - N 90. - P. 85.
180. The safety and efficacy of controlled ovarian hyperstimulation for fertility preservation in women with early breast cancer: a systematic review / R.J.Rodgers, G.D.Reid, J.Koch [et al.] // *Human Reproduction*. - 2017. - Vol. 32, №5. - P. 1033-1045.
181. 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 and Sterility*. - 1994. - N 62. - P. 353-362.
182. Woodruff, T.K. *Oncofertility: Fertility Preservation for Cancer Survivors* / T.K.Woodruff, K.A.Snyder - Springer Science+Business Media: New York, 2007. - P.263.
183. Woodruff, T.K. From the bench to bedside to babies: translational medicine made possible by funding multidisciplinary team science / T.K.Woodruff // *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. - 2013. - N 30. - P. 1249-1253.
184. Woodruff, T.K. The Oncofertility Consortium – addressing fertility in young people with cancer / T.K.Woodruff // *Nature Reviews. Clinical Oncology*. - 2010. - N 7. - P. 466-475.
185. Woodruff, Z.L. *Oncofertility: Ethical, Legal, Social, and Medical Perspectives* / Z.L.Woodruff, L.Campo-Engelstein, S.Rodriguez - Springer Science+Business Media: New York, 2010.- 522 P.