

УДК 57.085:618.111:612.622.3

СОЗРЕВАНИЕ ООЦИТОВ *IN VITRO*: БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ КЛИНИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

© 2025 г. А. О. Дробинцева^{1,*}, В. К. Фролов¹, И. О. Боголюбова^{1,2,**}, О. Е. Савельева¹, С. А. Кулева¹

¹Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург, 194100, Россия

²Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064, Россия

*E-mail: ao.drobintseva@gpmu.org,

**E-mail: ibogol@mail.ru

Поступила в редакцию 31.03.2025

После доработки 22.04.2025

Принята к публикации 23.04.2025

Процедура созревания ооцитов *in vitro* (*in vitro* maturation, IVM) включает аспирацию ооцитов, находящихся на стадии профазы I мейоза, в составе ооцит-кумулюсных комплексов из небольших антральных фолликулов и их последующее созревание до стадии метафазы II в лабораторных условиях. IVM является перспективным методом получения ооцитов на стадии метафазы II (MII-ооцитов) в тех случаях, когда проведение гормональной стимуляции яичников нежелательно или невозможно. В то же время по темпам созревания и способности к развитию ооциты, полученные в результате процедуры IVM, уступают ооцитам, полученным в стимулированных циклах, поэтому актуальной проблемой является совершенствование протоколов IVM. В обзоре рассмотрены возможности процедуры IVM в контексте ключевых этапов созревания ооцитов и достижения ими ядерной и цитоплазматической зрелости. Освещены преимущества и недостатки различных методик IVM и основные направления их дальнейшего совершенствования.

Ключевые слова: *in vitro* maturation, фолликулогенез, антральный фолликул, ооцит-кумулюсный комплекс, цитоплазматическая зрелость

Принятые сокращения: ВРТ — вспомогательные репродуктивные технологии; ЛГ — лютеинизирующий гормон; ОКК — ооцит-кумулюсный комплекс; СПКЯ — синдром поликистозных яичников; ФСГ — фолликулостимулирующий гормон; ЭКО — экстракорпоральное оплодотворение; ЭПС — эндоплазматическая сеть; CNP — натрий-уретический пептид типа C; IVG (*in vitro* growth) — рост ооцитов *in vitro*; IVM — созревание ооцитов *in vitro* (*in vitro* maturation).

DOI: 10.31857/S0041377125020015, EDN: FVHJIV

Созревание ооцитов *in vitro* (*in vitro* maturation, IVM) — вспомогательная репродуктивная технология (ВРТ), включающая аспирацию незрелых ооцитов, находящихся на стадии профазы I мейоза, в составе ооцит-кумулюсных комплексов (ОКК) из небольших антральных фолликулов и их последующее созревание до стадии метафазы II (MII) в лабораторных условиях (De Vos et al., 2016; Михайлова и др., 2021; Gong et al., 2021; Das, Son, 2023).

Первые эксперименты по созреванию *in vitro* ооцитов кролика были проведены в 1935 г. (Pincus, Enzmann, 1935). Авторы продемонстрировали, что выделение ооцита из фолликула и изоляция от фолликулярной жидкости способствует его созреванию, и сделали вывод о возможности получения подобным образом значительного ко-

личества зрелых яйцеклеток млекопитающих. В исследовании 1991 г. сообщается о рождении первых детей с использованием ооцитов донора, дозревших *in vitro* (Cha et al., 1991), тем не менее до 2021 г. данный метод считался экспериментальным (Plancha et al., 2021; Лапина и др., 2022).

В настоящее время технология IVM введена в клиническую практику, но более распространенным подходом остается получение зрелых ооцитов на стадии MII в стимулированных циклах, то есть после контролируемой гормональной стимуляции яичников (Bosch et al., 2020). Это обусловлено тем, что ооциты, полученные в результате процедуры IVM, по темпам созревания и способности к развитию уступают ооцитам, полученным в стимулированном цикле, а частота живорождения после IVM ниже, чем после стандартизированной

процедуры экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) с использованием МП-ооцитов (Das et al., 2014; Sanchez et al., 2019; Gong et al., 2021, 2022). Кроме того, в настоящее время протокол IVM не стандартизирован, вследствие этого результаты IVM могут значительно различаться между медицинскими учреждениями (Yang et al., 2021; Das, Son, 2023). Все это ограничивает широкое применение IVM в клинической практике.

Однако процедура гормональной стимуляции при ЭКО не всегда возможна. Классический вариант ЭКО не подходит для пациенток с высоким риском синдрома гиперстимуляции яичников (СГЯ) (Humaidan et al., 2016), синдромом поликистозных яичников (СПКЯ), синдромом резистентных яичников (Mu et al., 2022). Нет возможности проведения гормональной стимуляции и получения МП-ооцитов у женщин с эстроген-зависимыми формами рака, а также с онкологическими заболеваниями, при которых необходимо срочно начать гонадотоксическую терапию. В таких случаях может быть использована процедура IVM, которая предполагает извлечение ооцитов (ОКК) из антральных и ранних антральных фолликулов без гормональной стимуляции или с использованием небольшой дозы препаратов для стимуляции (Элленбоген и др., 2015; Михайлова и др., 2021; Das, Son, 2023).

Технология IVM имеет и такие преимущества перед ЭКО, как меньшая стоимость лечения, сниженный психологический дискомфорт для пациенток (Элленбоген и др., 2015). IVM может также представлять интерес для женщин, которые хотели бы стать донорами ооцитов, но не готовы к побочным эффектам, возникающим при гормональной стимуляции, и для пациенток, по разным причинам планирующих криоконсервацию ооцитов (Yang et al., 2021).

В Российской Федерации, согласно информации, представленной в отчетах Регистра ВРТ Российской ассоциации репродукции человека (Корсак и др., 2021—2024), каждый год увеличивается количество циклов ВРТ с использованием методики IVM (20 циклов в 2017 г., 87 — в 2018 г., 98 — в 2019 г., 122 — в 2020 г., 169 — в 2021 г., 226 — в 2022 г.). Фокус внимания исследователей в настоящее время сосредоточен на подборе оптимальных условий для созревания ооцитов *in vitro* и изучении факторов, влияющих на успешность IVM (Yang et al., 2021; Соколова и др., 2022; Das, Son, 2023).

Цель данного обзора — охарактеризовать особенности созревания ооцитов человека *in vivo* и специфику различных методик дозревания ооцитов *in vitro*.

ОСНОВНЫЕ ЭТАПЫ ФОЛЛИКУЛОГЕНЕЗА ЧЕЛОВЕКА *IN VIVO*

Согласно классическим представлениям, фолликулы человека начинают развитие на четвертом месяце жизни плода, к пятому месяцу количество фолликулов достигает максимума и затем начинает уменьшаться еще до рождения. К рождению девочки в каждом яичнике содержится 250—500 тыс. покоящихся примордиальных фолликулов с ооцитами, находящимися в профазе первого мейотического деления на стадии диплотены (диктиотены). На протяжении всего детства происходит сокращение числа покоящихся фолликулов. В репродуктивном периоде некоторые покоящиеся фолликулы вступают в рост и развиваются до преовуляторной и овуляторной стадии, но большая их часть подвергается атрезии (Macklon, Fauser, 1999; Gougeon, 2010; Соколова и др., 2022). Рост фолликула обеспечивается пролиферацией клеток, образованием фолликулярной жидкости и находится под контролем гормонов и факторов роста (Erickson, 2008).

Фолликулогенез делят на четыре основных этапа: инициация покоящихся фолликулов, ранний рост фолликулов, формирование доминантного фолликула в пуле растущих фолликулов (на этапе, когда фолликулы достигают размера 2 мм) и созревание доминантного фолликула до преовуляторного (Gougeon, 2010) (табл. 1).

В целом выделяют две категории растущих фолликулов: *преантральные* и *антральные*. Развитие *преантральных* фолликулов не зависит от гонадотропинов — фолликулостимулирующего (ФСГ) и лютеинизирующего (ЛГ) гормонов, развитие *антральных* фолликулов является гонадотропин-зависимым (Erickson, 2008).

В ряде источников, посвященных ВРТ (например, Sánchez, Smitz, 2012; Telfer et al., 2023), кратко приводится следующая последовательность этапов развития фолликулов:

— примордиальный фолликул — содержит небольшой ооцит, размером примерно 25 мкм, окруженный одним слоем плоских клеток гранулезы (фолликулярных клеток коркового слоя яичника);

Таблица 1. Структурно-функциональные особенности фолликулов яичника человека на разных этапах развития (по: Gougeon, 1986; Erickson, 2008)

Наименование	Размер фолликула	Структурные элементы фолликула	Функциональные особенности
Преантральные фолликулы			
Примордиальный	0.03—0.06 мм	Ооцит первого порядка на стадии диплотены профазы первого деления мейоза (диаметр 25—30 мкм); один слой плоских клеток гранулезы (фолликулярных клеток); базальная пластинка	Формируются пренатально. Базальная пластинка обеспечивает поддержание микросреды внутри фолликула; отсутствие независимого кровоснабжения фолликула ограничивает доступ эндокринных регуляторных факторов
Первичный	До 0.12 мм	Диплотенный ооцит окружен одним слоем гранулезных клеток кубической формы	Появление блестящей оболочки; начало митотических делений клеток гранулезы, цитоплазматические начало формирования щелевых контактов между ооцитом и клетками гранулезы
Вторичный — класс 1	До 0.2 мм	Ооцит окружен 2—10 слоями клеток гранулезы кубической формы; над базальной пластинкой — текальный слой, образованный клетками соединительной ткани	Экспрессия рецепторов ФСГ в гранулезных клетках; формирование теки, выделение внешнего и внутреннего слоя теки, экспрессия генов ЛГ в клетках теки; ангиогенез
Третичный (ранний третичный) — класс 2	До 0.4 мм	Крупный ооцит, окруженный блестящей оболочкой; несколько слоев клеток гранулезы; базальная пластинка; внутренний и внешний слой теки	Кавитация — появление полостей между гранулезными клетками, накопление в них жидкости
Антральные фолликулы (графовы пузырьки)			
Малый — класс 3 Малый — класс 4 Малый — класс 5	До 0.9 мм До 2 мм До 5 мм	Ооцит, окруженный блестящей оболочкой; антральная полость, заполненная фолликулярной жидкостью; клетки гранулезы четырех типов: муральные, периаантральные, клетки яйценосного бугорка, клетки лучистого венца; базальная пластинка; внутренний слой теки (соединительная ткань + кровеносные сосуды + клетки, продуцирующие андростендион), внешний слой теки (присутствуют гладкомышечные клетки)	От малого к среднему классу переходят и атретические фолликулы, до преовуляторной стадии развивается только доминантный фолликул; размер Граафова пузырька определяется объемом фолликулярной жидкости и доступностью ФСГ. Выбор доминирующего фолликула из числа фолликулов класса 5 диаметром примерно 4.7 мм происходит в конце лютеиновой фазы цикла. Интенсивная пролиферация клеток гранулезы
Средний — класс 6	До 10 мм		
Большой — класс 7	До 16 мм		
Преовуляторный — класс 8	До 20 мм		

— первичный фолликул — начинается рост ооцита, клетки гранулезы приобретают кубическую форму, формируются щелевые между отростками клеток гранулезы и ооцитом;

— вторичный (преантральный) фолликул — появление нескольких слоёв клеток гранулезы, снаружи — клетки теки;

— ранний антральный (полостной) фолликул: между клетками гранулезы возникает полость, заполненная жидкостью, — антрум;

— преовуляторный фолликул — крупный фолликул, содержащий полость с фолликулярной жидкостью, размер фолликула достигает 20 мм;

— овуляторный фолликул — фолликул разрывается, происходит выход ооцита с окружающими его гранулезными клетками (клетками кумулюса, или клетками лучистого венца) в фаллопиеву трубу.

Более детально процессы, происходящие в фолликулах, описываются следующим образом.

Инициация *примордиальных* фолликулов (рекрутинг или активация примордиальных фолликулов) приводит к тому, что клетки гранулезы начинают менять свою форму на кубическую. Это свидетельствует о приобретении клетками гранулезы митотического потенциала (Erickson, 2008; Clarke, 2017). Процесс инициации примордиальных ооцитов контролируется механизмами паракринной сигнализации между ооцитом, гранулезными клетками и окружающими их клетками стромы яичника. Примордиальный фолликул превращается в *первичный фолликул*. Ооцит начинает увеличиваться в размере, в нем активируются процессы транскрипции, начинает синтезироваться ряд белков — в частности белки, необходимые для формирования блестящей оболочки (Erickson, 2008). Через блестящую оболочку к ооциту проходят цитоплазматические выросты гранулезных клеток, что позволяет сформировать щелевые контакты между клетками гранулезы и мембраной ооцита. Через щелевые контакты клетки гранулезы снабжают ооцит аминокислотами, нуклеотидами, гликолитическими ферментами. В свою очередь ооциты выделяют факторы роста, необходимые для правильной дифференцировки гранулезных клеток (Clarke, 2017). Гранулезные клетки начинают экспрессировать рецепторы ФСГ.

Переход от первичного к *вторичному фолликулу* связан с формированием второго и последующих слоев гранулезных клеток. *Вторичный* фолликул имеет в своем составе несколько (2—10) слоев клеток гранулезы и базальную мембрану. Над базальной мембраной появляется тека — клетки стромы, которые сначала располагаются в один слой, затем с развитием фолликула дифференцируются в клетки наружного и внутреннего слоев. Развитие теки сопровождается формированием капиллярной сети, теперь на фолликул могут действовать факторы, циркулирующие в крови. Клетки внутреннего слоя теки начинают секретировать стероиды (Erickson, 2008; Gougeon, 2010) и экспрессируют рецепторы ЛГ (Erickson, 2008). цГМФ диффундирует через щелевые контакты в ооцит и поддерживает в нем высокую концентрацию цАМФ, что и способствует предотвращению преждевременного мейотического созревания (Clarke, 2017). Это объясняет тот факт, что ооциты, извлеченные из фолликула, спонтанно созревают (Conti, Franciosi, 2018), так как теряется связь между ооцитом и клетками гранулезы.

Превращение вторичного фолликула в *третичный* характеризуется появлением между клетками гранулезы полости, содержащий жидкость, — начало формирования антрума. Образование антрума проходит под контролем паракринных механизмов при участии факторов роста, одним из которых является активин, вырабатываемый в самом фолликуле гранулезными клетками (Gougeon, 2010).

Продолжительность преантральной стадии развития фолликула — от инициации примордиального фолликула до начала роста вторичного фолликула — составляет примерно 290 сут, тогда как продолжительность последующих этапов развития фолликула — от начала образования антральной полости, то есть формирования фолликула диаметром 0.4 мм до преовуляторного фолликула диаметром 20 мм, составляет приблизительно 60 сут (Gougeon, 2010; Петров и др., 2017).

Антральные фолликулы характеризуются наличием хорошо заметной полости и чувствительны к гонадотропинам. Все *антральные* фолликулы построены по единому принципу, их морфология не меняется с увеличением размера фолликула. В *антральных* фолликулах выделяют шесть гистологических компонентов: внешнюю и внутреннюю теку, базальную пластинку, клетки гранулезы, ооцит и фолликулярную жидкость в антральной полости. Внешний слой теки содержит гладкомышечные клетки. Клетки внутреннего слоя теки — это эндокринные клетки, расположенные в соединительной ткани и окруженные кровеносными сосудами. Клетки гранулезы разделяются на внешние — пристеночные, или муральные, гранулезные клетки и клетки кумулюса (яйценосного бугорка).

Часть антральных фолликулов увеличивается в размере, достигая стадии преовуляторного фолликула, большая часть — подвергается атрезии. Рост антрального фолликула осуществляется в присутствии ФСГ за счет пролиферации клеток теки и гранулезы и увеличения количества фолликулярной жидкости. Среди растущих антральных фолликулов класса 5 (2—5 мм) начинает выделяться доминантный фолликул. Он вырабатывает наибольшее количество эстрадиола, что может способствовать атрезии недоминантных фолликулов (Erickson, 2008).

Под действием ЛГ (преовуляторный пик ЛГ в середине цикла) на клетки теки и гранулезы происходит возобновление мейоза в ооците.

Активация рецепторов ЛГ, расположенных главным образом на пристеночных гранулезных клетках, приводит к снижению концентрации цГМФ в фолликуле. Это способствует снятию «ареста» мейоза и развитию ооцита от стадии GV, или стадии зародышевого пузырька (germinal vesicle), когда ооцит имеет заметное ядро, до стадии МII. Ядерная мембрана ооцита «разбирается» (фрагментируется), что принято называть исчезновением зародышевого пузырька (germinal vesicle breakdown, GVBD). Хромосомы конденсируются, появляется первое мейотическое веретено деления (Clarke, 2017). Затем происходит первое мейотическое деление. После цитокинеза образуется первое полярное тельце. В ооците формируется второе веретено деления — ооцит достигает МII (Clarke, 2017). На данном этапе созревание ооцита снова останавливается до момента оплодотворения.

Одновременно с созреванием ядра в ооците происходит цитоплазматическое созревание, которое включает метаболические и структурные изменения в цитоплазме ооцита — в клетке происходит перемещение внутриклеточных органелл: митохондрий, аппарата Гольджи, эндоплазматического ретикулума (Conti, Franciosi, 2018; Trebichalská et al., 2021; Das, Son, 2023; Torkashvand et al., 2024).

В результате созревания ооцита связь между ним и клетками кумулюса теряется, проходит экспансия (расширение) кумулюса. Фолликул разрывается, ооцит-кумулюсные комплексы выходят в фаллопиеву трубу — осуществляется овуляция. Клетки гранулезы и теки образуют желтое тело (Telfer et al., 2023).

Важно отметить, что развитие ооцита в фолликуле регулируется сигналами от гранулезных клеток, ооцит в свою очередь влияет на дифференцировку и функционирование окружающих его клеток. Обмен веществами между ооцитом и клетками гранулезы осуществляется не только через щелевые контакты, но и при участии находящихся в фолликулярной жидкости экзосом (мембранных пузырьков), содержащих мРНК, белки, микроРНК и т. п. (Clarke, 2017).

Процесс, проходящий на заключительном этапе оогенеза, — созревание ооцита от стадии GV до МII, который запускается ЛГ и требует участия пристеночных гранулезных и кумулюсных клеток, может быть повторен *in vitro* в контролируемых искусственных условиях.

ПОЛУЧЕНИЕ МАТЕРИАЛА ДЛЯ ИVM

Для процедуры ИVM необходимо получить антральные фолликулы. В зависимости от диагноза пациентки существует несколько способов извлечения фолликулов.

1. Если отсутствует опухолевое поражение яичников, например при раке молочной железы, СПКЯ, синдроме гиперстимуляции яичников, синдроме резистентных яичников, аспирацию незрелых ооцитов с клетками кумулюса проводят трансвагинально (Смирнова и др., 2020; Лапина и др., 2022; Das, Son, 2023; Лавринович и др., 2024). Процедура ИVM после трансвагинальной аспирации ооцитов в литературе обозначается как OPU-IVM (Ovum Pick Up In Vitro Maturation) (Nogueira et al., 2023). Полученную в результате пункции фолликулярную жидкость исследуют под микроскопом на предмет наличия ОКК. Далее ОКК культивируют в специальной среде для дозревания ооцитов (табл. 2).

2. Если возможность выполнения трансвагинальной пункции фолликулов отсутствует (опухолевое поражение яичников, опухоль шейки матки, влагалища), незрелые ооциты получают из тканей удаленного яичника или части яичника (например, при доброкачественной опухоли яичника) (Anderson et al., 2017; Буняева и др., 2022; Адамян и др., 2024; Лавринович и др., 2024). Выделение ОКК из ткани яичника после овариэктомии с последующим их дозреванием *in vitro* обозначается как OTO-IVM (Ovarian Tissue Oocyte In Vitro Maturation) (Nogueira et al., 2023). Таким способом незрелые ооциты извлекают перед процедурой криоконсервации яичника. После ИVM зрелые ооциты также можно заморозить, если получение эмбрионов сразу не предполагается.

Сравнительный анализ результатов ИVM у онкологических пациенток при применении OTO-IVM (резекция яичника) и OPU-IVM (аспирация ооцитов) показал, что можно создать определенные условия, при которых скорость созревания ооцитов, полученных путем OPU-IVM, будет выше, чем при использовании OTO-IVM (Nogueira et al., 2023). Однако при выборе метода получения ооцитов более значимым является клиническое состояние пациентов.

3. Прямая аспирация ооцит-кумулюсных комплексов может быть выполнена в процессе операции кесарева сечения. Так, в литературе описан случай одновременной овариэктомии одного

яичника и прямой аспирации незрелых фолликулов из другого яичника у пациентки, которой был поставлен диагноз рабдомиосаркома шеи во время беременности (Ven-Naroush et al., 2017).

4. У некоторых женщин, в частности с СПКЯ, возможна процедура получения ооцитов путем аспирации (ОРУ) после прайминга — кратковременной (1—2 дня) стимуляции ФСГ или ХГЧ. Праймирование ФСГ у человека (600 МЕ ФСГ в течение 5 дней) перед процедурой аспирации ооцитов было применено впервые в конце XX века (Wynn et al., 1998). Сравнение с контрольной группой (без ФСГ перед аспирацией ооцитов) показало, что праймирование ФСГ способствует получению большего количества ОКК, увеличению количества ооцитов, достигших стадии МП, и скорости созревания ооцитов *in vitro*.

Другой способ праймирования — введение ХГЧ за 36—38 ч до извлечения ооцитов (Chian et al., 1999; De Vos, 2016) — также улучшает способность ооцитов к созреванию, развитию и показатели наступления беременности. Стимуляция ХГЧ способствует тому, что часть извлекаемых ооцитов будет находиться на стадии МI и МII (при отсутствии гормональной стимуляции извлекают ооциты на стадии GV). Возможен вариант, когда после предварительной подготовки (краткой относительно стандартного цикла ЭКО стимуляции ФСГ) добавляется ХГЧ (De Vos et al., 2016). В случае стимуляции гонадотропинами (ФСГ+ХГЧ) процедура может быть названа «короткий вариант ЭКО». Если ФСГ отсутствует, а пациенткам вводят только ХГЧ, такой вариант определяют как «короткий вариант ЭКО без ФСГ». Такие протоколы позволяют получить ОКК с ооцитами на стадии GV и МII, то есть гетерогенную популяцию ооцитов (De Vos et al., 2016; Sanchez et al., 2019).

5. В стимулированных циклах (в случае проведения гормональной стимуляции согласно стандартному протоколу) можно получить не только зрелые ооциты на стадии МII, но также GV-ооциты, с которыми далее можно работать по протоколу IVM. Однако, строго говоря, культивирование *in vitro* GV-ооцитов, полученных от пациенток после гормональной стимуляции, не подходит под определение классического IVM (De Vos et al., 2016) и рассматривается в настоящее время как особая разновидность IVM — *rescue IVM* («спасительное» IVM) (Escrich et al., 2018).

При работе с пациентками препубертатного периода технология IVM не может быть применена,

так как при резекции получают ткани яичника, содержащие в основном примордиальные фолликулы. В этом случае предлагается использовать методику роста ооцитов *in vitro* (IVG), а затем, после получения антральных фолликулов, — IVM. В настоящее время способ получения материала для IVM после применения технологии IVG рассматривается как экспериментальный метод (Telfer, Anderson, 2021).

В ситуации, когда необходим срочный выбор стратегии сохранения фертильности женщины, но сразу после получения и созревания ооцитов не планируется оплодотворение (например, при отсутствии у пациентки партнера), производят криоконсервацию тканей яичника (ovarian tissue cryopreservation, ОТС), или замораживание зрелых ооцитов. ОТС может быть вариантом для пациенток пост- и препубертатного возраста, проходящих гонадотоксичную и/или срочную терапию (Иванов и др., 2022; Nogueira et al., 2023). Для девочек препубертатного возраста криоконсервация тканей яичников — единственный возможный подход для сохранения фертильности (Anderson et al., 2017).

Помимо стандартной криоконсервации используют более современный метод — витрификацию, или моментальную заморозку. Витрификация отличается от медленной заморозки тем, что предотвращает образование кристаллов льда внутри и вне клетки. Это достигается комбинацией высоких концентраций криопротекторов (4—8 М/л) и сверхбыстрого охлаждения. Главный недостаток витрификации — ее цитотоксичность, связанная с высокими концентрациями криопротекторов. Однако множество исследований свидетельствует о достаточно хорошем качестве витрифицированных и затем быстро размороженных ооцитов (Khalili et al., 2017).

Существует два подхода к витрификации ооцитов при IVM: первый — витрификация незрелых ооцитов до проведения процедуры IVM, второй — витрификация ооцитов после их дозревания *in vitro*. В исследованиях, направленных на сравнение витрификации ооцитов на стадии GV и МII, показано, что скорость созревания ооцитов после витрификации на стадии GV понижена. При витрификации до IVM регистрируются изменения ультраструктуры ооцита — состояния митохондрий, хроматина, аномальная конфигурация веретена деления; к криоконсервации на стадии GV чувствительны клеточные контакты между ооцитом и клетками кумулюса (Khalili et al., 2017).

СРАВНЕНИЕ РАЗЛИЧНЫХ МЕТОДИК *IN VITRO* MATURATION (IVM) ООЦИТОВ

Стандартная методика IVM (STD-IVM) предполагает получение ооцитов I порядка на этапе профазы первого мейотического деления (GV) и культивирование их в специальной питательной среде, содержащей ФСГ, до стадии МII. При этом достаточно быстро проходит экспансия кумулюса — рост кумулюсных клеток и потеря контакта между клетками кумулюса; также утрачиваются контакты между клетками кумулюса и ооцитом (Yang et al., 2021). Потеря связей между ооцитом и клетками кумулюса приводит к нарушению процессов цитоплазматического созревания ооцита, что может сказаться на качестве ооцита (Coticchio et al., 2012; Das, Son, 2023). Стандартная методика IVM способствует ядерному созреванию, но не синхронизации ядерного и цитоплазматического созревания (Gong et al., 2022).

CAPI-IVM — это модификация методики IVM (капацитация), представляющая собой двухфазную систему культивирования (Sanchez et al., 2019; Gong et al., 2022; Das, Son, 2023). В этом случае перед IVM на протяжении 24 ч ОКК культивируют в среде с натрийуретическим пептидом типа С (CNP), ингибирующим мейоз. CNP в фолликуле *in vivo* секретируется клетками пристеночной гранулезы. CNP связывается со своим рецептором (NPR2) на поверхности клеток кумулюса и индуцирует экспрессию цГМФ. цГМФ проникает в ооцит и поддерживает в нем концентрацию цАМФ, что приводит к остановке мейоза в ооците в составе фолликула. ОКК, обработанные CNP *in vitro*, сохраняют щелевые контакты между ооцитом и кумулюсными клетками. Двухфазная IVM с применением CNP приводит к улучшению качества цитоплазматического созревания — увеличению диаметра ооцитов, активности митохондрий, количества копий митохондриальной ДНК (Gong et al., 2022). Показано значительное увеличение количества качественных ооцитов и эмбрионов при использовании методики CAPI-IVM у женщин с СПКЯ по сравнению с STD-IVM, в особенности при извлечении ооцитов менее 6 мм (Sanchez et al., 2019).

Разработаны специальные системы культивирования ооцитов с использованием микровибраций (Yang et al., 2019, 2020). В естественных условиях ооциты и эмбрионы перемещаются по маточным трубам благодаря сокращениям мышц и движению

ресничек. Эти процессы создают механические силы (сжатие, трение), которые помогают обновлять окружающую ооциты жидкость и удалять вредные метаболиты. Чтобы имитировать эти условия *in vitro*, разработаны динамические системы культивирования, такие как микроворонки, наклонные платформы и системы микровибрации. Сравнительный анализ статического и динамического культивирования ооцитов и эмбрионов показал, что использование системы микровибрации позволяет улучшить качество эмбрионов и клинические результаты — частоту наступления беременности и показатели живорождения (Yang et al., 2019).

В развивающемся *in vivo* фолликуле происходят изменения в расположении клеток друг относительно друга, агрегация клеток в отдельные функциональные слои, формируются контакты между клетками. Межклеточная коммуникация может быть нарушена в плоских двумерных (2D) системах культивирования. Согласно концепции 3D-системы культивирования ооцитов, *in vitro* необходимо использовать фолликул-имитирующие «каркасы» из коллагена, фибрина (Woodruff, Shea, 2007). Идея о встраивании клеток кумулюса в трехмерную матрицу коллагенового геля и помещении в эту систему ооцитов (Combelles et al., 2005) в первую очередь позволяет обеспечить взаимодействие между ооцитом и клетками кумулюса *in vitro*.

Предложена идея проведения IVM в небольших каплях культуральной среды (25 мкл), в которых исследователи предлагают имитировать гормональную среду внутри фолликула *in vivo* (Cadenas et al., 2023). Предлагается учитывать секретируемые ооцитами факторы — кумулин, костный морфогенетический белок 15 (BMP-15), фактор роста/ дифференцировки (GDF9) и регуляторные белки, вырабатываемые кумулюсными клетками.

В Российской Федерации разработан оригинальный подход — EM-IVM, который включает ультрацентрифугирование собственной фолликулярной жидкости женщины и инъекцию выделенных внеклеточных везикул под блестящую оболочку ооцита, что, по мнению авторов, позволяет индуцировать его созревание в условиях, приближенных к естественным условиям в фолликуле яичника. Основой для данного подхода явилось обнаружение в фолликулярной жидкости микроРНК, принимающих участие в развитии фолликула *in vivo*. Добавление микроРНК из внеклеточных везикул способствует более успешному проведению процедуры IVM (Макарова и др., 2023).

МАРКЕРЫ ЗРЕЛОСТИ ООЦИТОВ

Для оценки успешности ИVM используют маркеры зрелости ооцита, к ним относят ядерные и цитоплазматические маркеры зрелости (Xiao et al., 2015; Trebichalská et al., 2021; Torkashvand et al., 2024). В качестве ядерных маркеров зрелости ооцита рассматривают наличие/отсутствие ядра и формирование веретена деления, характерного для метафазы первого и второго деления мейоза. В качестве цитоплазматических маркеров зрелости принято рассматривать изменение положения в клетке элементов цитоскелета, аппарата Гольджи (АГ), эндоплазматической сети (ЭПС), митохондрий (Mao et al., 2014; Trebichalská et al., 2021; Torkashvand et al., 2024).

Микротрубочки и микрофиламенты на стадии GV распределены равномерно; на стадии МП — присутствуют в основном в кортикальной области. Микротрубочки веретена деления в МП располагаются перпендикулярно поверхности ооцита, веретено деления имеет бочкообразную форму и не содержит центриолей. В ооцитах, которые не развиваются, отсутствуют так называемые цитоплазматические решетки (ламеллы, фибриллярные массивы), но в полностью созревшем ооците они становятся заметны.

В незрелых ооцитах на стадии GV АГ хорошо развит, по мере созревания он постепенно разрушается, остатки могут быть обнаружены только в МI-ооцитах. В МП-ооцитах АГ полностью исчезает. Кортикальные гранулы, характерные для зрелых ооцитов, формируются из АГ и накапливаются в кортикальной области. В GV-ооцитах они практически отсутствуют, но в МI- и МП-ооцитах их количество значительно увеличивается (Torkashvand et al., 2024).

С использованием электронной микроскопии показано, что митохондрии в ооцитах — овальные, имеют плотный матрикс и небольшое количество крист, их морфология и количество не меняются значительно в процессе созревания ооцита (Trebichalská et al., 2021). До стадии GVBD митохондрии располагаются отдельно друг от друга или небольшими кластерами в перинуклеарной области и отсутствуют в кортикальной части цитоплазмы. В МI-ооцитах митохондрии обнаруживаются в кортикальной области и демонстрируют тенденцию приближаться к структурам ЭПС. На стадии МП количество митохондрий увеличивается, они распределяются по всей цитоплазме и в зрелых

ооцитах (МП) большинство митохондрий связаны с мембранами ЭПС. Авторы отмечают, что в МI появляется, а в МП становится выражено «ожерелье из митохондрий» — митохондрии окружают цистерны ЭПС (Trebichalská et al., 2021). В целом при созревании ооцита выявлена общая тенденция к перемещению органелл из перинуклеарной области (GV-стадия) и их равномерному распределению по всей цитоплазме.

В качестве маркеров зрелости также предлагается оценивать экспрессию белков — маркеров экспансии кумулюса: например, пентраксина 3, гиалуронансинтазы, простагландин-эндопероксидазы 2 (Xiao et al., 2015).

ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИVM

Выделяют несколько основных факторов, влияющих на исход ИVM (Yang et al., 2021).

1. Возраст женщины: у женщин старше 30 лет скорость созревания ооцитов снижается, а риск анеуплоидии эмбриона увеличивается.

2. Время извлечения ооцитов относительно овуляции в цикле: забор ооцитов обычно проводят при размере доминантного фолликула 10—12 мм, слишком большой размер фолликула может негативно сказаться на качестве ооцитов.

3. Давление при аспирации ооцитов: низкое давление при аспирации может улучшить результаты ИVM.

4. Способ замораживания ооцитов: витрификация незрелых ооцитов перед ИVM может негативно повлиять на созревание ооцитов, их жизнеспособность и качество.

5. Возможность прайминга — предварительной стимуляции ФСГ/ХГЧ, в особенности актуально для женщин с СПКЯ.

6. Время ИVM (24—48 ч): время культивирования *in vitro* обычно составляет 24—30 ч, более длительное культивирование может увеличить скорость созревания, но снизить качество эмбрионов.

7. Среды, используемые для культивирования ооцитов (см. табл. 2). Протоколы для приготовления сред не стандартизированы, что приводит к разнице в составе сред в разных лабораториях (Das, Son, 2023). Наиболее часто применяемыми средами для ИVM являются среда для культивирования тканей 199 (ТСМ-199), которая содержит глюкозу; аминокислоты и витамины; среда P1 (без глюкозы); трубная жидкость человека; среда для бластоцист.

Таблица 2. Основные среды, используемые для ИVM (по Yang et al., 2021)

Среда	Состав среды	Особенности	Показатели созревания ооцитов, %	Показатели оплодотворения, %	Источник литературы
TSM-199	Аминокислоты, витамины, глюкоза (высокая концентрация)	Высокое содержание глюкозы может вызывать окислительный стресс	61.0—82.0	61.5—70.0	Filali et al., 2008; De Araujo et al., 2009
Среда без глюкозы (P1)	Аналогична TSM-199, но включает пируват и лактат вместо глюкозы	Превосходит по эффективности TSM-199 для ооцитов без клеток кумулюса	59.7—71.7 (24—48 ч)	Не установлено	Cekleniak et al., 2001
Трубная жидкость (HTF)	Включает HEPES, бикарбонат натрия	Уступает TSM-199 по эффективности	56.9	39.4	De Araujo et al., 2009
Коммерческие среды ИVM—MediCult / ИVM-SAGE	Синтетические заменители сыворотки	Стабильные результаты, но требуют оптимизации	60.6—65.0	56.8—66.9	Filali et al., 2008 Pongsuthirak et al., 2014

Среда TSM-199 более эффективна, чем трубная жидкость, с точки зрения скорости созревания ооцитов, скорости оплодотворения и качества эмбрионов, что показано в исследовании с участием пациенток с СПКЯ (de Araujo et al., 2009). Среда P1 подходит для культивирования ооцитов без гранулезных клеток. Коммерческие среды, такие как MediCult ИVM и SAGE ИVM, обеспечивают стабильные результаты, но их эффективность может меняться в зависимости от ряда факторов. Поскольку способы получения ооцитов, праймирование, добавки к средам и время культивирования различаются в разных исследованиях, на основе сравнительного анализа разных исследований достаточно сложно сделать вывод о преимуществах той или иной среды для культивирования (Yang et al., 2021).

Добавки к средам для культивирования предназначены для повышения эффективности ИVM. В первую очередь в среду для поддержки созревания ооцитов добавляют гормоны. ФСГ улучшает ядерное созревание, роль ХГЧ и ЛГ остается спорной, и их добавление не является обязательным. Углеводы (глюкоза, лактат и пируват) используют как источники энергии для ооцитов и клеток кумулюса; для ОКК предпочтительно использовать глюкозу, для ооцитов без клеток кумулюса — пируват и лактат. Антиоксиданты (коэнзим Q10, мелатонин) и цитокины (GDF9, BDNF) улучшают созревание ооцитов. Антиоксиданты снижают уровень окислительного стресса, а цитокины

улучшают качество эмбрионов (Yang et al., 2021). Использование при ИVM ооцитов пациенток с СПКЯ в качестве добавки фолликулярной жидкости женщин без СПКЯ приводит к увеличению скорости созревания ооцитов. При этом добавление такой фолликулярной жидкости и супернатанта от культивирования клеток кумулюса и гранулезы дает не только увеличение скорости созревания ооцитов, но и лучшие показатели дробления и образования бластоцист (Madkour et al., 2018).

Разрабатывается концепция 3D-систем культивирования ооцитов в фолликул-имитирующих «каркасах», создаваемых на основе коллагена, фибрина. Для поддержания трехмерной архитектуры фолликула могут использоваться альгинатные гидрогели (Xiao et al., 2015). Данная методика основана на исследованиях роли внеклеточного матрикса в развитии фолликула *in vivo* (Woodruff, Shea, 2007). Так, показано, что внеклеточный матрикс значимо меняется по мере созревания фолликула, играет роль в пролиферации, дифференцировке, коммуникации, синтезе гормонов в фолликуле. Помимо структурной функции внеклеточный матрикс служит резервуаром для регуляторных молекул, имеющих значение для паракринной и эндокринной сигнализации в яичнике (Woodruff, Shea, 2007). Культивирование ооцитов человека на плоской поверхности может нарушать взаимодействие между ооцитом и окружающими его клетками (Xiao et al., 2015). Виды и состав матриксов меняются, однако в целом использование

трехмерных систем культивирования повышает эффективность IVM (Woodruff, Shea, 2007; Xiao et al., 2015).

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА IVM, ВОЗМОЖНОСТЬ СОЧЕТАНИЯ С МЕТОДОМ *IN VITRO* GROWTH (IVG)

Ограничения метода IVM связаны с менее высокой эффективностью, по сравнению с использованием МП-ооцитов, полученных в стимулированных циклах. Количество зрелых ооцитов, эмбрионов, замороженных эмбрионов, эмбрионов хорошего качества при IVM меньше, чем при стандартных процедурах (Ho et al., 2019; Gong et al., 2021). Таким образом, необходимо улучшение и стандартизация протоколов IVM.

Для IVM используются антральные фолликулы, поэтому IVM невозможно использовать для пациенток препубертатного периода. В литературе описаны единичные случаи получения зрелых ооцитов — например, у девочек 2 и 8 лет (Hanfling et al., 2021). Однако такая ситуация — скорее исключение: в яичниках пациенток младшего возраста содержатся преимущественно примордиальные фолликулы.

Для девочек, которые подвергаются гонадотоксической терапии до достижения половой зрелости, криоконсервация ткани яичников — единственный доступный метод сохранения фертильности. Далее в старшем возрасте проводят процедуру аутотрансплантации тканей яичника. Если аутотрансплантация невозможна (высокий риск метастазирования опухолевых клеток), альтернативой могла бы быть технология получения зрелых ооцитов из примордиальных фолликулов *in vitro* (Telfer, 2019). IVG имеет значение не только для пациенток, не достигших половой зрелости, но и для женщин с низким овариальным резервом или другими нарушениями репродуктивной функции (Yin et al., 2016). Данная методика позволяет контролировать процесс развития ооцитов на всех этапах, что может улучшить их качество и повысить шансы на успешное оплодотворение и развитие эмбрионов.

Одна из основных проблем при IVG связана с активацией примордиальных фолликулов и их дальнейшим развитием (Fortune, 2003). Даже если активация примордиальных фолликулов *in vitro* достигнута, переход от первичного к вторичному

фолликулу у крупных млекопитающих и человека происходит редко. Тем не менее в исследованиях на мышах уже достигнуты успехи в выращивании ооцитов из примордиальных фолликулов *in vitro* с последующим рождением живого потомства (Telfer, 2019).

Для человека также разработаны многоступенчатые системы культивирования, которые поддерживают развитие фолликулов от примордиальной до антральной стадии (McLaughlin et al., 2018). В исследовании Yin et al. (2016) показано, что вторичные фолликулы могут развиваться до антральной стадии в условиях длительного 3D-культивирования (с использованием специальных каркасов для поддержки развития фолликулов). Тем не менее IVG остается экспериментальной технологией. Основные проблемы связаны с низкой выживаемостью фолликулов в культуре, необходимостью оптимизации культуральных сред и условий, а также риском эпигенетических изменений в ооцитах, выращенных *in vitro* (Yin et al., 2016; Telfer et al., 2019). Например, в исследовании Yin et al. (2016) было отмечено, что только 15% первичных/ранних вторичных фолликулов выживали после 30 дней культивирования, что подчеркивает необходимость дальнейшей оптимизации условий культивирования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Метод IVM представляет собой перспективное направление в репродуктивной медицине, предоставляя возможность получения зрелых ооцитов без гормональной стимуляции яичников. Сочетание протоколов IVG и IVM может снять ограничения, связанные с возрастом пациентов, и внести существенный вклад в решение проблемы онкофертильности у пациенток препубертатного возраста. Ограничения метода IVM связаны с менее высокой эффективностью, что обусловлено более низким потенциалом развития ооцитов, полученных в результате IVM, по сравнению с ооцитами, полученными в стимулированных циклах. В связи с этим проводится активная работа по улучшению и стандартизации протоколов IVM, направленная на дальнейшую оптимизацию условий культивирования ооцитов. Наиболее перспективным методом в настоящее время можно считать САРА-IVM, основанное на двухфазной системе культивирования.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках бюджетного финансирования СПбГПМУ МЗ РФ и ИНЦ РАН.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В работе не участвовали животные или люди в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Адамян Л. В., Носов В. Б., Степанян А. А. 2024. Лечение, сохраняющее фертильность у онкологических пациентов: чем мы можем помочь в XXI веке? Проблемы репродукции. Т. 30. № 1. С. 26. (Adamyan L. V., Nosov V. B., Stepanyan A. A. 2024. Fertility-sparing treatment in cancer patients: What can we offer in the XXI century? Russian Journal of Human Reproduction. V. 30. No. 1. P. 26.)
- Буняева Е. С., Кириллова А. О., Назаренко Т. А., Джанашивили Л. Г., Гаджимагомедова К. К., Хабас Г. Н., Бирюкова А. М., Гависова А. А. 2022. Показания и эффективность технологии получения незрелых ооцит-кумулясных комплексов из ткани яичника с последующим их созреванием *in vitro*. Акушерство и гинекология. № 6. С. 75. (Bunayeva E. S., Kirillova A. O., Nazarenko T. A., Dzhanaashvili L. G., Gadzhimagomedova K. K., Khabas G. N., Biryukova A. M., Gavisova A. A. 2022. Indications and efficacy of the technique for retrieving immature oocyte-cumulus complexes from ovarian tissue followed by their *in vitro* maturation. Obstetrics and Gynecology. No. 6. P. 75.)
<https://dx.doi.org/10.18565/aig.2022.6.75-82>
- Иванов Д. О., Тайц А. Н., Дитковская Л. В., Матвеева Н. Н., Красногорская О. Л., Поздняков А. В., Мызникова Н. Н., Мальшева А. А., Кузьминых С. В., Орлова А. Д., Веретенникова А. А. 2022. Неонатальный сахарный диабет и поликистоз яичников у ребенка с тяжелой инсулинорезистентностью, обусловленной вариантом в гене *INSR*. Описание клинического случая. Педиатр. Т. 13. № 6. С. 109.
- Корсак В. С., Смирнова А. А., Шурыгина О. В. 2021. Регистр ВРТ Российской ассоциации репродукции человека. Отчет за 2018 год. Проблемы репродукции. Т. 27. № 2. С. 6. (Korsak V. S., Smirnova A. A., Shurygina O. V. 2021. The ART Register of the Russian Association of Human Reproduction: 2018 Report. Russian Journal of Human Reproduction. V. 27. No. 2. P. 6.)
- Корсак В. С., Смирнова А. А., Шурыгина О. В. 2021. Регистр ВРТ Российской ассоциации репродукции человека. Отчет за 2019 год. Проблемы репродукции. Т. 27. № 6. С. 14. (Korsak V. S., Smirnova A. A., Shurygina O. V. 2021. The ART Register of the Russian Association of Human Reproduction: 2019 Report. Russian Journal of Human Reproduction. V. 27. No. 6. P. 14.)
- Корсак В. С., Смирнова А. А., Шурыгина О. В. 2023. Регистр ВРТ Общероссийской общественной организации «Российская ассоциация репродукции человека». Отчет за 2021 год. Проблемы репродукции. Т. 29. № 6. С. 25. (Korsak V. S., Smirnova A. A., Shurygina O. V. 2023. The ART Register of the Russian Association of Human Reproduction: 2021 Report. Russian Journal of Human Reproduction. V. 29. No. 6. P. 25.)
- Корсак В. С., Смирнова А. А., Шурыгина О. В. 2024. Регистр ВРТ Общероссийской общественной организации «Российская ассоциация репродукции человека». Отчет за 2022 год. Проблемы репродукции. Т. 30. № 6. С. 8. (Korsak V. S., Smirnova A. A., Shurygina O. V. 2024. The ART Register of the Russian Association of Human Reproduction: 2022 Report. Russian Journal of Human Reproduction. V. 30. No. 6. P. 8.)
- Лавринович О. Е., Татищева Ю. А., Берлев И. В., Яковлева М. Г., Карицкий А. П., Калугина А. С. 2024. ОТО-IVM — метод сохранения фертильности пациенткам с опухолевым поражением яичников. Сибирский онкологический журнал. Т. 23. № 4. С. 96. (Lavrinovich O. E., Tatishcheva Yu. A., Berlev I. V., Yakovleva M. G., Karitsky A. P., Kalugina A. S. 2024. OTO-IVM: A fertility preservation method for patients with ovarian tumor involvement. Siberian Journal of Oncology. V. 23. No. 4. P. 96.)
<https://doi.org/10.21294/1814-4861-2024-23-4-96-107>
- Лапина И. А., Доброхотова Ю. Э., Сорокин Ю. А., Малахова А. А., Чирвон Т. Г., Таранов В. В., Германович Н. Ю., Ковальская Е. В., Кайкова О. В., Гомзикова В. М., Твердикова М. А. 2022. Сохранение репродуктивного материала при помощи метода *in vitro maturation* у пациенток с онкологическими заболеваниями. Гинекология. Т. 24. № 1. С. 41. (Lapina I. A., Dobrokhotova Yu. E., Sorokin Yu. A., Malakhova A. A., Chyrvon T. G., Tarantov V. V., Germanovich N. Yu., Kovalskaya E. V., Kaykova O. V., Gomzikova V. M., Tverdikova M. A. 2022. Fertility preservation using *in vitro maturation* method in cancer patients. Gynecology. V. 24. No. 1. P. 41.)
<https://doi.org/10.26442/20795696.2022.1.201350>

- Макарова Н. П., Сысоева А. П., Силачев Д., Непша О. С., Горюнов К. В., Шевцова Ю. А., Калинина Е. А., Зингеренко Б. В., Сухих Г. Т. 2023. Технология дозревания ооцитов человека на стадии GV с помощью внеклеточных везикул фолликулярной жидкости в программах экстракорпорального оплодотворения. Патент. Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В. И. Кулакова МЗРФ. (Makarova N. P., Sysoeva A. P., Silachev D., Nepsha O. S., Goryunov K. V., Shevtsova Yu. A., Kalinina E. A., Zingerenko B. V., Sukhikh G. T. 2023. Technology for human oocyte maturation at GV stage using extracellular vesicles from follicular fluid in in vitro fertilization programs. Patent. Academician V. I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology of the Ministry of Health of the Russian Federation.)
- Михайлова Н. Д., Мишиева Н. Г., Кириллова А. О., Мартазанова Б. А., Джинчарадзе Л. Г. 2021. Дозревание ооцитов *in vitro*. Акушерство и гинекология. № 11. С. 64. (Mikhailova N. D., Misheva N. G., Kirillova A. O., Martazanova B. A., Dzhincharadze L. G. 2021. In vitro oocyte maturation. *Obstetrics and Gynecology*. No. 11. P. 64.)
<https://dx.doi.org/10.18565/aig.2021.11.64-70>
- Петров И. А., Дмитриева М. Л., Тихоновская О. А., Петрова М. С., Логвинов С. В. 2017. Тканевые и молекулярные основы фолликулогенеза. Механизмы раннего фолликулярного роста. Проблемы репродукции. Т. 23. № 5. С. 33. (Petrov I. A., Dmitrieva M. L., Tikhonovskaya O. A., Petrova M. S., Logvinov S. V. 2017. Tissue and molecular basis of folliculogenesis: Mechanisms of early follicular growth. *Russian Journal of Human Reproduction*. V. 23. No. 5. P. 33.)
<https://doi.org/10.17116/repro201723533-41>
- Смирнова А. А., Сергеев С. А., Жорданидзе Д. О., Анишина М. Б. 2020. IVM у пациенток с высоким риском развития СГЯ. Проблемы репродукции. Т. 26. № 2. С. 47. (Smirnova A. A., Sergeev S. A., Zhordanidze D. O., Anshina M. B. 2020. IVM for patients at high risk of OHSS. *Russian Journal of Human Reproduction*. V. 26. No. 2. P. 47.)
- Соколова Ю. В., Мартиросян Я. О., Назаренко Т. А., Бирюкова А. М., Хубаева Д. Г., Краснова В. Г. 2022. Молекулярно-биологические основы внутри яичникового фолликулогенеза, созревания и рекрутинга фолликулов. Акушерство и гинекология. № 1. С. 22. (Sokolova Yu. V., Martirosyan Ya. O., Nazarenko T. A., Birjukova A. M., Khubaeva D. G., Krasnova V. G. 2022. Molecular and biological basis of intraovarian folliculogenesis, follicle maturation and recruitment. *Obstetrics and Gynecology*. No. 1. P. 22.)
- Элленбоген А., Шалом-пац Е., Анишина М. Б., Смирнова А. А. 2015. Дозревание ооцитов *in vitro*. Показания, техника и результаты. Проблемы репродукции. Т. 21. № 1. С. 32. (Ellenbogen A., Shalom-Paz E., Anshina M. B., Smirnova A. A. 2015. In vitro oocyte maturation: Indications, techniques and outcomes. *Russian Journal of Human Reproduction*. V. 21. No. 1. P. 32.)
- Anderson R. A., Wallace W. H. B., Telfer E. E. 2017. Ovarian tissue cryopreservation for fertility preservation: clinical and research perspectives. *Hum. Reprod. Open*. 2017: Article ID: hox001.
<https://doi.org/10.1093/hropen/hox001>
- Ben-Haroush A., Abir R., Sapir O., Garor R., Fisch B. 2017. Aspiration of immature oocytes during cesarean section for fertility preservation. *J. Matern. Fetal Neonatal Med*. V. 30. P. 2112.
<https://doi.org/10.1080/14767058.2016.1238895>
- Bosch E., Broer S., Griesinger G., Grynberg M., Humaidan P., Kolibianakis E., Kunicki M., La Marca A., Lainas G., Le Clef N., Massin N., Mastenbroek S., Polyzos N., Sunkara S. K., Timeva T., et al. 2020. ESHRE guideline: ovarian stimulation for IVF/ICSI. *Hum. Reprod. Open*. V. 2020. Article ID: hoaa009.
<https://doi.org/10.1093/hropen/hoaa009>
- Cadenas J., la Cour Poulsen L., Mamsen L. S., Andersen C. Y. 2023. Future potential of in vitro maturation including fertility preservation. *Fertil. Steril*. V. 119. P. 550.
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2023.01.027>
- Cekleniak N. A., Combelles C. M., Ganz D. A., Fung J., Albertini D. F., Racowsky C. 2001. A novel system for in vitro maturation of human oocytes. *Fertil. Steril*. V. 75. P. 1185.
[https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(01\)01789-7](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(01)01789-7)
- Cha K. Y., Koo J. J., Ko J. J., Choi D. H., Han S. Y., Yoon T. K. 1991. Pregnancy after in vitro fertilization of human follicular oocytes collected from nonstimulated cycles, their culture in vitro and their transfer in a donor oocyte program. *Fertil. Steril*. V. 55. P. 109.
[https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)54068-0](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)54068-0)
- Chian R. C., Gulekli B., Buckett W. M., Tan S. L. 1999. Priming with human chorionic gonadotropin before retrieval of immature oocytes in women with infertility due to the polycystic ovary syndrome. *New Engl. J. Med*. V. 341. P. 1624.
- Clarke H. 2017. Control of mammalian oocyte development by interactions with the maternal follicular environment. *Results Probl. Cell Differ*. V. 63. P. 17.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-60855-6_2
- Cobo A., Meseguer M., Remohí J., Pellicer A. 2010. Use of cryo-banked oocytes in an ovum donation programme: a prospective, randomized, controlled, clinical trial. *Hum. Reprod*. V. 25. P. 2239.
<https://doi.org/10.1093/humrep/deq146>

- Combelles C. M., Fissore R. A., Albertini D. F., Racowsky C.* 2005. In vitro maturation of human oocytes and cumulus cells using a co-culture three-dimensional collagen gel system. *Hum. Reprod.* V. 20. P. 1349. <https://doi.org/10.1093/humrep/deh750>
- Conti M., Franciosi F.* 2018. Acquisition of oocyte competence to develop as an embryo: integrated nuclear and cytoplasmic events. *Hum. Reprod. Update.* V. 24. P. 245. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmx040>
- Coticchio G., Dal-Canto M., Guglielmo M. C., Mignini-Renzini M., Fadini R.* 2012. Human oocyte maturation in vitro. *Int. J. Dev. Biol.* V. 56. P. 909. <https://doi.org/10.1387/ijdb.120135gv>
- Das M., Son W. Y.* 2023. In vitro maturation (IVM) of human immature oocytes: is it still relevant? *Reprod. Biol. Endocrinol.* V. 21. P. 110. <https://doi.org/10.1186/s12958-023-01162-x>
- Das M., Son W. Y., Buckett W., Tulandi T., Holzer H.* 2014. In vitro maturation versus IVF with GnRH antagonist for women with polycystic ovary syndrome: treatment outcome and rates of ovarian hyperstimulation syndrome. *Reprod. Biomed. Online.* V. 29. P. 545. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2014.07.019>
- de Araujo C. H., Nogueira D., de Araujo M. C., de Martins W. P., Ferriani R. A., dos Reis R. M.* 2009. Supplemented tissue culture medium 199 is a better medium for in vitro maturation of oocytes from women with polycystic ovary syndrome women than human tubal fluid. *Fertil. Steril.* V. 91. P. 509. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.11.082>
- De Vos M., Smitz J., Thompson J. G., Gilchrist R. B.* 2016. The definition of IVM is clear-variations need defining. *Hum. Reprod.* V. 31. P. 2411. <https://doi.org/10.1093/humrep/dew208>
- Erickson G. F.* 2008. Follicle growth and development. *Glob. Libr. Women's Med.* (ISSN: 1756-2228). <https://doi.org/10.3843/GLOWM.10289>
- Escrich L., Galiana Y., Grau N., Insua F., Soler N., Pellicer A., Escribá M.* 2018. Do immature and mature sibling oocytes recovered from stimulated cycles have the same reproductive potential? *Reprod. Biomed. Online.* V. 37. P. 667.
- Filali M., Hesters L., Fanchin R., Tachdjian G., Frydman R., Frydman N.* 2008. Retrospective comparison of two media for invitro maturation of oocytes. *Reprod. Biomed. Online.* V. 16. P. 250. [https://doi.org/10.1016/s1472-6483\(10\)60582-2](https://doi.org/10.1016/s1472-6483(10)60582-2)
- Fortune J. E.* 2003. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Anim. Reprod. Sci.* V. 78. P. 1353. [https://doi.org/10.1016/s0378*4320\(03\)00088-5](https://doi.org/10.1016/s0378*4320(03)00088-5)
- Gong X., Li H., Zhao Y.* 2022. The improvement and clinical application of human oocyte in vitro maturation (IVM). *Reprod. Sci.* V. 29. P. 2127. <https://doi.org/10.1007/s43032-021-00613-3>
- Gougeon A.* 1986. Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results. *Hum. Reprod.* V. 1. P. 81. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a136365>
- Gougeon A.* 2010. Human ovarian follicular development: from activation of resting follicles to preovulatory maturation. *Ann. Endocrinol. (Paris).* V. 71. P. 132. <https://doi.org/10.1016/j.ando.2010.02.021>
- Hanfling S. N., Parikh T., Mayhew A., Robinson E., Graham J., Gomez-Lobo V., Maher J. Y.* 2021. Case report: two cases of mature oocytes found in prepubertal girls during ovarian tissue cryopreservation. *F. S. Rep. V. 2.* P. 296. <https://doi.org/10.1016/j.xfre.2021.03.007>
- Ho V. N. A., Braam S. C., Pham T. D., Mol B. W., Vuong L. N.* 2019. The effectiveness and safety of in vitro maturation of oocytes versus in vitro fertilization in women with a high antral follicle count. *Hum. Reprod.* V. 34. P. 1055. <https://doi.org/10.1093/humrep/dez060>
- Humaidan P., Nelson S. M., Devroey P., Coddington C. C., Schwartz L. B., Gordon K., Frattarelli J. L., Tarlatzis B. C., Fatemi H. M., Lutjen P., Stegmann B. J.* 2016. Ovarian hyperstimulation syndrome: review and new classification criteria for reporting in clinical trials. *Hum. Reprod.* V. 31. P. 1997. <https://doi.org/10.1093/humrep/dew149>
- Khalili M. A., Shahedi A., Ashourzadeh S., Nottola S. A., Macchiarelli G., Palmerini M. G.* 2017. Vitrification of human immature oocytes before and after in vitro maturation: a review. *J. Assist. Reprod. Genet.* V. 34. P. 1413. <https://doi.org/10.1007/s10815-017-1005-4>
- Macklon N. S., Fauser B. C.* 1999. Aspects of ovarian follicle development throughout life. *Horm. Res.* V. 52. P. 161. <https://doi.org/10.1159/000023456>
- Madkour A., Bouamoud N., Kaarouch I., Louanjli N., Saadani B., Assou S., Aboulmaouahib S., Sefrioui O., Amzazi S., Copin H., Benkhalifa M.* 2018. Follicular fluid and supernatant from cultured cumulus-granulosa cells improve in vitro maturation in patients with polycystic ovarian syndrome. *Fertil. Steril.* V. 110. P. 710. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.04.038>
- Mao L., Lou H., Lou Y., Wang N., Jin F.* 2014. Behaviour of cytoplasmic organelles and cytoskeleton during oocyte maturation. *Reprod. Biomed. Online.* V. 28. P. 284. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2013.10.016>
- McLaughlin M., Albertini D. F., Wallace W. H. B., Anderson R. A., Telfer E. E.* 2018. Metaphase II oocytes from human unilaminar follicles grown in a multi-step culture system. *Mol. Hum. Reprod.* V. 24. P. 135. <https://doi.org/10.1093/molehr/gay002>

- Mu Z., Shen S., Lei L.* 2022. Resistant ovary syndrome: pathogenesis and management strategies. *Front. Med. (Lausanne)*. V. 19. Article ID: 1030004.
- Nogueira D., Fajau-Prevot C., Clouet M., Assouline P., Deslandres M., Montagut M.* 2023. Outcomes of different in vitro maturation procedures for oocyte cryopreservation for fertility preservation and yet another live birth in a cancer patient. *Life*. V. 13. Article ID: 1355.
<https://doi.org/10.3390/life13061355>
- Pincus G., Enzmann E. V.* 1935. The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro: I. The activation of ovarian eggs. *J. Exp. Med.* V. 62. P. 665.
<https://doi.org/10.1084/jem.62.5.665>
- Plancha C. E., Rodrigues P., Marques M., Almeida J. M., Navarro-Costa P.* 2021. The time is ripe for oocyte in vitro maturation. *J. Assist. Reprod. Genet.* V. 38. P. 1281.
<https://doi.org/10.1007/s10815-021-02209-x>
- Pongsuthirak P., Songveeratham S., Vutyavanich T.* 2015. Comparison of blastocyst and Sage media for in vitro maturation of human immature oocytes. *Reprod. Sci.* V. 22. P. 343.
<https://doi.org/10.1177/1933719114542027>
- Sanchez F., Le A. H., Ho V. N. A., Romero S., Van Ranst H., De Vos M., Gilchrist R. B., Ho T. M., Vuong L. N., Smitz J.* 2019. Biphasic in vitro maturation (CAPA-IVM) specifically improves the developmental capacity of oocytes from small antral follicles. *J. Assist. Reprod. Genet.* V. 36. P. 2135.
<https://doi.org/10.1007/s10815-019-01551-5>
- Sánchez F., Smitz J.* 2012. Molecular control of oogenesis. *Biochim. Biophys. Acta*. V. 1822. P. 1896.
<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.05.013>
- Telfer E. E.* 2019. Future developments: In vitro growth (IVG) of human ovarian follicles. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* V. 98. P. 653.
<https://doi.org/10.1111/aogs.13592>
- Telfer E. E., Andersen C. Y.* 2021. In vitro growth and maturation of primordial follicles and immature oocytes. *Fertil. Steril.* V. 115. P. 1116.
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2021.03.004>
- Telfer E. E., Grosbois J., Odey Y. L., Rosario R., Anderson R. A.* 2023. Making a good egg: human oocyte health, aging, and in vitro development. *Physiol. Rev.* V. 103. P. 2623.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00032.2022>
- Torkashvand H., Shabani R., Artimani T., Amiri I., Pilehvari S., Torkashvand L., Mehdizadeh R., Mehdizadeh M.* 2024. Oocyte competence develops: nuclear maturation synchronously with cytoplasm maturation. *Zygote*. V. 32. P. 421.
<https://doi.org/10.1017/S0967199424000169>
- Trebichalská Z., Kyjovská D., Kloudová S., Otevřel P., Hampl A., Holubcová Z.* 2021. Cytoplasmic maturation in human oocytes: an ultrastructural study. *Biol. Reprod.* V. 104. P. 106.
<https://doi.org/10.1093/biolre/iaaa174>
- Woodruff T. K., Shea L. D.* 2007. The role of the extracellular matrix in ovarian follicle development. *Reprod. Sci.* V. 14. P. 6.
<https://doi.org/10.1177/1933719107309818>
- Wynn P., Picton H. M., Krapez J. A., Rutherford A. J., Balen A. H., Gosden R. G.* 1998. Pretreatment with follicle stimulating hormone promotes the numbers of human oocytes reaching metaphase II by in vitro maturation. *Hum. Reprod.* V. 13. P. 3132.
<https://doi.org/10.1093/humrep/13.11.3132>
- Xiao S., Zhang J., Romero M. M., Smith K. N., Shea L. D., Woodruff T. K.* 2015. In vitro follicle growth supports human oocyte meiotic maturation. *Sci. Rep.* V. 5. Article ID: 17323.
<https://doi.org/10.1038/srep17323>
- Yang H., Kolben T., Meister S., Paul C., van Dorp J., Eren S., Kuhn C., Rahmeh M., Mahner S., Jeschke U., von Schönfeldt V.* 2021. Factors influencing the in vitro maturation (IVM) of human oocyte. *Biomedicines*. V. 9. Article ID: 1904.
<https://doi.org/10.3390/biomedicines9121904>
- Yang S. H., Hur Y. S., Yoon S. H., Jung J. H., Lim J. H., Ko Y.* 2020. A comparison of embryonic development and clinical outcomes between in vitro oocytes maturation using microvibration system and in vivo oocytes maturation in polycystic ovarian syndrome patients. *Gynecol. Obstet. Invest.* V. 85. P. 252.
<https://doi.org/10.1159/000507441>
- Yang S. H., Yoon S. H., Jung J. H., Lim J. H., Ko Y.* 2019. Improvement of embryonic development and clinical outcomes of germinal vesicle stage oocytes using a microvibration culture system. *Syst. Biol. Reprod. Med.* V. 65. P. 333.
<https://doi.org/10.1080/19396368.2019.1602681>
- Yin H., Kristensen S. G., Jiang H., Rasmussen A., Andersen C. Y.* 2016. Survival and growth of isolated pre-antral follicles from human ovarian medulla tissue during long-term 3D culture. *Hum. Reprod.* V. 31. P. 1531.
<https://doi.org/10.1093/humrep/dew049>

MATURATION OF OOCYTES *IN VITRO*: BIOLOGICAL BASIS AND PROSPECTS FOR CLINICAL USE

A. O. Drobintseva^a, V. K. Frolov^a, I. O. Bogolyubova^{a, b}, O. E. Savelyeva^a, S. A. Kuleva^a

^a Saint Petersburg State Pediatric Medical University, Saint Petersburg, 194100, Russia

^b Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, 194064, Russia

In vitro oocyte maturation (IVM) involves the aspiration of prophase I oocytes in oocyte-cumulus complexes from small antral follicles and their subsequent maturation to metaphase II (MII). IVM is a promising method for obtaining MII oocytes in cases where hormonal stimulation of the ovaries is undesirable or impossible. At the same time, in terms of maturation rates and developmental capacity, oocytes obtained as a result of the IVM procedure are inferior to oocytes obtained in stimulated cycles; therefore, improving IVM protocols is a hot topic. The review discusses the possibilities of the IVM procedure in the context of key stages of oocyte maturation and their achievement of nuclear and cytoplasmic maturity. The advantages and disadvantages of various IVM techniques and the main directions for their further improvement are highlighted.

Keywords: *in vitro* maturation, folliculogenesis, antral follicle, oocyte-cumulus complex, cytoplasmic maturation