

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

На правах рукописи

АГАДЖАНИЯН
Диана Сейрановна

**ВЛИЯНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА НА
ИСХОДЫ ПРОГРАММ ЛЕЧЕНИЯ БЕСПЛОДИЯ
МЕТОДАМИ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ
РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ**

3.1.4. Акушерство и гинекология

**Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук**

Научные руководители:

доцент, доктор медицинских наук
Смольникова Вероника Юрьевна

кандидат биологических наук
Красный Алексей Михайлович

Москва – 2023

Оглавление

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА В РЕПРОДУКЦИИ ЧЕЛОВЕКА (обзор литературы).....	12
1.1. Особенности функционирования женских половых клеток, органов и тканей в условиях повышенного окислительного стресса ..	13
1.2. Окислительный стресс и функции мужских половых клеток	20
1.3. Факторы, индуцирующие окислительный стресс, в программах лечения бесплодия методами ВРТ	32
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	38
2.1. Дизайн исследования	39
2.2. Критерии включения и исключения.....	40
2.3. Методы исследования.....	41
2.3.1. Общеклинические методы исследования	41
2.3.2. Ультразвуковое исследование органов малого таза	45
2.3.3. Анализ нативного эякулята и подготовка сперматозоидов к оплодотворению в программах ВРТ	46
2.3.4. Стимуляция функции яичников в программах ВРТ	47
2.3.5. Эмбриологический этап программ ВРТ: оценка ооцитов и эмбрионов	48
2.3.6. Перенос эмбриона в полость матки.....	49
2.4. Специальные методы исследования.....	50
2.4.1. Сбор биологических жидкостей для оценки оксидативного стресса и общей антиоксидантной защиты.....	50
2.4.2. Методы определения уровня окислительного стресса и активных форм кислорода в биологических жидкостях пациентов с бесплодием..	51
2.5. Статистическая обработка данных	53
3.1. Клинико-anamнестические данные супружеских пар, включенных в исследование.....	55
3.2. Окислительный стресс и уровень АФК в фолликулярной жидкости/крови женщин с бесплодием как фактор прогнозирования исходов программ ВРТ.....	64
Глава 4. ИСХОДЫ ПРОГРАММ ВРТ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УРОВНЯ ОКСИДЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА В ЭЯКУЛЯТЕ	71

4.1. Клинико-anamнестические данные супружеских пар, включенных в исследование.....	71
4.2. Оценка исходов программ ВРТ в зависимости от уровня окислительного стресса нативного эякулята в день оплодотворения..	75
Глава 5. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	81
ВЫВОДЫ.....	92
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	94
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	95

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АМГ	Антимюллеров гормон
ант-ГнРГ	Антагонист гонадотропин-рилизинг-гормон
АТФ	Аденозинтрифосфат
АФК	Активные формы кислорода
ВИЧ	Вирус иммунодефицита человека
ВОЗ	Всемирная организация здравоохранения
ВРТ	Вспомогательные репродуктивные технологии
ГнРГ	Гонадотропин-рилизинг гормон
ДГА-С	Дегидроэпиандростерон сульфат
ДНК	Дезоксирибонуклеиновая кислота
ИКСИ	Интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида в ооцит
ИППП	Инфекции, передающиеся половым путем
ЛГ	Лютеинизирующий гормон
НГЭ	Наружный генитальный эндометриоз
ОАС	Общая антиоксидантная способность
ОС	Окислительный стресс
ПЭ	Перенос эмбриона в полость матки
РАРЧ	Российская ассоциация репродукции человека (Россия)
СПКЯ	Синдром поликистозных яичников
СТГ	Соматотропный гормон
ТВП	Трансвагинальная пункция фолликулов
ТПФ	Трубно-перитонеальный фактор бесплодия
ТТГ	Тиреотропный гормон
УЗИ	Ультразвуковое исследование
ФЖ	Фолликулярная жидкость
ФСГ	Фолликулостимулирующий гормон
цАМФ	Циклический аденозинмонофосфат
чХГ	Хорионический гонадотропин человека

ВВЕДЕНИЕ

АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для преодоления как женского, так и мужского бесплодия многие супружеские пары нуждаются в применении методов вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ). Решающую роль в достижении положительных результатов при использовании методов ВРТ играет качество получаемого материала. Согласно современным литературным данным, факторы окружающей среды, такие как плохая экология, хроническая интоксикация, ультрафиолетовое облучение, контакт с различными химикатами могут рассматриваться как причины, приводящие к снижению фертильности [1, 2]. Попадание в организм различных ксенобиотиков, в том числе токсинов окружающей среды, может приводить к активации процессов свободно-радикального окисления с избыточным образованием активных форм кислорода. В последние годы все большую популярность приобретает изучение окислительного стресса. В частности, очень важна роль окислительного стресса в женской и мужской фертильности и именно ей уделяется пристальное внимание.

Возникновение окислительного стресса обусловлено избыточной продукцией активных форм кислорода, которые не только играют важную роль в качестве вторичных мессенджеров во многих внутриклеточных сигнальных каскадах, но и оказывают влияние на патологические процессы, затрагивающие женские половые пути. Активные формы кислорода и антиоксиданты объединяются в процессах регуляции репродуктивных процессов как у животных, так и у человека. Дисбаланс между прооксидантами и антиоксидантами может привести к нарушениям деятельности репродуктивной системы [2]. Окислительный стресс нарушает процессы сперматогенеза, созревания ооцитов, стероидогенеза в яичниках, овуляции, оплодотворения, имплантации и

эмбрионального развития, приводя к бесплодию или прерыванию беременности [3].

В большинстве зарубежных и отечественных исследований показано, что незначительное количество активных форм кислорода в фолликулярной жидкости и эякуляте необходимо для нормального развития и функционирования половых клеток, но избыточная продукция активных форм кислорода приводит к снижению качества клеточного материала и, как следствие, к снижению частоты оплодотворения и ухудшению исходов лечения методами ВРТ. Активные формы кислорода непосредственно повреждают ДНК хромосом и инициируют процесс апоптоза в половых клетках, что приводит, в конечном итоге, к бесплодию. Именно поэтому исследователи все чаще обращаются к изучению процессов окислительного стресса у пациентов с бесплодием. Более того, определение уровня активных форм кислорода и антиоксидантной защиты в сыворотке крови, фолликулярной жидкости и эякуляте позволит идентифицировать новые биомаркеры для оценки качества эмбриона, прогнозирования его успешной имплантации, а также создания протоколов прегравидарной подготовки пациентов к программам лечения бесплодия методами ВРТ.

В связи с вышесказанным, представляется современным, актуальным и перспективным исследование влияния окислительного стресса в биологических жидкостях на исходы программ ВРТ.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Прогнозирование исходов программ лечения бесплодия методами ВРТ путем оценки уровня активных форм кислорода и общей антиоксидантной защиты в периферической крови, фолликулярной жидкости и эякуляте у супружеских пар с различными типами бесплодия.

ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Проанализировать клинико-anamнестические данные, параметры фолликуло-, оогенеза и раннего эмбриогенеза у обследуемых групп пациентов с различными факторами бесплодия.

2. Определить общий уровень активных форм кислорода и показателей общей антиоксидантной защиты в фолликулярной жидкости и периферической крови женщин с бесплодием и выявить наиболее значимые клинико-anamнестические критерии.

3. Провести сравнительный анализ частоты наступления беременности и ранних репродуктивных потерь группах с женским фактором бесплодия с учетом показателей АФК и антиоксидантной защиты.

4. Определить влияние показателей окислительного стресса эякулята на параметры эмбриологического этапа программ лечения бесплодия методами ВРТ у супружеских пар с мужским фактором бесплодия.

5. Разработать математическую модель прогнозирования исходов лечения пациентов с бесплодием в программах ВРТ в зависимости от выраженности окислительного стресса в биологических жидкостях с учетом полученных данных.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА

Выявлены клинические и лабораторные факторы повышенного окислительного стресса в фолликулярной жидкости и периферической крови женщин с различными типами бесплодия.

Построена математическая модель прогнозирования частоты наступления беременности и ее пролонгирования до 12 недель гестации на основании параметров активных форм кислорода и общей антиоксидантной способности в фолликулярной жидкости и периферической крови женщин с бесплодием.

Изучена эффективность программ лечения бесплодия методами ВРТ в зависимости от уровня окислительного стресса нативного эякулята партнеров.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

В результате проведенного исследования выделены группы риска по высокому уровню окислительного стресса (наличие трубно-перитонеального фактора бесплодия, продолжительная стимуляция овуляции более 9 дней и ИМТ женщины более 25 кг/м²). Показана значимость параметров активных форм кислорода и антиоксидантной защиты в нативном эякуляте на морфологические характеристики получаемой бластоцисты на 5-й день культивирования на эмбриологическом этапе программы ВРТ.

Разработанная математическая модель позволяет прогнозировать эффективность программ ВРТ у супружеских пар с различными факторами бесплодия на основании параметров окислительного стресса в биологических жидкостях.

ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ

1. При женском факторе бесплодия наиболее значимыми параметрами, влияющими на уровень активных форм кислорода в фолликулярной жидкости и периферической крови являются индекс массы тела ($R_s=0,238$; $p=0,039$) и число дней овариальной стимуляции ($R_s=0,293$; $p=0,011$).
2. Уровень общей антиоксидантной способности в периферической крови у женщин с трубно-перитонеальным фактором бесплодия значимо выше по сравнению с пациентками без трубно-перитонеального фактора (1,38 ммоль/л экв.тролокса против 1,06 ммоль/л экв.тролокса, $p=0,013$).
3. У пациенток программ ВРТ оценка показателей уровней активных форм кислорода и общей антиоксидантной защиты в

фолликулярной жидкости позволяют прогнозировать исходы беременности до 12 недель гестации: увеличение АФК в ФЖ на 1 единицу увеличивает шансы развития беременности в 1,5 раза, увеличение ОАС в ФЖ на 1 единицу снижает шансы прогрессирования беременности до 12 недель в 1,2 раза.

4. У супружеских пар с мужским фактором бесплодия параметры окислительного стресса в эякуляте оказывают достоверное ($p < 0,05$) влияние на частоту оплодотворения и количество blastocyst морфологически хорошего качества, не влияя на частоту наступления беременности.

ЛИЧНЫЙ ВКЛАД АВТОРА

Автор лично принимал участие в выборе научной темы, постановке цели и задач для ее достижения. Самостоятельно проводил отбор пациентов в исследование и сбор биологического материала, а также интерпретацию полученных данных, в том числе показателей окислительного стресса методами FORD и FORT и статистическую обработку результатов. Автором опубликованы 3 статьи в рецензируемых научных журналах.

СООТВЕТСТВИЕ ДИССЕРТАЦИИ ПАСПОРТУ НАУЧНОЙ СПЕЦИАЛЬНОСТИ

Научные положения, отраженные в настоящем диссертационном исследовании, соответствуют специальности 3.1.4. «Акушерство и гинекология». Полученные результаты работы соответствуют области исследования специальности, конкретно пунктам 4 и 5 паспорта акушерства и гинекологии.

СТЕПЕНЬ ДОСТОВЕРНОСТИ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Диссертационное исследование проведено на качественном уровне с использованием новых методов определения уровней окислительного

стресса. Достоверность полученных результатов обеспечивается последовательным и логичным изложением задач работы и их решением, использованием комплексного подхода к обследованию супружеских пар в программах лечения бесплодия методами ВРТ, а также корректным применением методов статистической обработки данных. В рамках работы проведено корректное сравнение полученных результатов с данными современной литературы. Для построения математической модели использованы правильные статистические инструменты.

АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ

Основные положения настоящей диссертационной работы доложены на межклинической конференции ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России 23 июня 2022 г., апробационной комиссии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России 09 января 2023 г., а также представлены в виде устного доклада на Всероссийском форуме «Мать и дитя» (Москва, 2021 г.).

МЕТОДОЛОГИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведено проспективное обследование супружеских пар, проходящих лечение бесплодия методами ВРТ. Были определены уровни активных форм кислорода и уровень общей антиоксидантной защиты в биологических жидкостях (фолликулярная жидкость, венозная кровь и нативный эякулят) методами FORT и FORD. Пациенты были обследованы согласно действующим клиническим рекомендациям «Женское бесплодие» (пересмотр 2021 года).

В рамках диссертации был проведен критический анализ отечественных и зарубежных работ в области оценки окислительного стресса в биологических жидкостях пациентов с бесплодием в программах ВРТ. На основании анализа были сформулированы цель и задачи исследования. Анализируемые пациенты были стратифицированы

на группы в зависимости от исходов программ лечения, уровней окислительного стресса и факторов бесплодия.

ВНЕДРЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ В ПРАКТИКУ

Полученные в работе результаты позволили начать разработку тест-системы по оценке окислительного стресса у пациентов с бесплодием, внедрение которой в практическую работу происходит в отделении вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени профессора Б.В. Леонова ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (директор — академик РАН, профессор Сухих Г.Т.)

ПУБЛИКАЦИИ

По теме исследования опубликованы 3 научные работы в журналах, входящих в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, 1 — тезисы российских конференций.

СТРУКТУРА И ОБЪЕМ ДИССЕРТАЦИИ

Диссертационная работа написана по традиционному академическому плану, содержит обзор литературы, материалы и методы, собственные результаты, их обсуждение, выводы и практические рекомендации, список цитируемой литературы. Представлена на 104 печатных листах, иллюстрирована 4 рисунками, содержит 17 таблиц. Библиографический указатель содержит 67 российских и зарубежных научных источников.

ГЛАВА 1. ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА В РЕПРОДУКЦИИ ЧЕЛОВЕКА (обзор литературы)

Окислительный стресс (ОС), обусловленный дисбалансом между активными формами кислорода (АФК) и антиоксидантами, может негативно повлиять на результаты лечения мужского и женского бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) [2, 4]. Избыток АФК вызывает повреждение клеточных мембран, воздействуя на мембранные липиды, нарушение работы внутриклеточных органелл и ДНК, изменение ферментативной функции половых клеток, а также может привести к апоптозу [2]. АФК могут вырабатываться внутриклеточно: в незрелых сперматозоидах, ооцитах и эмбрионах. В процессе лечения бесплодия методами ВРТ вызывать высокую выработку АФК могут внешние факторы: атмосферный кислород, инкубаторы с CO_2 , расходные материалы, видимый свет, температура, влажность, летучие органические соединения и добавки к питательным средам [2]. Патологические количества АФК образуются во время процесса криоконсервации–разморозки гамет или эмбрионов. Как правило, эти факторы могут действовать на любом из шагов эмбриологического этапа ВРТ: от подготовки гамет к оплодотворению до переноса эмбриона в полость матки. Ниже описано влияние ОС на гаметы и эмбрионы, выработанные стратегии смягчения воздействия ОС в течение всего периода культивирования эмбрионов человека, а также особенности прегравидарной подготовки пациентов к программе ВРТ с высокими значениями окислительного стресса в биологических жидкостях.

1.1. Особенности функционирования женских половых клеток, органов и тканей в условиях повышенного окислительного стресса

Описаны различные биомаркеры оксидативного стресса в женских половых путях. В научной литературе показано присутствие как активных форм кислорода, так и транскриптов антиоксидантных ферментов. Активные формы кислорода (АФК) могут действовать как медиаторы многих процессов, связанных с женской репродуктивной функцией. АФК участвуют в овариальном стероидогенезе, овуляции, созревании ооцитов, а также развитии эмбриона [4]. Аэробный метаболизм, который производит АФК за счет использования кислорода, необходим для энергетических потребностей ооцитов и эмбрионов. В эндометрии окислительный стресс участвует в его циклических изменениях: уровни АФК повышаются в поздней секреторной фазе, непосредственно перед менструацией. Нормальное функционирование женской репродуктивной системы подразумевает активное формирование свободных радикалов и такое же активное подавление их системой антиоксидантов.

О влиянии повышенных уровней АФК на качество ооцитов и эмбрионов в программах лечения бесплодия методами ВРТ в настоящее время в научной литературе опубликованы противоречивые данные, в частности, комплексная оценка АФК в фолликулярной жидкости женщин с бесплодием не проведена. Отсутствуют научно обоснованные доказательства физиологических уровней АФК у женщин с нестимулированными яичниками и точной роли присутствия окислительного стресса (ОС) в ФЖ женщин с бесплодием, проходящих лечение методами ВРТ [5].

Экспериментально был установлен верхний уровень АФК в образцах фолликулярной жидкости женщин, проходивших программы ВРТ, за пределами которого формирование эмбрионов хорошего качества

маловероятно [5]. Обнаружено, что верхний пороговый уровень АФК в фолликулярной жидкости, выше которого образование жизнеспособных эмбрионов невозможно, составляет приблизительно 107 усл.ед. Авторы исследования сделали вывод, что окислительный стресс действительно влияет на исходы эмбриологического этапа программ ВРТ, с помощью оценки АФК в фолликулярной жидкости было обосновано качество получаемых ооцитов и их роль в развитии эмбриона.

В исследовании Bedaiwy M. et al. проводилась оценка связи между уровнями АФК, общей антиоксидантной способности (ОАС), отношением АФК к общей антиоксидантной способности и беременностью. Было проведено лечение бесплодия методами ВРТ 138 супружеских парам. Измерение АФК и ОАС в фолликулярной жидкости проводили с помощью хемилюминесценции. Пациентки, которые забеременели, имели достоверно более низкий уровень АФК в фолликулярной жидкости и более высокий уровень ОАС по сравнению с группой контроля. Также у беременных пациенток было статистически значимо более высокое соотношение АФК к общей антиоксидантной способности [6].

Целью исследования Siristatidis С. с коллегами была оценка качества эмбрионов в цикле ВРТ по уровню АФК в сыворотке и ФЖ женщин. У 85 пациенток в день трансвагинальной пункции яичников (ТВП) проводился забор фолликулярной жидкости и сыворотки крови для измерения уровня АФК с помощью иммуноферментного анализа. Авторы не обнаружили достоверной связи между уровнем АФК в биологических жидкостях и качеством эмбрионов, также как и влияния индекса массы тела, курения, возраста и протокола стимуляции [7].

В исследовании Luddi A. et al. приняли участие женщины с бесплодием старше 39 лет, в анамнезе которых было две программы ВРТ. Авторам было важно оценить влияние антиоксидантных препаратов на исходы программ лечения бесплодия методами ВРТ [8]. В первом

протоколе пациентки не получали никаких антиоксидантных препаратов, при этом перед второй овариальной стимуляцией в течение 3-х месяцев и на протяжении всей стимуляции женщины получали микронутриенты. Проводили оценку уровня общей антиоксидантной способности в сыворотке и фолликулярной жидкости в циклах ВРТ с добавлением или без добавления микронутриентов. Анализ двумерного электрофореза показал, что фолликулярная жидкость и белки сыворотки защищены от окислительного повреждения, когда пациенты принимали микронутриенты перед программой ВРТ. Сопоставимые результаты были получены при измерении общей антиоксидантной способности. Более того, среднее количество ооцитов хорошего качества, аспирированных у пациенток, получавших добавку микронутриентов, значительно увеличилось [8].

Результаты Elizur S. et al. показали влияние АФК на исходы программ ВРТ. Оценив уровень перекиси водорода (H_2O_2) в фолликулярной жидкости двух отдельных фолликулов, авторы утверждают, что самые высокие значения H_2O_2 ассоциируются с развитием эмбрионов низкого качества, а самые низкие значения АФК соответствуют пустым фолликулам [9]. Исследователи связали наличие повышенных уровней АФК со старением фолликулов, неспособностью производить хорошие эмбрионы и атрезией.

Luddi A. et al. изучали влияние окислительного стресса на частоту наступления беременности путем мониторинга малонового диальдегида в фолликулярной жидкости. Пациентки были разделены на две группы: I группа — беременность наступила, II группа — отсутствие беременности. Статистически значимых различий по возрасту, длительности бесплодия, уровню ФСГ, количеству аспирированных ооцитов и частоты оплодотворения между двумя группами не было обнаружено. При этом отмечено, что частота наступления беременности снижается при более высоком уровне малонового диальдегида [8].

В 2018 г. Nishihara T. et al. провели исследование, в котором выполняли забор фолликулярной жидкости во время пункции фолликулов для изучения взаимосвязи между антиоксидантным статусом и маркерами оксидативного стресса с исходами программ ВРТ. Показано, что уровень глутатиона был ниже у пациенток с низкой частотой оплодотворения после ИКСИ, в то время как уровень 8-гидрокси-2-дезоксигуанозина был выше у пациенток с низкой частотой оплодотворения и получением бластоцист хорошего качества. При этом достоверных различий в исходах беременности отмечено не было [10].

Zal F. et al. в 2020 году показали, что глутатион-зависимая антиоксидантная система лучше функционирует в фолликулярной жидкости ооцитов, из которых формируются эмбрионы высокого качества [11]. Однако авторы публикации изучали только женщин с синдромом поликистозных яичников и не рекомендуют распространять полученные данные на когорту пациенток с другими причинами бесплодия.

Супероксиддисмутаза тоже относится к группе антиоксидантных ферментов. Вместе с другими антиоксидантными ферментами она защищает организм человека от постоянно образующихся высокотоксичных кислородных радикалов. Результаты экспериментальных работ на мышах показали, что гомозиготный дефицит у них гена супероксиддисмутазы вызывает снижение их плодовитости [14]. В исследовании было продемонстрировано, что в фолликулярной жидкости пациенток, ооциты которых не оплодотворялись, имелся статистически значимо более высокий уровень активности супероксиддисмутазы, чем у женщин, чьи ооциты успешно оплодотворились. В 2010 г. Liu J. et al. опубликовали результаты о том, что женщины с отрицательным исходом программы лечения бесплодия методом ВРТ имели более низкую активность супероксиддисмутазы в

фолликулярной жидкости по сравнению с пациентками с наступившей беременностью [15].

Terao H. et al. в 2019 г. оценивали влияние окислительного стресса в ФЖ на оплодотворение ооцита и дробление эмбриона. Фолликулярную жидкость из 3-х фолликулов аспирировали в отдельные пробирки и анализировали путем измерения маркера окислительного стресса, активных метаболитов кислорода (тест d-ROM) и антиоксидантного маркера (тест биологического антиоксидантного потенциала). Значение d-ROM коррелировало с нормальным оплодотворением и получением эмбрионов хорошего качества, тогда как повышенное значение биологического антиоксидантного потенциала наблюдалось в группе эмбрионов с лучшими параметрами. Индекс окислительного стресса, определенный как $d-ROM/BAP \times 100\%$ показал, что более низкий индекс окислительного стресса был связан с нормальным оплодотворением и развитием эмбриона [16]. Данные результаты показывают, что баланс между окислительным стрессом и антиоксидантной способностью фолликулярной жидкости в момент аспирации ооцитов играет важную роль в процессах оплодотворения ооцита и последующего дробления эмбриона.

Было проведено исследование влияния протокола гонадотропной стимуляции яичников в протоколах с препаратами агонистов или антагонистов гонадотропин-рилизинг гормона (ГнРГ) на параметры окислительного стресса в сыворотке женщин, а также на исходы программ ВРТ. В проспективное исследование включены 82 пациентки. В сыворотке крови женщин определяли уровень супероксиддисмутазы и малонового альдегида. Забор крови проводили на 2-4 день овариальной стимуляции и в день введения триггера финального дозревания ооцитов — хорионического гонадотропина человека (ХГЧ). Пациентки были разделены на две группы в зависимости от протокола стимуляции. Количество зрелых ооцитов на стадии МII и частота оплодотворения

были выше в группе с агонистами ГнРГ. Достоверной разницы в показателях беременности, невынашивания и живорождения между группами выявлено не было. Частота родов была выше у пациенток с низким уровнем окислительного стресса, тогда как частота выкидышей была выше у пациенток с высоким окислительным стрессом. Авторы утверждают, что исход программ ВРТ лучше у пациенток без оксидативного стресса, определяемого методом хемилюминесценции, при этом вид протокола стимуляции яичников не связан ни с изменением параметров окислительного стресса, ни с исходом программ ВРТ [17].

Восстановление антиоксидантного статуса возможно при введении в организм микронутриентов, составляющих неотъемлемую часть антиоксидантной системы. Адекватное поступление в организм женщины витаминов и минералов необходимо не только в период беременности, но и на этапе подготовки к программам ВРТ. В связи с этим в систематическом обзоре Florou P. с коллегами оценивали данные о влиянии коэнзима Q10 на исходы программ ВРТ [18]. Был проведен всесторонний поиск литературы в PubMed (MEDLINE), Cochrane и Scopus. В исследование были включены 449 женщин с диагнозом бесплодие, из которых 215 женщин принимали коэнзим Q10 и 234 были в группе плацебо. Было обнаружено, что пероральный прием коэнзима Q10 до программы ВРТ повышает вероятность наступления клинической беременности по сравнению с группой плацебо и при отсутствии терапии.

Проведенный мета-анализ продемонстрировал значительно более высокое количество зрелых ооцитов, а также наступления клинической беременности при использовании мелатонина, который считается антиоксидантом [19].

В рамках изучения прегравидарной подготовки к ВРТ Amini L. et al. провели клиническое исследование, в котором оценивали роль антиоксидантов у женщин с наружным генитальным эндометриозом (НГЭ). Оксидативный стресс является одним из ключевых факторов,

участвующих в патогенезе эндометриоза. В исследование включили 60 женщин репродуктивного возраста (15–45 лет) с I–III стадией лапароскопически подтвержденного НГЭ. Участницы были рандомизированы по группам: группа А, которым давали комбинацию витамина С (1000 мг/день, 2 таблетки по 500 мг) и витамина Е (800 МЕ/день, 2 таблетки по 400 МЕ каждая) и группа В, пациентки которой принимали таблетки плацебо ежедневно в течение 8 недель. У женщин, принимавших витамины С и Е, было обнаружено значительное снижение концентрации манолового альдегида и АФК по сравнению с группой плацебо, при этом значительного снижения общей антиоксидантной способности не наблюдали [20].

Одной из причин прерываний беременности неизвестной этиологии может быть окислительный стресс, который приводит к аномальной плацентации из-за его вредного воздействия на клетки трофобласта [21]. Было высказано предположение, что плацентарный окислительный стресс во время дифференцировки и формирования маточно-плацентарного кровообращения приводит к ранней потере беременности.

Плацента является жизненно важным органом беременности, который служит связующим звеном между матерью и плодом, посредством которого происходит обмен питательными веществами, кислородом и гормонами. Она также обеспечивает защиту и иммунитет для развивающегося плода. У людей нормальная плацентация начинается с трофобластической инвазии материнских спиральных артерий. Плацентарная сосудистая сеть претерпевает изменения для обеспечения оптимальной перфузии материнских сосудов. До «отключения» материнских спиральных артерий трофобластическими пробками состояние низкой концентрации кислорода на ранних сроках беременности вызывает нормальную физиологическую гипоксию. В это время синцитиотрофобласт лишен антиоксидантов и, таким образом, остается уязвимым для окислительного повреждения.

Между 10-й и 12-й неделями беременности трофобластические пробки удаляются из материнских спиральных артерий, заполняя межворсинчатое пространство кровью матери. Это событие сопровождается значительным повышением концентрации кислорода, дающим начало полному материнскому артериальному кровообращению в плаценте, что связано с резким увеличением АФК и возрастающим окислительным стрессом.

При физиологических концентрациях АФК стимулируют пролиферацию клеток и экспрессию генов. Плацентарная готовность к повышенной концентрации кислорода в конце первого триместра беременности выражается в мгновенной экспрессии антиоксидантных генов при повышении окислительного стресса. Весь процесс направлен на защиту эмбрио- и органогенеза от токсичного влияния активных форм кислорода.

Если материнский кровоток достигает межворсинчатого пространства преждевременно, плацентарный окислительный стресс может наступить слишком рано и вызвать ухудшение состояния синцитиотрофобласта. Это может привести к различным осложнениям, включая выкидыш, привычное невынашивание беременности и преэклампсию.

На основании вышеизложенных данных оценка маркеров окислительного стресса в фолликулярной жидкости и периферической крови пациенток с бесплодием представляется актуальной для прогнозирования качества эмбрионов и исходов программ лечения бесплодия методами ВРТ.

1.2. Окислительный стресс и функции мужских половых клеток

Сегодня все чаще практикуется оценка окислительного стресса при диагностике мужского бесплодия. Было обнаружено, что у мужчин с необъяснимым и идиопатическим бесплодием повышен уровень окислительного стресса [27]. Кроме того, прослеживается связь между

такими состояниями, как варикоцеле, инфекция, воспаление и повреждение спинного мозга и окислительным стрессом, что подчеркивает важность тестирования показателей окислительного стресса в этих клинических ситуациях. Также оценка уровня окислительного стресса в семенной жидкости с течением времени может помочь при мониторинге реакции на антиоксидантную терапию и определении эффективных доз и продолжительности лечения.

В литературе описано более 30 различных способов измерения уровня окислительного стресса сперматозоидов. Это либо прямые тесты (измерение степени окисления в мембране сперматозоидов), либо косвенные (оценка пагубных последствий ОС, таких как повреждение ДНК) [3]. Несмотря на растущий объем фактических данных, ВОЗ, а также клинические рекомендации РФ не рекомендуют проводить оценку ОС для диагностики мужского бесплодия. Главные проблемы в основном связаны с доступностью тестов, сложностью, экономической эффективностью и, что более важно, отсутствием общепринятого протокола тестирования. Однако последние научные публикации, связанные с оценкой параметров окислительного стресса в мужской репродуктивной системе и анализом исходов циклов ВРТ, указывают на целесообразность проведения таких тестов, особенно при идиопатическом факторе мужского бесплодия.

На территории Российской Федерации, согласно последним эпидемиологическим данным, мужское бесплодие, в частности нарушения сперматогенеза, составляет 50% среди супружеских пар, обращающихся в лечебные учреждения для использования методов ВРТ. Снижение фертильности мужчин репродуктивного возраста связано как с гормональными изменениями, происходящими в организме и влияющими на сперматогенный эпителий, так и со снижением репаративных возможностей клеток, стрессом и вредными привычками.

Сперматозоиды, несмотря на свою геномную интактность, чувствительны ко многим повреждающим воздействиям, что приводит к росту числа сперматозоидов, несущих патологический геном. Наиболее частой причиной фрагментации ДНК являются активные формы кислорода и окислительный стресс [4]. О влиянии окислительного стресса на качество эякулята впервые заговорил Джон Маклеод еще в середине XX века. Он обнаружил, что в среде, богатой кислородом, сперматозоиды быстро теряют подвижность, при этом при добавлении антиоксидант-каталазы происходит ее восстановление. Показано, что низкие уровни АФК необходимы для капацитации сперматозоидов, акросомальной реакции и оплодотворения [5].

Научно обосновано, что капацитация и апоптоз являются связанными процессами, которые зависят от внутриклеточной выработки АФК. АФК вместе с другими факторами в сперматозоидах увеличивают внутриклеточный циклический аденозинтрифосфат (цАМФ), который затем активирует протеинкиназу А. Эти изменения, в свою очередь, увеличивают фосфорилирование тирозина, что является основой капацитации [13]. Продолжительная генерация АФК сперматозоидами неизбежно приводит к снижению способности этих клеток выдерживать оксидативный стресс. В результате «перекапацитированные» мужские клетки, не способные защититься от АФК, погибают по пути апоптоза. Во время капацитации мембрана акросомы сперматозоида становится нестабильной и высвобождается несколько гидролитических ферментов, таких как акрозин, что позволяет сперматозоидам связываться с ооцитом. То есть при повышенной выработке АФК происходит преждевременная акросомная реакция у множества сперматозоидов, что негативно влияет на процесс оплодотворения как *in vivo*, так и в программах лечения бесплодия методами ВРТ.

Внутриклеточные концентрации АФК определяются балансом между скоростью образования АФК и скоростью их выведения

различными механизмами антиоксидантной защиты. При повышенной продукции АФК или недостаточном функционировании антиоксидантной системы возникает окислительно-восстановительный дисбаланс, который приводит к негативному воздействию на различные компоненты клеток, такие как белки, липиды, углеводы и нуклеиновые кислоты. Сперматозоиды подвержены перекисному окислению липидов из-за большого количества полиненасыщенных жирных кислот в составе их мембран. Избыточное окисление приводит к нарушению проницаемости мембран сперматозоидов и потери АТФ, снижая подвижность мужских половых клеток.

Еще одним последствием окислительного повреждения мембраны сперматозоидов является нарушение процесса оплодотворения. При проведении программ лечения бесплодия методами ВРТ с использованием метода интрацитоплазматической инъекции сперматозоида в ооцит (ИКСИ) это не является препятствием, и сперматозоид с множественными повреждениями дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) оплодотворяет ооцит. При этом развитие эмбриона нарушается на более поздних стадиях развития, в частности, при активации собственного генома на 3-и сутки культивирования. Также показано, что при повышенной фрагментации ДНК сперматозоидов достоверно повышена частота невынашивания беременности [14].

Основными источниками АФК в эякуляте являются лейкоциты и незрелые сперматозоиды. Количество лейкоцитов увеличивается в семенной плазме из-за воспаления или инфекции половых путей. Повышение АФК в сперме вследствие лейкоцитоспермии приводит к снижению концентрации антиоксидантов, что приводит к повреждению ДНК мужских гамет [15].

В мужской репродуктивной системе в норме существует баланс между продукцией АФК и антиоксидантной системой. Избыточная

продукция АФК и снижение антиоксидантной способности в сперме приводит к возникновению окислительного стресса. Организм разработал систему антиоксидантной защиты, удаляя и сводя к минимуму образование свободных радикалов, полученных из кислорода, чтобы защититься от последствий окислительного повреждения. Антиоксиданты содержатся как в семенной плазме, так и в самих сперматозоидах [23,24]. Установлено, что в самих сперматозоидах не так много антиоксидантных ферментов и что их защита опирается на антиоксидантные системы, присутствующие в семенной плазме [25].

Антиоксиданты принято делить на ферментативные и не ферментативные. Мужская репродуктивная система содержит оба вида антиоксидантов. К ферментативным антиоксидантам относят супероксиддисмутазу, каталазу и пероксидазу. Неферментативные антиоксиданты в сперме обычно присутствуют в форме витамина С, витамина Е, бета-каротинов, каротиноидов, флавоноидов и белков. Антиоксидантные ферменты в сперме не могут предотвратить перекисное окисление липидов на мембранах жгутика и акросомы, то есть сперматозоидам также нужна дополнительная система антиоксидантной защиты.

В 2020 году проведена работа по оценке уровня активных форм кислорода, общей антиоксидантной способности, а также уровня 8-гидродезоксигуанозина в семенной плазме у мужчин [26]. Было проанализировано 28 образцов спермы фертильных доноров с нормозооспермией и 25 образцов спермы бесплодных мужчин с астенозооспермией. По результатам исследования было обнаружено, что мужчины с астенозооспермией имели более высокие уровни АФК по сравнению с мужчинами с нормозооспермией. Однако между изучаемыми группами не наблюдали достоверной разницы в уровнях общей антиоксидантной способности. Концентрация 8-

гидродезоксигуанозина у мужчин с астенозооспермией была достоверно выше по сравнению с мужчинами с нормозооспермией [27].

Mayorga-Torres M. et al. оценили влияние АФК, перекисного окисления липидов, общей антиоксидантной способности при идиопатическом мужском бесплодии. Исследование проводили на образцах спермы 54 здоровых доноров, 23 мужчин с идиопатическим бесплодием и 34 фертильных мужчин. У мужчин с идиопатическим бесплодием наблюдали повышенную продукцию внутриклеточных активных форм кислорода и фрагментацию ДНК по сравнению с фертильной группой. При этом никаких существенных различий в других параметрах семенной плазмы между фертильными и бесплодными мужчинами не обнаружено [28]. Авторы полагают, что изменения в продукции внутриклеточных АФК и фрагментация ДНК могут быть причиной мужского идиопатического бесплодия, но подтверждения не приводят.

В другом исследовании для определения связи между мужским бесплодием и ДНК фрагментацией сперматозоидов проводился анализ различных микроэлементов (цинк, магний, свинец) в сыворотке крови и АФК в семенной плазме [14]. Пациенты были распределены на две группы. Первую группу составили пациенты с мужским фактором бесплодия, вторую (контрольную) группу — фертильные мужчины, имеющие детей. Результаты исследования показали, что ионы цинка, свинца и магния в сыворотке крови достоверно коррелируют с фрагментацией ДНК сперматозоидов. При увеличении концентрации цинка, магния и свинца в сыворотке крови происходило статистически значимое увеличение фрагментации ДНК сперматозоидов. Уровень АФК в семенной плазме у мужчин с бесплодием был статистически значимо выше, чем у мужчин, имеющих детей. Это позволило авторам сделать вывод, что уровни микроэлементов в сыворотке крови и АФК в семенной

плазме могут влиять на процессы восстановления и фрагментации ДНК мужских половых клеток.

В 2020 году Kuroda A. et al. опубликовали данные о взаимосвязи между активными формами кислорода в эякуляте, частотой оплодотворения ооцитов и частотой бластуляции при ИКСИ. В исследование было включено 77 пар в программах ВРТ [15]. В исследование включали женщин до 43 лет с двумя и более зрелыми ооцитами, пригодными для оплодотворения. Женские половые клетки были стратифицированы на две группы: нормальное и аномальное/отсутствие оплодотворения. На третьи сутки культивирования оценивали качество дробящихся эмбрионов, которые на 5-е сутки сформировали бластоцисты, также разделенные по качеству согласно классификации Гарднера. Было выявлено, что уровень АФК значительно выше в группе с неправильным дроблением (ассимметричное дробление, неравномерные бластомеры). Авторы делают вывод, что активные формы кислорода в семенной жидкости оказывают неблагоприятное воздействие как на раннюю, так и на позднюю стадии развития эмбриона при ИКСИ.

В работе Zandieh A. et al. было проанализировано 28 образцов спермы мужчин с идиопатическим бесплодием и 30 образцов спермы фертильных мужчин [23]. Внутриклеточный уровень H_2O_2 и супероксида аниона (O_2^-) определяли с помощью проточной цитометрии с использованием 2',7'-дихлородигидрофлуоресцина диацетата и дигидроэтидия, соответственно, а фрагментацию ДНК оценивали с помощью теста диспергирования хроматина сперматозоидов. В группе мужчин с идиопатическим бесплодием подвижность сперматозоидов и нормальная морфология были значительно ниже, чем в контрольной. Уровни H_2O_2 , O_2^- и фрагментация ДНК в сперматозоидах были значительно выше у бесплодных мужчин по сравнению с фертильными. Более того, была обнаружена положительная корреляция между уровнем

H_2O_2 и фрагментацией ДНК сперматозоидов в группе с идиопатическим бесплодием. Снижение подвижности сперматозоидов в группе мужчин с идиопатическим бесплодием достоверно коррелировало с повышенным уровнем АФК.

Subramanian V. et al. в 2018 г. опубликовали статью, в которой была изучена связь между уровнем АФК и общей антиоксидантной способностью в семенной плазме у мужчин в парах, проходящих лечение методом внутриматочной инсеминации [30]. Продукцию АФК измеряли с помощью анализа реактивных частиц тиобарбитуровой кислоты, а общую антиоксидантную способность — с помощью анализа свободных радикалов 2,2-дифенил-2-пикрилгидразида. В исследование были включены 87 мужчин с низкой фертильностью и 23 мужчины с нормальной репродуктивной функцией. Уровень малонового диальдегида был значительно выше у мужчин с бесплодием, чем у фертильных, в то время как средний уровень антиоксидантов был значительно ниже у субфертильных, чем у фертильных мужчин. Была обнаружена отрицательная связь в семенной плазме между уровнем малонового альдегида и концентрацией, подвижностью и морфологией сперматозоидов, тогда как с уровнями общей антиоксидантной способностью наблюдали обратную связь [30].

Недавно был опубликован систематический обзор и мета-анализ результатов исследований для оценки маркеров окислительного стресса в семенной плазме пациентов с мужским бесплодием. Использовали базы данных PubMed, EMBASE, CNKI, VIP и Wanfang, а также литературу, опубликованную до июня 2017 года, в которой сообщалось об обнаружении маркеров окислительного стресса в семенной плазме пациентов, страдающих бесплодием [24]. Из 1024 первоначально выбранных статей 65 исследований были включены в мета-анализ, в которых изучали одиннадцать маркеров окислительного стресса. Пациенты были разделены на две группы: 3819 пациентов с мужским

бесплодием и контрольная фертильная группа, состоящая из 2012 мужчин. Концентрация малонового диальдегида, оксида азота NO и карбонильного белка в семенной плазме были статистически значимо выше у пациентов с бесплодием. Концентрации глутатиона, витамина С, витамина Е, а также активность каталазы глутатионпероксидазы и глутатион-S-трансферазы были достоверно меньше при бесплодии, что приводило к снижению общей антиоксидантной способности в эякуляте. Активность супероксиддисмутазы не показала статистической разницы между пациентами с бесплодием и контрольной группой. Данный мета-анализ показывает, что окислительный стресс в результате снижения факторов антиоксидантной защиты в эякуляте ассоциирован с мужским бесплодием [24].

Zorn B. et al. выясняли, существует ли связь между АФК и оплодотворением, качеством эмбрионов и частотой наступления беременности в программах лечения бесплодия методами ВРТ. В подготовленной нативной сперме 147 мужчин оценку АФК проводили с помощью хемилюминесценции. Частоту оплодотворения и морфологию эмбрионов на 2-й и 4-й день оценили в 41 цикле ЭКО и 106 циклах ИКСИ. После ЭКО частота оплодотворения и наступление беременности были отрицательно связаны с уровнем АФК. При более высоком уровне АФК значительно меньшее количество эмбрионов, полученных с помощью ИКСИ, достигло стадии морулы и бластоцисты к 4-му и 5-му дням. Авторы считают, что высокий уровень АФК в семенной жидкости связан с нарушением способности сперматозоидов к оплодотворению и более низкой частотой наступления беременности после ЭКО. При ИКСИ наблюдается отрицательная корреляция АФК с развитием эмбриона до стадии бластоцисты [35].

В 2019 году Varik G. et al. также оценивали параметры окислительного стресса в семенной плазме и определяли влияние антиоксидантов на качество спермы при бесплодии. Была измерена

концентрация малонового диальдегида, общий уровень антиоксидантов и выраженность окислительного стресса в семенной плазме [31]. Выявлено, что уровень малонового альдегида, общий уровень антиоксидантов и выраженность окислительного стресса выше у мужчин с патозооспермией. После 3-х месяцев приема антиоксидантной терапии у мужчин отмечали снижение концентрации малонового альдегида и выраженности окислительного стресса, в то время как общий уровень антиоксидантов достоверно увеличился. До приема антиоксидантной терапии мужские половые клетки обладали низкой оплодотворяющей способностью в программах ВРТ, что изменилось в лучшую сторону после эмпирической терапии. Эти данные показывают, что окислительный стресс связан с изменениями в сперматозоидах, которые, в свою очередь, приводят к развитию эмбрионов более низкого качества, а лечение антиоксидантами способно улучшить параметры спермы [31].

В исследовании Otasevic V. et al. изучали влияние ферментов общей антиоксидантной способности (каталазы, супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы) на параметры спермы у мужчин. В исследование были включены 14 мужчин с нормозооспермией и 84 мужчины с патозоспермией. Исследование супероксиддисмутазы и каталазы не показали своей актуальности в качестве биомаркеров прогнозирования качественных параметров спермы. При этом уровень глутатионпероксидазы был снижен во всех группах с патозооспермией, что может являться актуальным при оценке мужской фертильности [15].

Для преодоления мужского бесплодия следует подробнее рассмотреть механизмы, вызывающие повреждение сперматозоидов. На данный момент общепризнанным стандартом в лечении мужского бесплодия, вызванного окислительным стрессом, является назначение эмпирической антиоксидантной терапии, которая может улучшить качество спермы и мужскую фертильность.

У мужчин с высокой фрагментацией ДНК сперматозоидов и сопутствующим варикоцеле назначение комбинированной антиоксидантной терапии, включающей L-карнитин, витамин С, коэнзим Q10, витамин Е, цинк, фолиевую кислоту, селен и витамин В₁₂ приводит к значительному снижению ДНК фрагментации, а также увеличению концентрации сперматозоидов [32]. Было проведено исследование, в котором оценивали влияние антиоксидантной терапии на ДНК фрагментацию сперматозоидов. Первая группа в качестве терапии принимала витамин С и витамин Е по 1 грамму в день в течение 2 месяцев, вторая группа — плацебо. По сравнению с плацебо прием антиоксидантов в первой группе привел к снижению ДНК-фрагментации сперматозоидов, несмотря на отсутствие улучшения параметров спермы [33].

Исследование Alahmar A. et al. в 2021 году было направлено на выяснение влияния антиоксидантных препаратов на параметры спермы. В проспективное исследование были включены 70 пациентов с идиопатической олигоастенотератозооспермией, которые случайным образом были стратифицированы для приема коэнзима Q₁₀ (200 мг/день) и селена (200 мкг/день) в течение 3 месяцев. Было показано увеличение концентрации и подвижности сперматозоидов при лечении обоими антиоксидантами, а также значительное увеличение общей антиоксидантной способности спермы [34].

Sadaghiani S. et al. провели рандомизированное клиническое исследование, в которое было включено 50 бесплодных мужчин с олигозооспермией и астенозооспермией [33]. Перед началом исследования у всех участников был взят образец спермы для анализа. Впоследствии в течение 3-х месяцев ежедневно пациенты получали 30 мг кофермента Q10, 8 мг цинка, 100 мг витамина С, 12 мг витамина Е, 400 мг фолиевой кислоты и 200 мг селена через день. После 3-х месяцев лечения у мужчин брали второй образец семенной жидкости и

сравнивали параметры спермы до и после теста. Было выявлено, что все параметры спермы, включая объем, pH, морфологию, количество и прогрессивную подвижность сперматозоидов, были значительно выше после курса лечения.

Положительное влияние на параметры спермы было отмечено Leila Nazari et al. при лечении мужчин L-карнитином [36]. В данное исследование включили 180 бесплодных мужчин с диагнозом идиопатическая олигоастенотератозооспермия. Были проанализированы образцы спермы пациентов до и после перорального приема антиоксидантного препарата, содержащего 1500 мг L-карнитина, 60 мг витамина С, 20 мг кофермента Q10, 10 мг витамина Е, 10 мг цинка, 200 мкг витамина В₉, 50 мкг селена, 1 мкг витамина В₁₂. Все пациенты получали терапию дважды в день в течение 3-х месяцев. Результатом данного исследования являлось статистически значимое увеличение концентрации сперматозоидов и улучшение показателей морфологически нормальных сперматозоидов в эякуляте после курса терапии. При этом подвижность сперматозоидов существенно не изменилась.

Naeri F. et al. в 2022 году изучали связь между потреблением пищевых антиоксидантов и витаминов на параметры качества спермы среди иранских мужчин. В исследование были включены 400 мужчин с установленным диагнозом бесплодие. Было обнаружено, что употребление β-криптоксантина с пищей связано с улучшением подвижности сперматозоидов [37].

В целом эмпирическая терапия антиоксидантами благоприятно влияет на мужскую фертильность, но необходимы дальнейшие исследования для определения оптимального режима назначения препаратов, чтобы безопасно и эффективно использовать его в клинической практике, в частности, при подготовке мужчин к программам лечения бесплодия методами ВРТ.

1.3. Факторы, индуцирующие окислительный стресс, в программах лечения бесплодия методами ВРТ

При проведении процедур ВРТ гаметы подвергаются различным манипуляциям *in vitro*, которые могут вызывать развитие окислительного стресса. Особенно это касается сперматозоидов, которые имеют ограниченное количество внутриклеточных антиоксидантов. Защиту от окисления обеспечивает в основном семенная жидкость, поскольку содержит широкий спектр как ферментативных (например, супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза), так и неферментативных (например, витамин С, витамин Е, глутатион) соединений с антиоксидантными свойствами [38]. Но во время подготовки сперматозоидов к оплодотворению образцы нативного эякулята обычно промывают, а семенную жидкость удаляют. Кроме того, во время всплытия сперматозоидов при выделении методом «swim-up» прежде чем мигрировать на поверхность культуральной среды, мужские гаметы могут вступать в тесный контакт с лейкоцитами и незрелыми половыми клетками — основными источниками АФК. Также увеличение образования АФК может вызвать центрифугирование, используемое при подготовке эякулята; при этом прослеживается зависимость между временем центрифугирования и выработкой АФК: более длительное время центрифугирования связано с более высоким количеством АФК и повреждением сперматозоидов [38]. При обработке ооцитов удаление кумулюсных клеток необходимо выполнять как можно быстрее и при постоянной контролируемой температуре, так как чашки для культивирования быстро остывают во время манипуляций в боксе с ламинарным потоком воздуха [39]. Изменения температуры в буферной среде могут сделать рН нестабильным, что имеет негативное влияние на женские половые клетки. Важно отметить, что ни одно оборудование и ни одна культуральная среда в лаборатории ЭКО до сих пор не смогли точно воспроизвести условия женского репродуктивного тракта *in vivo*.

Во время ранней имплантации эмбрион сталкивается с почти бескислородными условиями в матке. Это изменение концентрации кислорода примерно с 2–5% в яичниках до почти бескислородного сопровождается сменой эмбрионального метаболизма с окислительного фосфорилирования с низким уровнем глюкозы в маточной трубе до гликолиза с высоким уровнем глюкозы в матке при имплантации и раннем постимплантационном периоде [40]. После плацентации, во время так называемого постимплантационного переключения эмбрионального метаболизма, скорость гликолиза снова снижается, а окислительное фосфорилирование увеличивается [41]. Затем устанавливается плацентарное кровообращение и повышается уровень кислорода, вызывая пролиферацию, рост клеток и дифференцировку. Таким образом, для оплодотворения, развития эмбриона, имплантации и дальнейшей дифференцировки необходим точно контролируемый окислительно-восстановительный баланс [42]. Исследования с эмбриональными стволовыми клетками человека показали, что физиологическая концентрация кислорода приносит пользу эмбрионам, уменьшая клеточный стресс и предотвращая эпигенетические изменения и необратимую инактивацию X-хромосомы [42]. Оптимальная концентрация кислорода для культивирования эмбрионов для снижения влияния окислительного стресса *in vitro* широко обсуждалась научным сообществом в течение последних десятилетий. Показатели оплодотворения, дробления, имплантации и наступления беременности существенно не отличались при использовании концентраций кислорода 5% или 20% во время культивирования эмбрионов до 2-го или 3-го дня, однако существенно различались при оценке частоты бластуляции [43].

В практических рекомендациях Европейского общества по репродуктологии и эмбриологии (ESHRE) рекомендуется культивировать эмбрионы человека при низких концентрациях кислорода в диапазоне от 2% до 8%, в российских клинических рекомендациях упоминается о

методах и условиях культивирования отсутствуют. Более поздние исследования показали, что низкие уровни кислорода (5%) во время культивирования эмбрионов способствуют увеличению числа митохондрий в бластомерах у мышей, а также развитию бластоцист и частоты наступления беременности у людей по сравнению с культурой, находящейся при более высокой (20%) концентрации кислорода [44, 45]. Высокая концентрация кислорода (20%) способна привести к окислительному стрессу, а эмбрионы особенно чувствительны к ОС на ранних стадиях развития, до активации собственного эмбрионального генома. Также было обнаружено, что уровни АФК в средах, культивируемых при 5%-ном содержании кислорода, ниже, чем при культивировании в атмосферных концентрациях (20%) [46]. В исследовании Kaser D. и соавт. [47] сообщалось, что эмбрионы, культивируемые при сверхнизких концентрациях кислорода (2%), с большей вероятностью развиваются в хорошие бластоцисты, чем соответствующие эмбрионы-сиблинги, культивируемые при 5% кислорода. С другой стороны, недавнее исследование показало, что снижение концентрации кислорода с 5% до 2% с 3-го дня и до 5-х суток не способствует увеличению частоты наступления беременности и прогрессированию ее до родов [48].

Некоторые исследователи, учитывая негативное влияние окислительного стресса в условиях *in vitro* и сниженные репаративные возможности эмбриона человека, изучали различные антиоксидантные добавки в культуральные среды, которые имитировали бы естественные биологические жидкости репродуктивного тракта женщины. В 2017 году Truong T. et al. оценили влияние комбинации из трех антиоксидантов (ацетил-L-карнитина, N-ацетил-L-цистеина и α -липоевой кислоты), присутствующих в культуральной среде, на развитие эмбрионов мышей [49]. Антиоксиданты оказывали положительное влияние на образование пронуклеосов в ооцитах мышей, оплодотворенных *in vitro*. Maside C. et al.

сообщили, что добавление коэнзима Q10 в различных дозировках не повлияло на улучшение развития эмбрионов свиней *in vitro*. Более того, самая высокая концентрация коэнзима Q10 (100 мкМ) в культуральной среде негативно влияла на частоту формирования бластоцист [50]. Клиническое использование антиоксидантов в культуральных средах эмбрионов человека при проведении программ ВРТ до сих пор ограничено. Kim M. et al. провели первое исследование, в котором участвовали эмбрионы не только мышей, но и отказные эмбрионы человека. Было показано, что L-карнитин снижал уровень активных форм кислорода и увеличивал выработку аденозинтрифосфата, что способствовало развитию эмбрионов более хорошего качества [51]. В исследовании было получено больше эмбрионов хорошего качества на 2, 3 и 5 день при добавлении L-карнитина в культуральные среды, чем в группе контроля. При использовании данного антиоксиданта в клинической практике в рамках подписанных информированных согласий пациентов, частота имплантации и частота наступления клинической беременности также были выше в группе с добавлением L-карнитина по сравнению с контролем [51].

В России в 2018 году Кириенко К.В. с коллегами провели исследование, в котором культивировали эмбрионы человека в средах с различным содержанием мелатонина [52]. Эмбрионы 1-й (контрольной) группы культивировали в среде без мелатонина. Эмбрионы 2-й, 3-й и 4-й групп культивировали в средах с различным содержанием мелатонина: 10^{-9} , 10^{-6} и 10^{-4} Моль. Оценивали частоту развития до 4-х и 8-клеточной стадии и бластоцисты на 6-й день культивирования. Выполняли оценку частоты наступления беременности после переноса эмбриона в полость матки в нативных циклах либо в криоцикле. Использование мелатонина в среде для культивирования *in vitro* эмбрионов человека в концентрации 10^{-4} позволяло улучшить эмбриональное развитие, а в концентрации 10^{-9} Моль — повысить частоту наступления клинической беременности при

переносе размороженного эмбриона. При этом мелатонин, находящийся в среде для культивирования эмбрионов в концентрациях 10^{-9} и 10^{-6} М, не оказывал статистически значимого влияния на развитие эмбрионов *in vitro* [52].

Несмотря на доказанную способность предимплантационных эмбрионов адаптироваться к неблагоприятным условиям окружающей среды, клеточный окислительный стресс может привести к постоянным и наследуемым эпигенетическим модификациям [53]. Было обнаружено, что хотя воздействие слабой кислоты на эмбрион мыши во время первого дробления не влияет на имплантацию, вес плода и длина тела уменьшаются в сравнении с эмбрионом, который не подвергся воздействию кислоты [54]. Также было показано, что у мышинных эмбрионов, культивируемых в субоптимальной культуральной среде при 20% кислорода, изменяется экспрессия генов, связанных с выработкой энергии, выживанием и развитием клеток [55]. Понятно, что на эмбрионах человека такие исследования провести невозможно, но даже на мышинной модели видно, что изменение кислотного баланса влияет на развитие особи. Именно поэтому следует избегать субоптимальных манипуляций с предимплантационными эмбрионами человека. Это может не только повлиять на жизнеспособность эмбриона, но и вызвать изменение экспрессии генов или эпигенетические модификации, которые повлияют на здоровье взрослых и здоровье будущих поколений [56]. А изучение параметров окислительного стресса в биологических жидкостях будущих родителей может способствовать правильной подготовке супружеских пар к программам лечения бесплодия методами ВРТ и приведет, в конечном итоге, к рождению здорового ребенка.

Таким образом, все вышесказанное позволяет утверждать, что окислительный стресс представляет собой реальную угрозу для половых клеток и эмбрионов *in vitro*, поскольку биологический материал извлечен из естественной среды и поэтому обладает сниженной защитной

функцией от АФК. Следовательно, окислительный стресс оказывает значительное влияние на результативность программ лечения бесплодия методами ВРТ. Причинами окислительного стресса могут быть как внешние, так и внутренние источники. Дисбаланс АФК и уровня ОС может приводить к снижению частоты оплодотворения, дробления эмбрионов, имплантации и родов. Именно поэтому научные исследования, посвященные роли окислительного стресса в процессах репродукции человека, оказываются крайне актуальными и своевременными, особенно при активном внедрении в клиническую практику новых методов оценки уровней свободных радикалов в биологических жидкостях репродуктивных тканей.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Диссертационная работа представляет собой проспективное исследование, проведенное на базе отделения вспомогательных репродуктивных технологий в лечении бесплодия имени профессора Б.В.Леонова (руководитель — профессор, д.м.н. Калинина Е.А.) института репродуктивной медицины (директор - профессор, д.м.н. Назаренко Т.А.) ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (директор — академик РАН, профессор, д.м.н. Сухих Г.Т.).

Лабораторная часть исследования проведена в лаборатории цитологии (заведующий — к.б.н. Красный А.М.) института трансляционной медицины (директор — д.б.н. Ребриков Д.В.) ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (директор — академик РАН, профессор, д.м.н. Сухих Г.Т.).

В работе обследовано 115 супружеских пар, обратившихся по поводу лечения бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий. Перед началом программы от каждой супружеской пары было получено письменное добровольное информированное согласие на участие в исследовании. Все пациенты прошли полное обследование перед проведением программы ВРТ, которое включало сбор анамнестических данных, клинико-лабораторные и функциональные методы исследования в соответствии с действующими клиническими рекомендациями «Женское бесплодие» (2021г.).

Настоящее исследование было одобрено на заседании комитета по биомедицинским исследованиям ФГБУ «НМИЦ АГП им. академика В.И. Кулакова» Минздрава России.

2.1. Дизайн исследования

Дизайн: проспективное исследование «случай-контроль». Было обследовано 115 пар с различными типами бесплодия, которые были разделены на следующие группы:

- Группа 1 — супружеские пары с женским фактором бесплодия (n=65).
- Группа 2 — супружеские пары с мужским фактором бесплодия (n=50).

Конечными точками являлись относительный риск наступления клинической беременности и относительный риск ранних репродуктивных потерь беременности (до 12 недель гестации) в зависимости от уровня окислительного стресса в биологических жидкостях в день оплодотворения.

Дизайн представлен на рисунке 1.



Рис.1. Дизайн исследования

2.2. Критерии включения и исключения

Критерии включения

- Отсутствие противопоказаний к лечению бесплодия методами ВРТ.
- Возраст пациенток от 18 до 38 лет.
- Нормальный овариальный резерв женщин согласно ультразвуковым и гормональным показателям.
- Женское бесплодие трубно-перитонеального происхождения.
- Бесплодие неясного генеза.
- Наружный генитальный эндометриоз I и II стадий распространения.
- Мужской фактор бесплодия без выраженной патозооспермии (оплодотворение сперматозоидами только из эякулята).
- Перенос одного нативного эмбриона в полость матки на 5 сутки культивирования.
- Оплодотворение ооцитов методом ИКСИ.
- Отсутствие преимплантационного генетического тестирования эмбрионов.
- Нормальные кариотипы супругов.
- Вспомогательный хетчинг в виде полного удаления зоны пеллюцида.
- Подписанное информированное добровольное согласие на участие в исследовании.

Критерии исключения

- Наличие противопоказаний к лечению бесплодия методами ВРТ.
- Снижение овариального резерва согласно ультразвуковым и гормональным параметрам.
- Отсутствие гамет в день оплодотворения.
- Тотальная остановка эмбрионов в развитии на эмбриологическом этапе программы ВРТ.
- Пороки развития органов репродуктивной системы мужчины и/или женщины.

- Нарушения кариотипа одного из супругов.
- Синдром поликистозных яичников, подтвержденный по Роттердамским критериям.
- Использование донорских половых клеток в программах ВРТ.
- Суррогатное материнство.
- Развитие клинического синдрома гиперстимуляции яичников с отменой переноса эмбриона в полость матки.
- Выраженный фактор мужского бесплодия с выделением сперматозоидов из ткани яичка.

2.3. Методы исследования

2.3.1. Общеклинические методы исследования

Все пациенты перед вступлением в программы лечения бесплодия методами ВРТ прошли как обязательные, так и специальные исследования (при наличии показаний) согласно действующим нормативно-правовым актам по ВРТ.

На первичном гинекологическом приеме у каждой пациентки был тщательно собран анамнез с учетом вредных привычек, особенностей питания, физической активности, наследственности, наличия соматической патологии, а также перенесенных заболеваний. Особое внимание при сборе анамнеза обращали на гинекологический и репродуктивный статусы, которые включали:

- возраст начала менструаций, их продолжительность, характер и регулярность;
- возраст начала половой жизни, количество половых партнеров, длительность половых отношений с настоящим партнером, частота половых актов и использование методов контрацепции;
- наличие данных о гинекологических заболеваниях (ИППП, хронический эндометрит, миома матки, аденомиоз, НГЭ, СПКЯ, полипы, наличие образований яичников);

- перенесенные оперативные вмешательства в связи с наличием гинекологических заболеваний (резекция яичников, миомэктомия, полипэктомия);
- количество беременностей, их исходы и осложнения;
- проведенные программы ВРТ в анамнезе (препараты для гонадотропной стимуляции яичников, количество дней стимуляции и число аспирированных зрелых ооцитов в день трансвагинальной пункции фолликулов, метод оплодотворения ооцитов, количество и качество перенесенных эмбрионов, исход программ ВРТ, а также количество криоконсервированных эмбрионов).

На этапе подготовки к вступлению в программу ВРТ всем женщинам проводили измерение длины и массы тела для произведения расчета индекса массы тела (ИМТ) по формуле Кетле: $ИМТ = \frac{\text{масса тела}}{\text{рост}^2}$ (кг/м²).

Обязательные исследования

- гинекологическое обследование;
- ультразвуковое исследование органов малого таза на 5–8-й день менструального цикла;
- гормоны крови (на 2-3 день менструального цикла): ЛГ, ФСГ, эстрадиол, ТТГ, Т3/Т4св, ДГА-С, пролактин, СТГ, кортизол, тестостерон, прогестерон;
- определение группы крови и резус-фактора;
- клинический анализ крови;
- гемостазиограмма;
- анализ крови на антитела к ВИЧ, HBsAg, анти-HCV, реакция Вассермана (оба супруга);
- исследование на флору цервикального канала и степень чистоты влагалища;
- цитологическое исследование мазков шейки матки;
- флюорография или рентген грудной клетки;

- ЭКГ;
- заключение терапевта о состоянии здоровья;
- спермограмма (для мужчин);

Исследования по показаниям

- оценка состояния матки и маточных труб (гистеросальпингография или гистеросальпингоскопия, лапароскопия);
- биопсия эндометрия;
- бактериологическое исследование материала из цервикального канала;
- цитологическое исследование мазков шейки матки;
- обследование на наличие антиспермальных и антифосфолипидных антител;
- исследование цервикального мазка на инфекции методом ПЦР: *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis u genitalium*, *Ureaplasma urealyticum*, *HSV*, *CMV*;
- анализ крови на IgG+IgM к *HSV*, *CMV*, *Toxoplasma gondii*, *Rubella*;
- медико-генетическое консультирование (по показаниям);

Специальные методы обследования супружеских пар в программах ВРТ в настоящем исследовании представлены в таблице 1.

Таблица 1. График обследования пациентов и оценка биологического материала в программах лечения бесплодия методами ВРТ (как обязательные, так и специальные методы)

Обследование	Перед вступлением в программу ВРТ	День проведения трансвагинальной пункции яичников	День переноса эмбриона	2 недели после переноса эмбриона	12 недель после переноса эмбриона
Обследование согласно клиническим рекомендациям «Женское бесплодие» (2021)	X				
Определение уровня АФК и антиоксидантной защиты в периферической крови		X			
Определение уровня АФК и антиоксидантной защиты в фолликулярной жидкости		X			
Определение уровня АФК и антиоксидантной защиты в нативном эякуляте		X			
Оценка качества ооцитов		X			
Оценка качества бластоцист			X		
Перенос эмбрионов			X		
ХГЧ				X	
УЗИ					X

Помимо тщательного сбора анамнеза всем пациенткам было проведено исследование гормонального профиля. Нормативные значения показаны в таблице 2.

Таблица 2. Нормативные показатели концентрации гормонов в плазме крови у женщин репродуктивного возраста

Показатели	Референсные значения
ФСГ, МЕ/л	2,0–10,0
ЛГ, МЕ/л	2,3–15,0
АМГ, нг/мл	1,2–10,6
Эстрадиол, пмоль/л	150,0–450,0
Пролактин, мМЕ/л	120,0–500,0
Кортизол, нмоль/л	200,0–550,0
Тестостерон, нмоль/л	0,5–2,5
ТТГ, мМЕ/л	0,4–3,5
Т4, пмоль/л	10,0–25,0
ДГЭА-С, мкмоль/сут	0,9–11,7
17-ОП, нмоль/л	0,3–3,0
СТГ, мМЕ/л	0,15–13,0
Прогестерон, нмоль/л (лютеиновая фаза цикла)	16,0–95,0

2.3.2. Ультразвуковое исследование органов малого таза

Перед проведением программы лечения бесплодия методами ВРТ всем пациенткам на 2–5-й день менструального цикла проводили ультразвуковое исследование (УЗИ) с целью исключения патологии со стороны органов малого таза и противопоказаний для начала овариальной стимуляции. Исследование выполняли при опорожненном мочевом пузыре с использованием одноразового презерватива для обеспечения стерильности. Во время УЗИ оценивали размеры тела матки, ее форму и положение, структуру миометрия, толщину и особенности эндометрия, выраженность фолликулярного аппарата, а также наличие/отсутствие объемных образований в малом тазу. При наличии рубца на матке после

операции кесарева сечения измеряли толщину рубца. Частота проведения ультразвукового мониторинга определялась лечащим врачом на основании выбранной схемы стимуляции функции яичников. Повторный ультразвуковой мониторинг после вступления в программу ВРТ проводился на 5–6-й день стимуляции функции яичников для определения даты начала введения препарата ант-ГнРГ и возможной коррекции дозы вводимого препарата, далее — один раз в 2–3 дня для контроля динамики роста фолликулов и эндометрия, а также решения вопроса о назначении триггера финального созревания ооцитов.

2.3.3. Анализ нативного эякулята и подготовка сперматозоидов к оплодотворению в программах ВРТ

Анализ эякулята проводили у мужчин дважды: на предварительном этапе при подготовке к программе ВРТ и в день трансвагинальной пункции яичников и оплодотворения. Перед сдачей эякулята мужчинам необходимо было придерживаться рекомендаций: половое воздержание от 2 до 7 дней (оптимально 3–4 дня). В этот период им нельзя было принимать алкоголь, лекарственные препараты, посещать баню или сауну, переохлаждаться. Сбор биоматериала производился путем мастурбации, сперму собирали в специальный стерильный контейнер. Оценку качества спермы выполняли согласно рекомендациям ВОЗ (2010 г.). Определяли концентрацию, подвижность и морфологию сперматозоидов согласно критериям Крюгера. Нормальными значениями считали показатели, представленные в таблице 3.

После разжижения эякулята проводили его центрифугирование в градиенте плотностей в культуральных средах СООК (Ирландия) согласно инструкциям производителя с последующим всплытием сперматозоидов в буферном растворе СООК, содержащем NEPES. До момента оплодотворения подготовленные сперматозоиды всех пациентов держали не более 1 часа при комнатной температуре (24°C).

Таблица 3. **Нормативные значения показателей спермограммы (ВОЗ, 2010)**

Показатель	Норматив, единицы измерения
Общий объем эякулята	$\geq 1,5$ мл
pH	$\geq 7,2$
Концентрация сперматозоидов в 1 мл эякулята	≥ 15 млн/мл
Общее количество сперматозоидов	≥ 39 млн
Подвижность сперматозоидов Общая подвижность (A+B)	$\geq 40\%$
Сперматозоиды с прогрессивным движением (A)	$\geq 32\%$
Морфология	$\geq 4\%$ нормальных форм
Жизнеспособность сперматозоидов	$\geq 58\%$ живых сперматозоидов
Концентрация лейкоцитов	< 1 млн/мл

2.3.4. Стимуляция функции яичников в программах ВРТ

Овариальная стимуляция проводилась по протоколу с препаратами ант-ГнРГ. Введение гонадотропинов начинали на 2–5-й день менструального цикла. Начальную дозу гонадотропинов рассчитывали в зависимости от возраста и овариального резерва женщины по данным гормонального профиля и результатов ультразвукового исследования органов малого таза. На протяжении всей стимуляции пациентке выполняли фолликулометрию, в зависимости от динамики роста фолликулов (при необходимости) корректировали дозу вводимых препаратов. При достижении лидирующим фолликулом диаметра 14 мм с целью предотвращения преждевременного выброса ЛГ и овуляции до

момента проведения ТВП назначали препарат ант-ГнРГ в дозе 0,25мг/сут. При достижении 3-х и более фолликулов размеров ≥ 17 мм для финального дозревания ооцитов вводили триггер овуляции — препарат человеческого хорионического гонадотропина (ХГЧ) в дозе 10 000 МЕ. Трансвагинальная пункция яичников выполнялась через 35–36 часов после введения триггера овуляции под внутривенной анестезией и ультразвуковым контролем с подписанием информированного добровольного согласия на медицинскую процедуру в присутствии врача-анестезиолога.

2.3.5. Эмбриологический этап программ ВРТ: оценка ооцитов и эмбрионов

Оценка полученных ооцитов эмбриологами проводилась сразу после аспирации фолликулярной жидкости во время трансвагинальной пункции яичников. Ооцит-кумулясные комплексы тщательно отмывали от примеси крови и помещали до момента оплодотворения в культуральную среду (G-TL, VitroLife, Швеция), предварительно выдержанную в CO₂-инкубаторе при 5% кислорода и 6% углекислого газа в течение 12 часов под культуральным маслом (Irvine Sc., США). Оплодотворение всем пациенткам проводили методом интрацитоплазматической инъекции сперматозоида в ооцит (ИКСИ) в средах Irvine Sc. согласно инструкции производителя. Был осуществлен подбор пациентов таким образом, что ИКСИ было проведено даже при трубно-перитонеальном факторе бесплодия, поскольку пациенты настаивали на данном методе оплодотворения, ссылаясь на неудовлетворительный эмбриологический этап предыдущих программ ВРТ. Культивирование эмбрионов выполняли до 5-х суток в средах G-TL (VitroLife, Швеция) в настольных инкубаторах COOK (Ирландия) при пониженном содержании кислорода (5% O₂). Оценку оплодотворения выполняли через 14–16 часов после инъекции. В случае отсутствия двух пронуклеусов оплодотворение считали несостоявшимся. На 5-е сутки в

день переноса эмбриона оценивали морфологию эмбриона согласно критериям, рекомендованным РАРЧ (2021). Полученные бластоцисты для дальнейшей оценки и анализа особенностей эмбриологического этапа разделили на группы по морфологическим критериям, которые указаны в таблице 4.

Таблица 4. Классификация эмбрионов по морфологическим характеристикам

Эмбрионы	Качество
Отличные	Больше, чем 3АА
Хорошие	3-6 АВ, 3-6 ВА, 1-2 АА
Средние	3-6 ВВ, 3-6 АС, 3-6 СА, 1-2 АВ, 1-2 ВА
Плохие	1-6 ВС, 1-6 СВ, 1-6 СС, 1-2 ВВ

2.3.6. Перенос эмбриона в полость матки

Всем пациенткам был проведен перенос одного эмбриона в полость матки на 5-е сутки культивирования с помощью мягкого катетера Wallace (США) или СООК (Ирландия) под ультразвуковым контролем. Оставшиеся эмбрионы хорошего и отличного качества были криоконсервированы для дальнейшего использования в криопротоколе при отрицательном результате в данной программе ВРТ. Поддержка лютеиновой фазы и посттрансферного периода у всех женщин проводилась препаратами прогестерона. На 14-й день после переноса эмбриона пациентки сдавали кровь на содержание бета-субъединицы хорионического гонадотропина человека (β -ХГЧ) для диагностики беременности. Результаты течения беременности узнавали путем телефонного звонка в предполагаемую дату 12 недель развития плода.

2.4. Специальные методы исследования

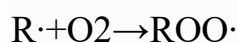
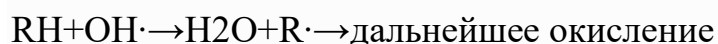
2.4.1. Сбор биологических жидкостей для оценки оксидативного стресса и общей антиоксидантной защиты

Оценку окислительного стресса и уровня АФК в периферической крови, фолликулярной жидкости и эякуляте выполняли с помощью анализатора FORM 3000 (с наборами FORD и FORT) в день оплодотворения (трансвагинальной пункции фолликулов). Анализатор FORM 3000 был разработан для проведения децентрализованных персональных анализов по принципу point-of-care testing (POCT) или тестирование рядом с пациентом. Потенциальные преимущества POCT включают более раннюю и более точную диагностику, меньшее количество тестов, более раннее лечение и сокращение или устранение ненужного лечения. Результатом анализа является получение оценки уровня окислительного стресса (ОС). Прибор FORM 3000 оценивает комбинацию биомаркеров ОС, то есть показателей окислительного повреждения и антиоксидантного профиля, обеспечивая оценку оксидантно-антиоксидантного баланса организма, что позволяет определять лечебную стратегию и пищевые потребности пациентов. Для этого используются тесты для определения свободных кислородных радикалов (free oxygen radicals testing, FORT) и защиты от свободных кислородных радикалов (free oxygen radicals defence, FORD). Вся полученная фолликулярная жидкость пулировалась от одной пациентки от всех спунктированных фолликулов. Выделения в фолликулярной жидкости отдельных ооцитов не проводили. Кровь собирали в пробирки, содержащие гепарин натрия. Для анализа FORT и FORD использовали объем крови 20 мкл и 50 мкл, соответственно, объем фолликулярной жидкости был 10 мкл и 400 мкл соответственно. Результаты представлены в виде выходных данных прибора FORM 3000 без корректировки. При последующем анализе данных учитывали степень разведения.

2.4.2. Методы определения уровня окислительного стресса и активных форм кислорода в биологических жидкостях пациентов с бесплодием

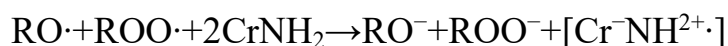
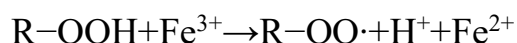
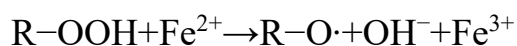
FORT

Определение свободных кислородных радикалов (FORT) — это колориметрический тест, основанный на свойствах производного амина, используемого в качестве хромогена, ChNH₂ (4-амино-N-этил-N-изопропиланилина гидрохлорида) образовывать довольно долгоживущий катион-радикал. При добавлении образца к раствору ChNH₂ образуется окрашенный катион-радикал хромогена, а поглощение при 505 нм, пропорциональное концентрации молекул гидропероксида, связано с окислительным статусом образца. Тест FORT основан на реакции Фентона, представленной ниже:



Двухвалентное железо (Fe^{2+}) инициирует и катализирует разложение H_2O_2 , что приводит к образованию гидроксильных радикалов ($\text{OH}\cdot$). Гидроксильные радикалы могут окислять органические соединения (RH) за счет отщепления протонов с образованием органических радикалов ($\text{R}\cdot$), которые обладают высокой реакционной способностью и могут подвергаться дальнейшему окислению, инициируя радикально-цепное окисление. Во время реакции FORT все органические радикалы, присутствующие в образце, улавливаются хромогеном FORT и измеряются фотометрически. Также органические гидропероксиды (ROOH) учитываются в условиях теста FORT. ROOH являются достаточно стабильными молекулами в физиологических условиях, но их разложение катализируют и Fe^{2+} , и Fe^{3+} в соответствии с реакцией Фентона. После образования пропорциональных количеств алкокси- ($\text{RO}\cdot$) и перокси- ($\text{ROO}\cdot$) радикалов они улавливаются подходящим

буферным хромогеном FORT и образуют в ходе линейной кинетической реакции при 37°C окрашенный, довольно долгоживущий катион-радикал, обнаруживаемый фотометрически. Интенсивность окраски прямо коррелирует с количеством радикальных соединений в соответствии с законом Ламберта-Бера и может быть связана с окислительным статусом образца.



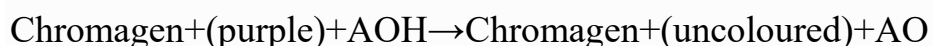
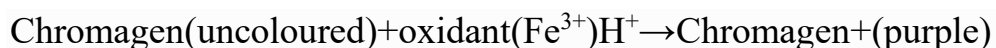
Принимая во внимание химическую неоднородность вторичных радикалов, возникающих в результате железозависимого распада ROOH во время теста FORT, показания абсорбции были связаны с концентрацией перекиси водорода (H₂O₂). Эталонная кривая и сохранена в приборе FORM3000, который автоматически выполняет расчет эквивалентных концентраций H₂O₂. Чтобы определить специальную единицу измерения для теста FORT, были определены обычные единицы, называемые единицами FORT. Одна единица FORT соответствует примерно 7,6 ммоль/л H₂O₂ (эквивалентно 0,26 мг/л). Преобразования выполняются автоматически, так что результаты выражаются как в эквиваленте концентрации H₂O₂, так и в единицах FORT. Это упрощает интерпретацию значений для любых операторов, включая обычных пользователей.

FORD

Защита от свободных кислородных радикалов (FORD) — это колориметрический тест, основанный на способности антиоксидантов, присутствующих в плазме, восстанавливать предварительно образованный катион-радикал. Принцип анализа заключается в том, что при кислом pH (5,2) и в присутствии подходящего раствора окислителя (FeCl₃) 4-амино-N, N-диэтиланилин, хромоген FORD, может образовывать стабильный и окрашенный катион-радикал. Молекулы антиоксидантов

(АОН) восстанавливают катион-радикал хромогена FORD, подавляя окраску и вызывая обесцвечивание раствора, пропорциональное их концентрации в образце.

Предварительные эксперименты показали, что выбор раствора окислителя и соотношение концентраций хромогенного вещества и окислителя имеют существенное значение для эффективности метода.



Результаты FORD выражали эквивалентами тролокса (ммоль/л) с использованием калибровочной кривой, построенной на основе различных количеств стандартного тролокса, хранящегося в приборе FORM300.

2.5. Статистическая обработка данных

Для статистического анализа полученных данных использовали программы SPSS Statistics 22 и Microsoft Excel 15.0. с соответствующими лицензиями.

Выборка была проверена на нормальность с помощью критерия Шапиро-Уилка, для характеристики параметров с нормальным распределением (уровень АФК в крови, рост, уровень общей антиоксидантной способности в крови) использовались показатели среднего и стандартного отклонения (M(SD)), для остальных — перцентили (25%, 75%).

Для оценки параметрических данных были рассчитаны средние значения и стандартные отклонения с 95% доверительным интервалом (ДИ). Для оценки непараметрических данных (данных с распределением, отличным от нормального) рассчитывали медиану (Me) с интерквартильными размахами (25%, 75%). Для сравнения средних значений параметров с нормальным распределением в двух независимых группах использовали t-критерий Стьюдента, для параметров с ненормальным распределением — критерий Манна-Уитни. Для оценки

наличия связей между основными клиническими и эмбриологическими показателями программ ВРТ была рассчитана корреляция Спирмена (R_s) для показателей с нормальным распределением, корреляция Пирсона (R_p) для параметров с ненормальным распределением. При интерпретации результатов статистического анализа уровень значимости $p\text{-value}=0,05$ был принят как критический.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ОЦЕНКИ МАРКЕРОВ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА У ЖЕНЩИН В ПРОГНОЗИРОВАНИИ ИСХОДОВ ЛЕЧЕНИЯ БЕСПЛОДИЯ МЕТОДАМИ ВРТ

3.1. Клинико-anamнестические данные супружеских пар, включенных в исследование

Для достижения поставленной цели и задач в проспективное исследование были включены 65 пациенток в возрасте 18–38 лет с сохраненным овариальным резервом по данным гормонального профиля (АМГ > 1,2 нг/мл) и ультразвукового исследования, обратившихся для лечения бесплодия методами ВРТ. Изначально в исследование было включено 77 супружеских пар, однако только у 65 удалось полностью собрать анамнез, связанный с исходами программ ВРТ, а также оценить уровень оксидативного стресса в биологических жидкостях. Все 65 женщин имели не более 3-х неудачных попыток переноса эмбриона в полость матки.

Для характеристики всей выборки исследования была посчитана описательная статистика. У всех пациенток был выявлен женский тип телосложения с правильным расположением и строением вторичных половых признаков. Средний возраст составил $32,0 \pm 3,7$ года, только 1 пациентка была позднего репродуктивного возраста, 38 лет. Рост женщин составил $165,0 \pm 5,5$ см, вес $59,0 \pm 10,1$, ИМТ = $21,9 \pm 3,4$. У 50 пациенток (76,9%) ИМТ находился в нормальном диапазоне от 18 до 25 кг/м (медиана $21,4 \pm 2,0$), избыточная масса тела отмечена у 12 (18,5%), медиана $28,9 \pm 2,0$, у 3 женщин — недостаток массы тела, $17,8 \pm 0,1$.

Клинико-anamнестические характеристики пациенток, включенных в настоящее исследование, показаны в таблице 2. Особенности гормонального и менструального профилей указаны в таблице 3.

Таблица 2. Клинико-anamнестические параметры участников исследования

Параметр	n=65	
Возраст, лет*	32,0 [30; 35]	
Рост, см*	165,0 [161; 168,5]	
Вес, кг*	59,0 [55; 66,5]	
ИМТ, кг/м ² *	21,9 [20,2; 24,6]	
Тип бесплодия	I-58,4% (n=38)	II-41,6% (n=27)
Попытка	2 [1; 3]	
Курение более ½ пачки в день	7 (10,7%)	13 женщин (20%)
Курение менее ½ пачки в день	6 (9,2%)	
Алкоголь более 1 раза в неделю	10 (15,3%)	
Причина бесплодия		
Трубно-перитонеальный фактор бесплодия	51 (78,4%)	
НГЭ	9 (13,8%)	
Миома матки	2 (3%)	
Бесплодие неясного генеза	3 (4,6%)	
Фактор мужского бесплодия (тератозооспермия)**	40 (61,5%)	

Примечание: абс (%), критерий Мак-Немара; * Me[Q25-Q75]

**Фактор мужского бесплодия (тератозооспермия) у выбранной когорты супружеских пар (65 пар) всегда сочетался с выраженным женским фактором бесплодия, который считали основным диагнозом, причиной отсутствия беременности.

Таблица 3. Характеристики овариального резерва и менструальной функции женщин, включенных в исследование

Параметр	n=65
Длительность менструального цикла, дней	28 [26; 28]
Продолжительность менструации, дней	5 [4; 6]
АМГ	2,9 [1,5; 6,05]
ФСГ	6,0 [4,85; 7,5]

Примечание: Me [Q25-Q75]

Таким образом, включенные в исследование женщины соответствовали обозначенным критериям включения/исключения,

большинство без вредных привычек, распространенность фактора мужского бесплодия — 61,5%, трубно-перитонеального фактора — 78,4%. Женщины были преимущественно молодого репродуктивного возраста с нормальным овариальным резервом. Длительность стимуляции овуляции у отобранных пациенток составила 9 дней [8; 9], суммарная доза гонадотропинов — 1350 МЕ [1200; 1500]. Показатели эмбриологического этапа показаны в таблице 4.

Таблица 4. Эмбриологические показатели программ лечения бесплодия у супружеских пар в исследовании

Параметр	n=65
Суммарная доза гонадотропинов, МЕ	1 350 [1 200; 1 500]
Количество ооцит-кумулюсных комплексов	9 [6; 11]
Кол-во зрелых ооцитов, МП	7 [5; 9]
% получения зрелых ооцитов (МП/n_ооцитов)	81,8 [71,6; 96,4]
Общая концентрация сперматозоидов в 1 мл в день ТВП	62,5 [37, 84]
% прогрессивно подвижных сперматозоидов	49 [40; 58]
% морфологически нормальных сперматозоидов	2 [2; 3]
Количество зигот (2PN2PB)	6 [4; 8]
% оплодотворения (2PN2PB)	100 [78,8; 100]
Количество бластоцист отличного качества на 5-е сутки культивирования	1 [0; 2]
Количество криоконсервированных эмбрионов	1 [0; 3]

Примечание: Ме [Q25-Q75]

Всем пациенткам оплодотворение проводили методом ИКСИ, в полость матки был перенесен один эмбрион отличного или хорошего качества. В представленной выборке отсутствовали супружеские пары с фактором мужского бесплодия, ассоциированные с получением сперматозоидов хирургическим методом и выраженной патозооспермией (100% тератозооспермия, олигозооспермия, астенозооспермия менее

35%). У 25 супружеских пар на перенос был только 1 эмбрион, остальные остановились в развитии, что составило 38,4% — криоконсервацию blastocyst не осуществляли. Как видно из таблицы 4, супружеские пары были сопоставимы и по эмбриологическим показателям программы лечения бесплодия методами ВРТ.

В день трансвагинальной пункции у женщин проводили забор периферической крови и фолликулярной жидкости, которые незамедлительно передавали в лабораторию для оценки параметров окислительного стресса. Для выявления связей между основными клиническими и эмбриологическими показателями программ ВРТ и понимания прогностической значимости выделенных критериев была рассчитана корреляция Спирмена. В таблице 5 представлены коэффициенты корреляции Спирмена (R_s) и уровень значимости (p-value) основных клинических и эмбриологических показателей программ ВРТ и уровней активных форм кислорода в периферической крови и фолликулярной жидкости. Значимые корреляции отмечены звездочкой (*).

В таблице 6 представлены коэффициенты корреляции Спирмена (R_s), уровень значимости (p-value) основных клинических и эмбриологических показателей программ ВРТ и общей антиоксидантной способности в периферической крови и фолликулярной жидкости. Значимые корреляции отмечены звездочкой (*).

Была обнаружена значимая положительная корреляционная связь между показателями АФК в крови и АФК в фолликулярной жидкости ($R_s=0,503$; $p<0,001$), а также между показателями ОАС в крови и ОАС в фолликулярной жидкости ($R_s=0,62$; $p<0,001$). Таким образом, можно говорить о том, что уровень АФК в крови может быть использован как критерий оценки уровня АФК в ФЖ на этапе подготовки к программе ВРТ.

Таблица 5. Корреляции Спирмена основных клинических и эмбриологических показателей программ ВРТ и уровней активных форм кислорода в крови и фолликулярной жидкости

	Уровень активных форм кислорода в крови – R_s (p-value)	Уровень активных форм кислорода в фолликулярной жидкости – R_s (p-value)
ОАС в крови	1 (-)	0,62 (p < 0,001)*
ОАС в фолликулярной жидкости	0,62 (p < 0,001)*	1 (-)
Возраст	-0,155 (0,184)	0,083 (0,480)
Рост	0,032 (0,782)	-0,044 (0,709)
Вес	0,192 (0,099)	0,185 (0,111)
ИМТ	0,188 (0,107)	0,238 (0,039)*
АМГ	0,079 (0,499)	-0,126 (0,281)
ФСГ	-0,052 (0,662)	0,030 (0,803)
Кол-во дней стимуляции	0,293 (0,011)*	-0,069 (0,557)
Кол-во ооцитов	-0,133 (0,256)	-0,088 (0,452)
Кол-во зрелых ооцитов	-0,025 (0,833)	-0,133 (0,254)
Кол-во незрелых ооцитов	-0,129 (0,272)	-0,047 (0,688)
% зрелости ооцитов	0,162 (0,164)	-0,064 (0,582)
Кол-во зигот	0,048 (0,685)	-0,091 (0,439)
% оплодотворения	0,057 (0,630)	0,001 (0,992)
Кол-во эмбрионов отличного качества (5 день)	0,082 (0,483)	-0,055 (0,641)
Кол-во эмбрионов хорошего качества (5 день)	0,177 (0,130)	0,183 (0,116)
Кол-во эмбрионов удовлетворительного качества (5 день)	-0,094 (0,423)	-0,057 (0,628)
Кол-во эмбрионов неудовлетворительного качества (5 день)	0,064 (0,584)	-0,061 (0,603)
Кол-во морул (5 день)	-0,197 (0,090)	-0,085 (0,467)
Кол-во эмбрионов отличного качества (6 день)	0,150 (0,198)	0,081 (0,492)
Кол-во эмбрионов хорошего качества (6 день)	-0,103 (0,380)	0,007 (0,953)
Кол-во эмбрионов удовлетворительного качества (6 день)	-0,136 (0,245)	-0,173 (0,138)
Кол-во эмбрионов неудовлетворительного качества (6 день)	-0,079 (0,502)	-0,196 (0,093)

Таблица 6. Корреляции Спирмена основных клинических и эмбриологических показателей программ ВРТ и общей антиоксидантной способности в крови и фолликулярной жидкости

	ОАС в крови – R_s (p-value)	ОАС в фолликулярной жидкости – R_s (p- value)
Возраст	0,091 (0,563)	0,228 (0,141)
Рост	-0,124 (0,427)	-0,054 (0,732)
Вес	-0,064 (0,685)	0,012 (0,940)
ИМТ	0,032 (0,837)	0,091 (0,560)
АМГ	0,120 (0,445)	-0,043 (0,782)
ФСГ	0,202 (0,201)	0,071 (0,656)
Кол-во дней стимуляции	0,136 (0,385)	0,043 (0,786)
Кол-во ооцитов	0,094 (0,549)	-0,022 (0,888)
Кол-во зрелых ооцитов	0,133 (0,396)	0,011 (0,943)
Кол-во незрелых ооцитов	-0,029 (0,852)	-0,139 (0,373)
% зрелости ооцитов	-0,021 (0,892)	-0,027 (0,865)
Кол-во зигот	0,183 (0,240)	0,040 (0,797)
% оплодотворения	0,248 (0,109)	0,209 (0,178)
Кол-во эмбрионов отличного качества (5 день)	0,189 (0,225)	0,184 (0,238)
Кол-во эмбрионов хорошего качества (5 день)	0,190 (0,223)	0,179 (0,252)
Кол-во эмбрионов удовлетворительного качества (5 день)	0,029 (0,852)	0,063 (0,688)
Кол-во эмбрионов неудовлетворительного качества (5 день)	0,074 (0,636)	-0,116 (0,458)
Кол-во морул (5 день)	-0,007 (0,965)	0,139 (0,375)
Кол-во эмбрионов хорошего качества (6 день)	-0,091 (0,563)	0,088 (0,576)
Кол-во эмбрионов удовлетворительного качества (6 день)	-0,163 (0,297)	0,144 (0,356)
Кол-во эмбрионов неудовлетворительного качества (6 день)	0,069 (0,660)	0,103 (0,510)

Также по данным корреляционного анализа была выявлена положительная корреляционная связь между уровнем АФК в крови, количеством дней стимуляции ($R_s=0,293$; $p=0,011$) и уровнем АФК в фолликулярной жидкости и ИМТ ($R_s=0,238$; $p=0,039$). Значимых корреляций между показателями ОАС в крови и фолликулярной жидкости с основными клиническими и эмбриологическими показателями программ ВРТ выявлено не было.

Для выявления различий в значениях основных клинических и эмбриологических показателей все пациентки были разбиты на группы в зависимости от наличия трубно-перитонеального фактора (ТПФ, $n=38$) и без такового ($n=27$). Группа 13 женщин с ТПФ была перенесена в группу 27 пациенток без ТПФ, поскольку фактор мужского бесплодия был более выражен (абсолютная тератозооспермия) как причина отсутствия беременности и фактор влияния на эмбриологические показатели. ТПФ был выбран на основании литературных данных, в которых имеются сведения о влиянии именно этого фактора бесплодия на уровень окислительного стресса в биологических жидкостях. Описательная статистика клинико-anamнестических и эмбриологических данных двух выделенных групп показана в таблице 7. Из нее видно, что по выделенным параметрам супружеские пары были сопоставимы между собой.

Для построения математической модели прогнозирования исходов программ лечения бесплодия методами ВРТ был выполнена сбор периферической крови и фолликулярной жидкости у женщин, проведена оценка статуса окислительного стресса методами FORD и FORT. Результаты представлены в таблице 8. К сожалению, по техническим причинам, связанным с работой оборудования, не всем женщинам удалось оценить уровень ОАС в крови (ммоль/л эквивалент тролокса). Суммарно был проведен анализ 21 пациентке с ТПФ и 16 — без такового (таблица 8).

Таблица 7. Описательная статистика участников исследования

Параметры	Трубно-перитонеальный фактор (ТПФ)				P-value
	Наличие ТПФ (n=38)		Отсутствие ТПФ (n=27)		
Рост, см, mean (SD)	164,26 (5,68)		165,89 (5,12)		0,24
	Me [IQR]	min-max	Me [IQR]	min-max	
Возраст, лет	33 [31; 35]	21-38	31 [28,0; 33,5]	21-37	0,016
ИМТ	22,3 [21,1; 25,7]	17,7- 32,3	21,5 [20,1; 23,5]	18,0- 29,8	0,48
АМГ, нг/мл	2,87 [1,52; 6,90]	1,06- 11,45	2,7 [1,40; 3,83]	0,50- 16,03	0,36
ФСГ, мМЕ/мл	5,94 [4,90; 7,60]	1,53- 13,80	6,12 [4,60; 7,50]	3,10- 28,90	0,81
Кол-во дней стимуляции	9 [8; 10]	5-12	8 [8; 9]	7-13	0,35
Кол-во ооцитов	8 [6; 11]	3-20	8 [5; 11]	4-20	0,95
% оплодотворенных ооцитов (2PN2PB)	100 [80; 100]	50- 100	100 [73,21; 100,00]	25-100	0,61
% бластуляции (число всех бластоцист/число зигот 2PN2PB)	34,85 [25; 60]	0-100	44,44 [14,29; 64,58]	0-100	0,87
% бластоцист хорошего и отличного качества	28,57 [10; 42,86]	0-100	25 [13,39; 52,78]	0-100	0,97

Как видно из представленных данных, в периферической крови уровень общей антиоксидантной защиты статистически значимо выше в группе женщин без трубно-перитонеального фактора. Необходимо отметить, что в настоящее исследование были включены пациентки только с удаленными маточными трубами (перенесенная эктопическая беременность).

Таблица 8. Оценка параметров окислительного стресса в биологических жидкостях обследуемых пациенток

Параметры	Трубно-перитонеальный фактор (ТПФ)				P-value
	Наличие ТПФ (n=38)		Отсутствие ТПФ (n=27)		
Уровень АФК в крови, ммоль/л, mean (SD)	2,93 (0,94)		3,02 (0,71)		0,71
	Me [IQR]	min-max	Me [IQR]	min-max	
Уровень ОАС в фолликулярной жидкости, ммоль/л экв. тролокса	1,30 [1,18; 1,38]	0,90-1,87	1,02 [0,90; 1,71]	0,54-1,97	0,13
Уровень АФК в фолликулярной жидкости, ммоль/л	1,92 [1,63; 2,27]	1,21-3,76	2,07 [1,57; 2,27]	1,26-2,71	0,89
	Наличие ТПФ (n=21)		Отсутствие ТПФ (n=16)		
Уровень ОАС в крови, ммоль/л экв. тролокса, mean (SD)	1,38 (0,38)		1,06 (0,34)		0,013

Результаты могут указывать на особенности функционирования окислительно-восстановительной системы клеток фаллопиевых труб: именно при сниженной работе антиоксидантной системы внутри маточных труб чаще наблюдают эктопические беременности. По уровню АФК в венозной крови пациентки с ТПФ и без такового не различались.

3.2. Окислительный стресс и уровень АФК в фолликулярной жидкости/крови женщин с бесплодием как фактор прогнозирования исходов программ ВРТ

Выбранная когорта пациенток была разделена на две группы по исходам программ лечения бесплодия с расчетом средних показателей окислительного стресса в фолликулярной жидкости и периферической крови. На данном этапе работы была предпринята попытка формирования модели прогнозирования эффективности ВРТ. Группу с клинически подтвержденной беременностью составили 27 женщин, с отсутствием беременности — 38 пар. Результаты оценки с уровнем достоверности показаны в таблице 9.

Статистически значимые отличия ($p=0,024$) были обнаружены при сравнении средних показателей уровня АФК в фолликулярной жидкости в группах пациенток с наступившей и не наступившей беременностью. Среднее значение АФК в фолликулярной жидкости в группе пациенток с развивающейся беременностью в 12 нед также значимо выше ($p=0,039$). Были обнаружены статистические тенденции ($0,1 > p\text{-value} > 0,05$) к различию средних значений АФК в периферической крови у пациенток с успешно развивающейся и прервавшейся до 12 недель беременностью ($p=0,064$).

Высокий уровень АФК у пациенток, у которых наступила беременность и прогрессировала до 12 недель гестации, может говорить о высоких компенсаторных возможностях организма и удовлетворительном функционировании системы антиоксидантной защиты.

Поскольку полученные результаты сравнения средних значений ОАС и АФК в периферической крови и фолликулярной жидкости не совпадают, средние значения этих показателей в крови и фолликулярной жидкости сравнили между собой с использованием t-критерия Стьюдента для зависимых выборок. Результаты представлены в таблице 10.

Таблица 9. Сравнение средних значений АФК и ОАС в периферической крови и фолликулярной жидкости по группам пациенток

	Беременность наступила (n=27)	Беременность не наступила (n=38)	p-value
АФК в крови, М (SD)	3,19 (0,88)	2,80 (0,86)	0,084
АФК в фолликулярной жидкости, Ме [IQR]	2,20 [1,93;2,34]	1,78 [1,73;2,00]	0,024
	Беременность наступила (n=12)	Беременность не наступила (n=25)	p-value
ОАС в крови, М(SD)	1,20 (0,38)	1,26 (0,40)	0,630
ОАС в фолликулярной жидкости, Ме [IQR]	1,04 [0,91;1,39]	1,29 [1,18;1,45]	0,249
	Прогрессирующая беременность в 12 недель(n=22)	Прерывание беременности в 12 недель (n=43)	p-value
АФК в крови, М(SD)	3,24 (0,80)	2,82 (0,90)	0,064
АФК в фолликулярной жидкости, Ме [IQR]	2,21 [1,93; 2,40]	1,80 [1,76; 2,02]	0,039
	Прогрессирующая беременность в 12 недель (n=10)	Прерывание беременности в 12 недель (n=27)	p-value
ОАС в крови, М(SD)	1,16 (0,40)	1,27 (0,39)	0,432
ОАС в фолликулярной жидкости, Ме [IQR]	1,04 [0,88; 1,30]	1,29 [1,18; 1,46]	0,176

Таблица 10. Сравнение средних значений АФК и ОАС в периферической крови и фолликулярной жидкости

	Показатель в крови (n=43)	Показатель в фолликулярной жидкости (n=43)	Т-критерий Стьюдента (p-value)
АФК, М (SD)	3,0 (0,88)	1,97 (0,48)	11,171 (p < 0,001)
ОАС, М (SD)	1,27 (0,4)	1,28 (0,36)	-0,293 (0,771)

Значимые отличия получили только для показателя АФК (Т=11,171, p<0,001), то есть определение уровня активных форм кислорода в крови пациенток не может заменить определение этого показателя в фолликулярной жидкости.

Аналогично было проведено сравнение средних значений АФК и ОАС в крови и сравнение средних значений АФК и ОАС в фолликулярной жидкости с использованием t-критерия Стьюдента для зависимых выборок. Результаты представлены в таблице 11.

Таблица 11. Сравнение средних значений АФК и ОАС

	АФК (n=43)	ОАС (n=43)	Т-критерий Стьюдента (p-value)
Показатель в периферической крови, М (SD)	3,0 (0,1)	1,27 (0,4)	10,739 (p<0,001)
Показатель в фолликулярной жидкости, М (SD)	2,0 (0,54)	1,28 (0,36)	7,470 (p<0,001)

Из таблицы 11 видно, что есть значимые различия между показателями, соответственно, показатели уровня активных форм

кислорода и общей антиоксидантной способности, не являются взаимозаменяемыми.

В результате анализа ряда факторов (АФК-кровь, АФК-фж, ОАС-кровь, ОАС-фж, возраст Ж, рост, вес, уровень АМГ, уровень ФСГ) для оценки информативности маркеров и вероятности наступления беременности методом бинарной логистической регрессии была разработана прогностическая модель, описываемая уравнением (1):

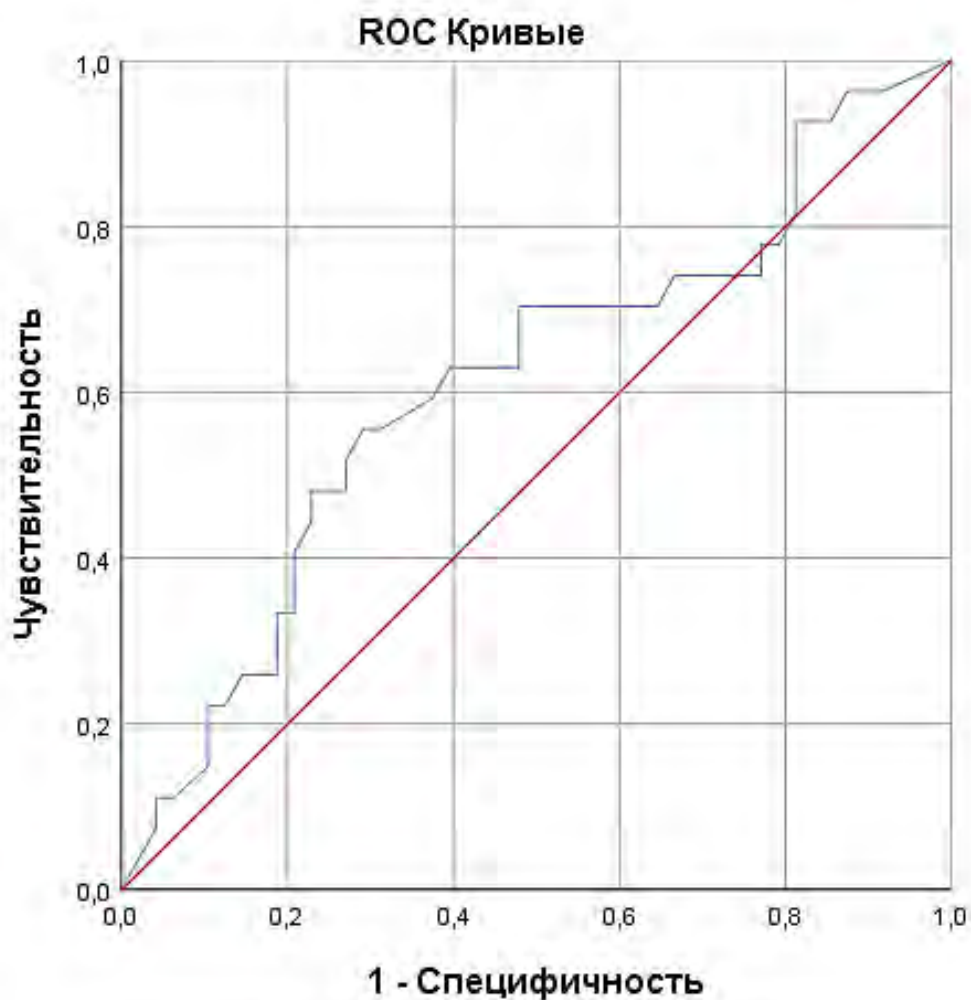
$$P = 1 / (1 + e^{-z}) * 100\%$$

$$z = -4,3 + 1,0 * \text{ХАФК-кровь} \quad (1)$$

где P – вероятность наступления исхода (%), ХАФК-кровь – уровень АФК в крови (усл.ед).

Полученная регрессионная модель является статистически значимой ($p=0,009$). Исходя из значения коэффициента детерминации Найджелкерка, модель (1) учитывает 21,8% факторов, определяющих дисперсию вероятности наступления исхода. Исходя из значений регрессионных коэффициентов, АФК в крови имел прямую связь с вероятностью наступления исхода. Увеличение АФК в крови на 1 единицу увеличивает шансы положительного исхода в 2,8 раза (95% ДИ: 1,18-6,82). Пороговое значение логистической функции P было определено с помощью метода анализа ROC-кривых. Полученная кривая представлена на рисунке 2.

Площадь под ROC-кривой составила $0,61 \pm 0,07$ (95% ДИ: 0,48-0,75). Значение логистической функции (1) в точке *cut-off* составило 20,67%. При значениях $P > 20,67\%$ определяется высокая вероятность исхода, а при значениях $P < 20,67\%$ — низкая вероятность исхода. Чувствительность и специфичность модели (1) при данном пороговом значении составили 70,4% и 52,1%, соответственно.



Диагональные сегменты, сгенерированные связями.

Рис. 2. ROC-кривая, характеризующая зависимость вероятности исхода от значений прогностической функции (1)

Также была разработана прогностическая модель для определения вероятности развития беременности до 12 нед в зависимости от показателей АФК и ОАС в ФЖ методом бинарной логистической регрессии. Наблюдаемая зависимость описывается уравнением (2):

$$P = 1 / (1 + e^{-z}) * 100\%$$

$$z = -3,65 + 2,86 * \text{ХАФК-фж} - 2,95 * \text{ХОАС-фж} \quad (2)$$

где P – вероятность развития беременности до 12 недель гестации (%), ХАФК-фж – АФК в ФЖ в день пункции, ХОАС-фж – ОАС в ФЖ в день пункции.

Полученная регрессионная модель является статистически значимой ($p=0,001$). Исходя из значения коэффициента детерминации Найджелкерка, модель учитывает 40,8% дисперсии вероятности пролонгирования беременности до 12 недель, которые определяются факторами, включенными в модель (2). Исходя из значений регрессионных коэффициентов, АФК в ФЖ имели прямую связь успешным развитием беременности, а ОАС в ФЖ отличались обратной связью с вероятностью её пролонгирования до 12 недель. Увеличение АФК в ФЖ на 1 единицу увеличивает шансы развития беременности в 1,5 раза ($p=0,022$; 95% ДИ: 1,52-200,5), увеличение ОАС в ФЖ на 1 единицу уменьшает шансы развития беременности на сроке 12 нед в 1,2 раза ($p=0,028$; 95% ДИ: 0,004-0,729).

Пороговое значение логистической функции Р было определено с помощью метода анализа ROC-кривых. Полученная кривая представлена на рисунке 3.

Площадь под ROC-кривой составила $0,87 \pm 0,06$ (95% ДИ: 0,75-0,98). Значение логистической функции (1) в точке cut-off составило 33,78%. При значениях $P > 33,78\%$ определялась высокая вероятность развития беременности до 12 недель, а при значениях $P < 33,78\%$ — низкая. Чувствительность и специфичность модели (2) при данном пороговом значении составили 80,0% и 87,9%, соответственно.

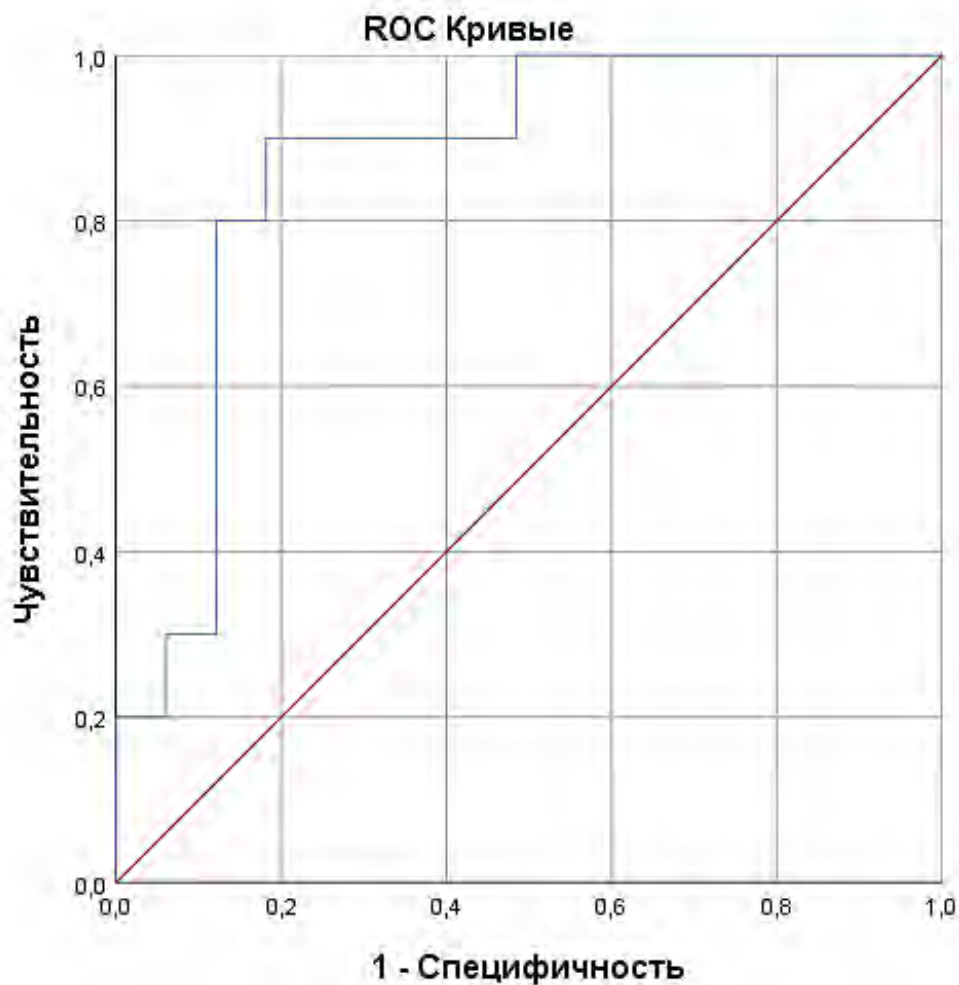


Рис. 3. ROC-кривая, характеризующая зависимость вероятности развития беременности до 12 недель от значений прогностической функции (2)

Таким образом можно говорить о связи уровня общей антиоксидантной системы и уровня АФК в фолликулярной жидкости и периферической крови пациенток с бесплодием. Используемый в работе метод дает возможность построения прогностической модели в рамках изучения уровня общей антиоксидантной способности в периферической крови и ее связи с вероятностью наступления беременности и ее прогрессирования до 12 недель гестации.

Глава 4. ИСХОДЫ ПРОГРАММ ВРТ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УРОВНЯ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА В ЭЯКУЛЯТЕ

4.1. Клинико-anamнестические данные супружеских пар, включенных в исследование

На следующем этапе было обследовано 50 супружеских пар с диагнозом мужское бесплодие, которые проходили лечение методами ВРТ. Возраст женщин составил 33 (min=18; max=37) года, возраст мужчин — 35,9 (min=19; max=53). Описательная статистика участников исследования представлена в таблице 12.

Были отобраны супружеские пары преимущественно с первой попыткой ЭКО, с трубно-перитонеальным фактором бесплодия, который в большинстве случаев сочетается с мужским фактором бесплодия.

Таблица 12. Клинико-anamнестические параметры участников исследования

Параметр	n=50	
Возраст женщины, лет*	34,0 [32; 35]	
Рост женщины, см*	165,0 [163; 168]	
Вес женщины, кг*	60,5 [55; 65]	
ИМТ женщины, кг/м ² *	21 [20; 24]	
Возраст мужчины, лет*	35 [32,2; 39,7]	
Тип бесплодия	I-74% (n=37)	II-26% (n=23)
Попытка	1 [1; 1]	
Курение	12% (6 женщин)	
Причина бесплодия		
Трубно-перитонеальный фактор бесплодия	30 (60%)	
Бесплодие неясного генеза	1 (2%)	
Фактор мужского бесплодия	43 (86%)	

Примечание: абс (%), критерий Мак-Немара; * Me[Q25-Q75]

Гормональные характеристики женщин в данных супружеских парах указаны в таблице 13.

Таблица 13. Характеристики овариального резерва и менструальной функции женщин, включенных в исследование

Параметр	n=50
Длительность менструального цикла, дней	28 [26; 28]
Продолжительность менструации, дней	5 [4; 6]
АМГ	2,2 [1,3; 3,1]
ФСГ	6,75 [5,0; 8,27]

Примечание: Me [Q25-Q75]

При интерпретации результатов статистического анализа уровень значимости $p\text{-value}=0,05$ был принят как критический. Параметры эякулята в день трансвагинальной пункции указаны в таблице 14.

Таблица 14. Параметры эякулята в день трансвагинальной пункции фолликулов и значение общей антиоксидантной способности участников исследования

	Среднее	Минимум; максимум	Стандартное отклонение
Концентрация, млн/мл	55,74	0,1; 169	34,89
Подвижность, %	50,79	8; 81	13,97
Морфология, % нормальных сперматозоидов	2,03	0; 4	0,88
Общая антиоксидантная способность эякулята, ммоль/л экв.тролокса	1,36	0,17; 3,1	0,59

Концентрация и подвижность сперматозоидов у исследуемой группы была в пределах нормальных значений. Оценка морфологии сперматозоидов показала, что процент сперматозоидов нормальной формы в исследуемой группе составил 2% (0; 4), что меньше референсного значения (4%) и является показанием к ИКСИ.

Для выявления возможной связи ОАС эякулята с основными клиническими и эмбриологическими показателями программ ВРТ был проведен корреляционный анализ Спирмена. Результаты представлены в таблице 15.

По данным корреляционного анализа была выявлена отрицательная корреляция общей антиоксидантной способности эякулята с уровнем оплодотворения ооцитов ($r=-0,288$; $p=0,042$), то есть при увеличении суммарной антиоксидантной способности методом FORD частота оплодотворения снижалась (рис. 4).

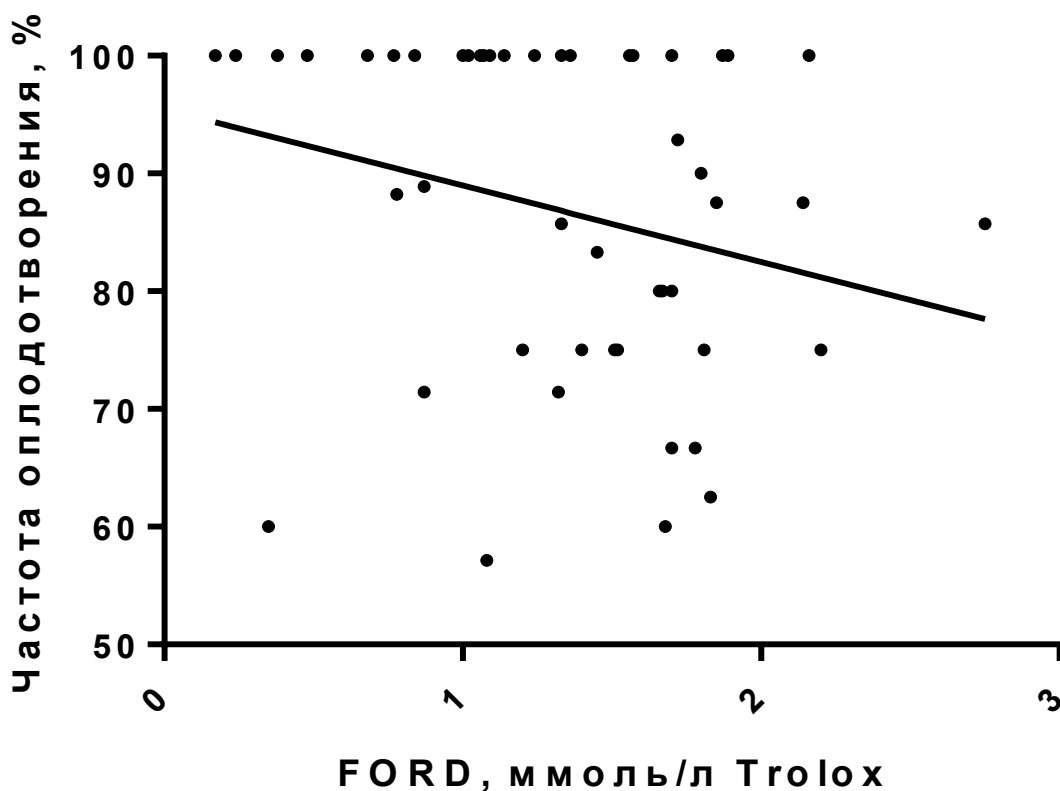


Рис. 4. Изменение частоты оплодотворения ооцитов в зависимости от уровня антиоксидантной способности

Таблица 15. **Корреляционный анализ (коэффициент корреляции Спирмена - R_s) антиоксидантной способности эякулята с основными клиническими и эмбриологическими показателями программы ВРТ**

Показатель	R_s	p-value
ОАС, ммоль/л экв.тролокса	1	-
Возраст мужчины, лет	0,068	0,640
Концентрация, млн/мл	-0,029	0,842
Подвижность, %	-0,052	0,720
Морфология, % нормальных сперматозоидов	0,186	0,197
Частота оплодотворения, %	-0,288	0,042
Количество зигот	-0,119	0,411
Эмбрионы отличного качества (5 сутки)	0,112	0,439
Эмбрионы хорошего качества (5 сутки)	0,151	0,296
Эмбрионы удовлетв. качества (5 сутки)	-0,060	0,680
Эмбрионы неудовлетв. качества (5 сутки)	-0,059	0,684
Эмбрионы отличного качества (6 сутки)	0,241	0,092
Эмбрионы хорошего качества (6 сутки)	0,003	0,984
Эмбрионы удовлетв. качества (6 сутки)	-0,142	0,324
Эмбрионы неудовлетв. качества (6 сутки)	-0,045	0,755
Криоконсервированные эмбрионы	0,031	0,832
Зрелость перенесенного эмбриона (степень экспансии полости бластоцисты)	0,275	0,058

Наблюдалась тенденция к наличию положительной корреляционной связи между числом криоконсервированных эмбрионов отличного качества 6-х суток развития и суммарной антиоксидантной способностью ($r=0,241$; $p=0,092$). Чем выше антиоксидантная способность в эякуляте, тем вероятнее получение эмбрионов отличного качества.

Кроме того, была выявлена тенденция к наличию положительной корреляционной связи между зрелостью перенесенного в полость матки эмбриона и суммарной антиоксидантной способностью ($r=0,275$; $p=0,053$).

4.2. Оценка исходов программ ВРТ в зависимости от уровня окислительного стресса нативного эякулята в день оплодотворения

Для оценки роли исследуемых факторов в исходах программы ВРТ все супружеские пары были разделены на две группы в зависимости от исходов. Из 50 супружеских пар: у 21 пары диагностировали беременность, в то время как у 29 — отрицательный результат. Описательная статистика по группам представлена в таблице 16.

Таблица 16. Описательная статистика участников исследования в зависимости от наступления или не наступления беременности

Параметры	Исход (1 - беременность; 2 – отсутствие беременности)	n	Среднее	Станд. отклонение
Возраст женщин	1	21	33,24	3,53
	2	29	33,03	4,03
Возраст мужчин	1	21	34,81	4,48
	2	29	36,59	7,08
Количество зрелых ооцитов	1	21	6,14	2,74
	2	29	6,41	3,85
% оплодотворения	1	21	89,99	13,58
	2	29	84,34	16,20
Количество зигот	1	21	5,48	2,60
	2	29	5,41	3,67

Параметры	Исход (1 - беременность; 2 – отсутствие беременности)	n	Среднее	Станд. отклонение
Количество эмбрионов отличного качества (5 день)	1	21	1,71	0,96
	2	29	0,69	1,07
Количество эмбрионов хорошего качества (5 день)	1	21	0,86	0,91
	2	29	0,48	0,63
Количество эмбрионов удовлетворительного качества (5 день)	1	21	0,29	0,56
	2	29	0,17	0,38
Количество эмбрионов неудовлетворительно го качества (5 день)	1	21	0,29	1,31
	2	29	0,28	0,65
Количество морул (5 день)	1	21	1,00	1,10
	2	29	0,97	1,15
Количество бластоцист (5 день)	1	21	0,19	0,68
	2	29	0,07	0,26
Количество ранних бластоцист (5 день)	1	21	0,05	0,22
	2	29	0,07	0,26
Количество эмбрионов отличного качества (6 день)	1	21	0,14	0,48
	2	29	0,17	0,47

Параметры	Исход (1 - беременность; 2 – отсутствие беременности)	n	Среднее	Станд. отклонение
Количество эмбрионов хорошего качества (6 день)	1	21	0,48	0,68
	2	29	0,38	0,73
Количество эмбрионов удовлетворительного качества (6 день)	1	21	2,24	0,77
	2	29	1,90	0,62
Количество эмбрионов неудовлетворительно го качества (6 день)	1	21	38,67	28,41
	2	29	64,24	34,45
Концентрация, млн/мл	1	21	1,81	0,98
	2	29	2,17	0,76
Подвижность, %	1	21	1,39	0,38
	2	29	1,32	0,64
Морфология, %	1	21	2,57	1,40
	2	29	1,17	1,14
ОАС, ммоль/л Trolox	1	21	0,57	1,57
	2	29	0,45	0,78

Было проведено сравнение средних значений в двух группах по U-критерию Манна-Уитни, а также тест равенства дисперсий по критерию Ливиня. Результаты анализа представлены в таблице 17. Значимые результаты обозначены звездочкой (*).

Таблица 17. Результаты теста равенства дисперсий (критерий Ливиня) и сравнения средних (U-критерий Манна-Уитни)

	Критерий Ливиня		U-критерий Манна-Уитни	
	F	p-value	U	p-value
Возраст женщин	0,041	0,841	299,5	0,921
Возраст мужчин	4,753	0,034	257,5	0,355
Количество зрелых ооцитов	1,874	0,177	303,5	0,984
% оплодотворения	1,644	0,206	246,0	0,226
Количество зигот	1,372	0,247	274,0	0,545
Количество эмбрионов отличного качества (5 день)	0,158	0,693	128,5	0,001*
Количество эмбрионов хорошего качества (5 день)	2,315	0,135	237,5	0,146
Количество эмбрионов удовлетворительного качества (5 день)	3,223	0,079	282,0	0,524
Количество эмбрионов неудовлетворительного качества (5 день)	0,194	0,662	259,0	0,138
Количество морул (5 день)	0,719	0,401	290,0	0,762
Количество бластоцист (5 день)	3,364	0,073	295,5	0,707
Количество ранних бластоцист (5 день)	0,384	0,538	298,0	0,756

	Критерий Ливиня		U-критерий Манна-Уитни	
	F	p-value	U	p-value
Количество эмбрионов отличного качества (6 день)	0,130	0,720	292,5	0,676
Количество эмбрионов хорошего качества (6 день)	0,118	0,733	273,5	0,457
Количество эмбрионов удовлетворительного качества (6 день)	3,497	0,068	224,0	0,083
Количество эмбрионов неудовлетворительного качества (6 день)	0,220	0,641	180,5	0,015*
Зрелость перенесенного эмбриона	1,043	0,312	294,0	0,836
Концентрация, млн/мл	2,490	0,121	246,5	0,225
Подвижность, %	5,169	0,028	293,0	0,821
Морфология, %	2,332	0,133	119,5	0,001*
ОАС, ммоль/л Trolox	0,948	0,335	285,0	0,627

Было установлено, что среднее количество эмбрионов отличного качества (5-й день культивирования) в группе женщин с наступившей беременностью — 1,71, тогда как в группе женщин с отсутствием беременности — 0,69 ($U=128,5$, $p<0,001$). Также в группе женщин с наступившей беременностью среднее количество эмбрионов неудовлетворительного качества на 6 день — 38,67, а в другой группе — 64,24 ($U=180,5$, $p=0,015$). Было проведено сравнение и показателей эякулята мужчин в двух группах. Значимые отличия ($U=119,5$, $p<0,001$)

были получены при сравнении средних показателей морфологии сперматозоидов. В группе с наступившей беременностью она составила в среднем 2,57%, в группе с ее отсутствием — 1,17%.

Не было обнаружено связи между общей антиоксидантной способностью в эякуляте и исходами программ ВРТ. У пациенток с наступившей беременностью средний уровень ОАС в эякуляте партнеров составил 0,57, у пациенток с ненаступившей беременностью – 0,45 ($U=285$, $p=0,627$).

Глава 5. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Окислительный стресс — состояние, характеризующееся дисбалансом между прооксидантными молекулами, включая активные формы кислорода и азота, и антиоксидантной защитой — играет ключевую роль в патогенезе бесплодия как у мужчин, так и у женщин [26]. Дисбаланс между прооксидантами и антиоксидантами может привести к ряду репродуктивных заболеваний, таких как наружный генитальный эндометриоз, синдром поликистозных яичников (СПКЯ) и идиопатическое бесплодие. Осложнения беременности, самопроизвольный аборт, привычное невынашивание беременности и преэклампсия также могут развиваться в ответ на окислительный стресс. Исследования показали, что избыточная масса тела и факторы образа жизни, такие как курение сигарет, употребление алкоголя и рекреационных наркотиков, могут способствовать избыточному образованию свободных радикалов, что может повлиять на фертильность. Воздействие загрязнителей окружающей среды вызывает все большую озабоченность, поскольку было обнаружено, что они также вызывают окислительные состояния, что, возможно, приводит к женскому бесплодию [1].

Каждый месяц в яичнике женщины начинает расти и развиваться когорта ооцитов, но мейоз I возобновляется только в одном из них, доминантном фолликуле. Этот процесс связан с увеличением продукции АФК и ингибируется антиоксидантами. Напротив, прогрессированию метафазы II мейоза способствуют антиоксиданты, что свидетельствует о наличии сложной взаимосвязи между АФК и антиоксидантами в яичниках. Увеличение продукции стероидов в растущем фолликуле вызывает увеличение цитохрома P450, что приводит к образованию АФК. Активные формы кислорода, продуцируемые преовуляторным фолликулом, считаются важными индукторами овуляции. Депривация кислорода стимулирует фолликулярный ангиогенез, что важно для

адекватного роста и развития фолликула яичника. Фолликулярные АФК способствуют апоптозу, тогда как фолликулостимулирующий гормон (ФСГ) уравнивает это действие в растущем фолликуле. Уровень эстрадиола возрастает по мере роста фолликула, вызывая в нем образование каталазы в доминантном фолликуле и, таким образом, подавляя апоптоз. Все эти процессы важны для понимания качества получаемых ооцитов в программах лечения бесплодия методами ВРТ для повышения эффективности лечения.

Фолликулярная жидкость создает микроокружение для развивающегося ооцита и оказывает непосредственное влияние на качество ооцитов, имплантацию и раннее развитие эмбриона. Дисбаланс продукции АФК в фолликулярной жидкости яичников может оказывать неблагоприятное влияние на вышеуказанные процессы. Ранее было показано, что повышенная активность АФК в фолликулярной жидкости может быть токсичной для формирования эмбрионов, тогда как физиологический уровень АФК может указывать на «здоровые» развивающиеся ооциты [28]. Результаты нашего исследования показали отсутствие влияния общей антиоксидантной способности на эмбриологический этап у набранной группы пациентов. Не было выявлено значимых различий в частоте оплодотворения и развития эмбрионов до 5 и 6 суток культивирования у женщин с различными показателями АОС и АФК. Возможно, это было связано с пулированием всей фолликулярной жидкости и оценкой общей АОС и АФК от всех собранных фолликулов при трансвагинальной пункции яичников. Именно поэтому коллектив исследователей под руководством Nishihara T. представили другие результаты, где общая антиоксидантная способность была выше в фолликулах, где ооциты успешно оплодотворились, и значительно ниже в фолликулярной жидкости, где полученный эмбрион был хорошего качества [10]. Авторы проводили индивидуальный сбор фолликулярной жидкости и отдельное

культивирование развивающихся после оплодотворения эмбрионов, полученных из этих ооцитов. При оценке концентрации глутатиона в фолликулярной жидкости авторы не увидели разницы в группах с наступившей беременностью и её отсутствием.

В настоящий момент опубликованы противоречивые данные о влиянии окислительного стресса в фолликулярной жидкости на качество эмбрионов, частоту оплодотворения и наступления беременности. В нашей работе установлено, что снижение уровня АФК крови и фолликулярной жидкости может быть связано с отрицательными исходами программ лечения бесплодия методами ВРТ. Необходимо отметить, что проведение сравнения между данными разных авторов может быть затруднено по причине совершенно разных подходов к оценке окислительного стресса в биологических жидкостях. Например, Pasqualotto Т. и соавторы продемонстрировали, что беременные пациентки имели значительно более низкие уровни перекисного окисления липидов по сравнению с небеременными в программах ВРТ [20], однако эти данные невозможно сопоставить с полученными в настоящей работе результатами. В данной работе был опробован новый метод оценки АФК и АОС по фолликулярной жидкости. Построенная модель с высокой степенью доказательности может прогнозировать исходы программ ВРТ по определению в крови и фолликулярной жидкости окислительного стресса.

Необходимо отметить, что настоящее исследование имеет ряд ограничений: малая выборка пациентов, отсутствие точных физиологических концентраций АФК и АОС у здоровых женщин в естественных менструальных циклах как нормировочное значение. В программах ВРТ многие параметры часто связаны друг с другом и эту взаимосвязь не всегда можно дифференцировать. Поиск пороговых значений АФК и АОС у фертильных женщин является задачей будущих исследований. Выявленная в работе корреляция между уровнями АФК и

общей антиоксидантной способностью с исходами программ ВРТ делает актуальным их исследование в качестве новых биомаркеров для прогнозирования наступления беременности, в том числе при естественном зачатии. Особенно интересны исследования, направленные на изучение фолликулярных клеток внутри яичника и их особенности под действием антиоксидантов и АФК. Показано, что АФК при курении (в том числе электронных сигарет) вызывает изменение экспрессии генов клеток гранулезы, что приводит к нарушению их клеточного цикла, снижению стероидогенеза и, в конечном счете, к снижению фертильности. Авторы прослеживают биологический механизм нарушений женского репродуктивного здоровья через окислительный стресс, вызванный факторами окружающей среды. В связи с этим изучены пути активации процесса аутофагии клеток гранулезы под действием окислительного стресса и недостаточно эффективной работой антиоксидантов. По результатам исследований авторы делают вывод, что неконтролируемый окислительный стресс способен приводить к потере числа примордиальных фолликулов, митохондриальной дисфункции в клетках гранулезы, активации каскада аутофагии и резкому снижению способности к зачатию. Изменения в виде нарушений клеток по типу аутофагии под действием окислительного стресса также были показаны и в адипоцитах.

В контексте влияния окислительного стресса на женскую репродуктивную функцию было проведено исследование, связанное с особенностями функционирования глутатион-зависимой антиоксидантной системы женщин с синдромом поликистозных яичников в программах ВРТ [29]. Были проанализированы образцы фолликулярной жидкости и периферической крови. Показано, что у пациенток с низкой частотой оплодотворения и развитием бластоцист низкого качества уровни общего глутатиона были ниже. Авторы считают, что глутатион-зависимая антиоксидантная система действует более

эффективно на поздних стадиях созревания ооцитов и эмбрионов, а количество антиоксидантов в фолликулярной жидкости может быть потенциальным предиктором качества ооцитов и эмбрионов.

В нашей работе была изучена корреляция между уровнем оксидативного стресса в фолликулярной жидкости и периферической крови. Несмотря на то, что ооцит находится в непосредственном контакте со своими собственными метаболитами в фолликулярной жидкости, уровень антиоксидантов в периферической крови должен отражать метаболическое состояние всех систем организма и нами выявлена взаимосвязь между этими показателями. Это может говорить о возможности разработки тест-системы на этапе прегравидарной подготовки к программам лечения бесплодия методами ВРТ, чтобы максимально увеличить шансы супружеской пары на получение качественных гамет и рождение здорового ребенка. Тест FORT, используемый в настоящей работе, может служить такой системой диагностики (при условии проведения более масштабных работ).

В результате анализа полученных данных была выявлена связь между уровнем окислительного стресса и наличием у женщины непроходимости маточных труб. Как известно, именно в фаллопиевых трубах показана работа эндогенной NO-системы за счет позитивной активности NADPH-дифоразы [29]. Оксид азота NO расслабляет гладкую мускулатуру маточных труб, и именно поэтому любой недостаток NO может приводить к нарушению биения ворсинчатого эпителия маточных труб, задержке ооцита в трубе, агрессивному воздействию на движущиеся сперматозоиды и бесплодию. При инфекциях урогенитального тракта резко снижается подвижность мужских половых клеток и их выживаемость. Повышенная концентрация NO в фаллопиевых трубах является цитотоксичной средой для микроорганизмов, но также она может быть губительна и для сперматозоидов. Многие исследователи связывают внематочные беременности с недостаточно активным биением

клеток ворсинчатого эпителия маточных труб и, как следствие, неспособности эмбриона прикрепиться в полости матки. Результаты, полученные в работе, говорят о высоком хроническом окислительном стрессе именно в органах репродуктивной системы женщины, что косвенно могло «способствовать» внематочным беременностям. Однако данная гипотеза требует научно-обоснованных подтверждений на большой когорте пациенток.

Полученные в настоящей работе данные выявили положительную корреляцию АФК с индексом массы тела, суммарной дозой гонадотропинов и количеством дней стимуляции. Ожирение действительно вызывает значимые изменения в организме как мужчин, так и женщин, особенно это касается репродуктивной функции.

Было показано, что частота выкидышей значительно увеличивается у женщин с избыточным весом и ожирением как при естественной, так и при вспомогательной репродукции (ВРТ) [64]. Причина повышенной частоты невынашивания беременности после ВРТ у этих женщин может быть связана с метаболическими, эпигенетическими или митохондриальными нарушениями в ооцитах и эмбрионах и с аномальной эндокринной, метаболической и воспалительной средой матки, вызванной ожирением, которое, по-видимому, также ответственно за другие многочисленные осложнения во время беременности и внутриутробно-фетальное программирование постнатальных заболеваний. Описано смещение окна имплантации у женщин с ожирением в программах переноса размороженных эмбрионов, что может приводить к более низкой частоте имплантации эмбриона и повышению риска выкидыша, наблюдаемым после переноса эмбрионов с использованием аутологичных ооцитов и донорских яйцеклеток у реципиентов. Несмотря на то, что в нашем исследовании не было женщин с ожирением, превышение ИМТ значений 25 кг/м² показало плохие результаты программ ВРТ. В нашей работе было 13 таких пациенток.

На втором этапе нашего исследования были получены результаты параметров окислительного стресса нативного эякулята мужчин с бесплодием. Необходимо отметить, что мы не изучали доноров спермы и фертильных мужчин, что серьезно ограничивает полученные данные в разделе поиска нормативных показателей АФК и ОАС у мужчин с нормальной репродуктивной функцией. Полученные данные о мужчинах с бесплодием позволяют говорить о том, что окислительный стресс в нативном эякуляте может быть причиной негативных исходов программ лечения бесплодия и современная научная литература подтверждает полученные выводы. Имеется ряд исследований, доказывающих важность правильного функционирования антиоксидантной системы в эякуляте у мужчин. Показано, что при необструктивной форме азооспермии в семенной плазме и сыворотке усиливаются процессы перекисного окисления липидов, снижается концентрация восстановленного глутатиона и снижается активность ферментов глутатионовой антиоксидантной системы (глутатионпероксидазы и глутатионтрансферазы) [57].

Sharma R. et al. установили, что дисбаланс между выработкой АФК и ОАС в семенной жидкости указывает на окислительный стресс и коррелирует с мужским бесплодием. Составной показатель АФК/ОАС может быть связан коррелирован с бесплодием, чем только АФК или ОАС [58].

В нашем исследовании не было цели связать уровень ОАС с мужским бесплодием, так как эта тема хорошо изучена. Мы акцентировали свое внимание на влиянии уровня ОАС в эякуляте на особенности эмбриологического этапа программ лечения бесплодия методами ВРТ. В работе показано значимое снижение частоты оплодотворения ооцитов при повышении ОАС в эякуляте. В исследованиях зарубежных авторов показано, что одним из главных патофизиологических эффектов свободных радикалов является

повреждение клеточной мембраны сперматозоида и ооцита путем перекисного окисления липидов [59]. Сперматозоиды особенно восприимчивы к окислительному стрессу из-за высокого содержания омега-3 полиненасыщенных жирных кислот в мембране и достаточно ограниченной способности к защите от окисления в их цитоплазме. При оплодотворении изменение физиологических свойств мембраны мужских половых клеток может приводить к нарушению процессов капацитации, акросомальной реакции и процесса слияния гамет. При экстракорпоральном оплодотворении методом ИКСИ в ооцит помещают сперматозоид с мембраной, что, действительно, может приводить к нарушению процесса высвобождения мужского генетического материала и формирования пронуклеусов. Измененные свойства мембраны мужских половых клеток (особенно это касается текучести липидов) могут приводить к блоку формирования пронуклеусов и, как следствие, отсутствию/снижению частоты оплодотворения. В настоящей работе анализ показателей эмбриологического этапа программы лечения бесплодия методами ВРТ выявил это. Открытым остался вопрос изменения липидного состава мембраны сперматозоида под действием окислительного стресса. Планируется изучить его в следующих научных проектах.

В связи с негативными последствиями окислительного стресса на женскую и мужскую фертильность ученые всего мира продолжают поиск лекарственных препаратов, которые могут предотвратить запуск каскада аутофагии внутри фолликула и сперматозоида, а также защитить созревающие ооциты и эмбрионы от различных генетических нарушений, которые могут передаваться будущим поколениям. Однако опубликованные работы часто касаются только экспериментальных животных, например, был изучен фактор IGF2, который способствовал поддержке мейотической структуры ооцитов у мышей-самок позднего репродуктивного возраста [65]. В клинической практике антиоксидантная

терапия при подготовке к программам лечения бесплодия носит несистематический характер. В частности, был проведен мета-анализ публикаций, касающихся использования мелатонина в качестве терапии для повышения эффективности программ ВРТ [60]. Были включены семь рандомизированных контролируемых исследований. Мета-анализ продемонстрировал достоверное увеличение числа зрелых ооцитов отличного качества при использовании мелатонина (средняя разница = 1,82; 95% ДИ 0,37-3,27; $p=0,01$). Все семь исследований показали устойчивую тенденцию к увеличению частоты наступления беременности при терапии мелатонином. Однако применяемые дозы в исследованиях были разными, авторы утверждают, что подбор индивидуального лечения требует дальнейшего изучения. Использование витаминов в прегравидарной подготовке мужчин и женщин к программам ВРТ показало свое преимущество при наружном генитальном эндометриозе. Прием витаминов С и Е у женщин с НГЭ приводил к снижению уровня АФК и повышению общей антиоксидантной способности, что позволило повысить эффективность программ лечения бесплодия [61].

В последнем систематическом кохрейновском обзоре по использованию антиоксидантов для лечения мужского бесплодия были собраны данные 6264 пациентов, направленных в клиники по лечению бесплодия [62]. Было показано значительное улучшение показателей частоты наступления клинической беременности (12–26% против 7%) и живорождения (14–26% против 12%) у пациентов, которых лечили антиоксидантами, по сравнению с группой плацебо; различия в частоте выкидышей отсутствовали. Однако качество доказательств было оценено как низкое или очень низкое из-за неоднородности исследований. Аналогичным образом, последний обзор этого же автора по использованию антиоксидантов для лечения бесплодия у женщин показал положительное влияние на коэффициент рождаемости (улучшились

показатели частоты наступления клинической беременности и рождения живых детей [63]). Подробно изучив данные, авторы обнаружили улучшение показателей живорождения (ОШ 1,79, 95% ДИ 1,20-2,67, $p=0,005$). Однако этот результат был основан только на 7 РКИ (рандомизированное контролируемое исследование), в общей сложности 124 живорождения 750 пар. А исключение исследований с высоким риском предвзятости привело к потере доказательств улучшения (OR 1,38, 95% ДИ 0,89-2,16). Примечательно, что размер выборки и количество событий (живорождений) были дополнительно сокращены ($n=540$ и $n=105$ соответственно) и это, возможно, может объяснить результаты. Важно, что полученные результаты указывают на необходимость дальнейших высококачественных РКИ, оценивающих позитивный результат антиоксидантной терапии в прегравидарной подготовке пациентов к программам ВРТ. Наконец, включив 11 РКИ, авторы сообщили о значительном увеличении частоты клинических беременностей по сравнению с плацебо или отсутствием лечения. Однако качество доказательств было оценено как низкое или очень низкое. К сожалению, в настоящее время нет единого мнения относительно использования антиоксидантов при проведении процедур ВРТ в рутинной клинической практике. Однако важны полученные многими авторами данные о достоверном снижении уровня окислительного стресса в биологических жидкостях при приеме антиоксидантной терапии, которая опосредованно может вести к улучшению исходов ВРТ.

В России активно изучением антиоксидантной терапией при бесплодии занимаются Сыркашева А.Г. и профессор Гамидов С.И.

В своих работах профессор Гамидов С.И. с коллегами указывают, что хотя еще нет результатов крупных рандомизированных контролируемых испытаний, накоплена определенная доказательная база, которая показывает, что прием пероральных антиоксидантов приводит к улучшению основных параметров спермы и возрастанию

частоты рождения детей [66]. Рекомендовано комбинированное применение жирорастворимых антиоксидантных молекул для синергии эффекта и действия препаратов не только на мембраны половых клеток, но и водную среду (биологические жидкости, в которых формируются гаметы). Антиоксидантная терапия рекомендуется не только мужчинам, вступающим в программы лечения бесплодия методами ВРТ, но и при планировании естественного зачатия, а также при вредных условиях работы и контакте с негативными химическими и физическими факторами.

Относительно подготовки женщин к программам ВРТ у Сыркашевой А.Г. с коллегами опубликованы протоколы антиоксидантной терапии, которые зарекомендовали себя в качестве прегравидарной подготовки с хорошей клинической эффективностью [67].

Несмотря на то, что в большинстве случаев антиоксидантная терапия является эмпирической, практикующие врачи знают о ее клинической эффективности, особенно у супружеских пар с бесплодием. Вероятно, в будущем появятся большие клинические исследования, которые на базе доказательной медицины убедят сообщество в целесообразности применения антиоксидантной терапии при подготовке к рождению ребенка, однако в настоящий момент в клинических рекомендациях, утвержденных в России, такая терапия не упоминается.

ВЫВОДЫ

1. У пациенток с бесплодием при проведении программ ВРТ с увеличением числа дней овариальной стимуляции более 8 и при уровне ИМТ выше $28,9 \text{ кг/м}^2$ в периферической крови отмечается повышенный уровень активных форм кислорода ($R_s=0,294$; $p<0,001$ и $R_s=0,238$; $p=0,039$, соответственно).
2. В программах лечения бесплодия методами ВРТ параметры эмбриологического этапа (частота оплодотворения, частота формирования blastocyst хорошего и отличного качества) не зависят от показателей окислительного стресса (АФК и ОАС) в периферической крови и фолликулярной жидкости женщин с различными факторами бесплодия.
3. Уровень общей антиоксидантной способности в периферической крови пациенток с трубно-перитонеальным фактором бесплодия статистически значимо выше по сравнению с женщинами без такового диагноза. В фолликулярной жидкости уровень общей антиоксидантной способности и активных форм кислорода не зависит от наличия трубно-перитонеального фактора женского бесплодия.
4. У пациенток с потерями беременности до 12 недель гестации регистрируется достоверное повышение уровня общей антиоксидантной способности в крови и фолликулярной жидкости (1,16 против 1,27 и 1,29 против 1,04). Показатели уровней активных форм кислорода и общей антиоксидантной защиты в периферической крови и фолликулярной жидкости значимо различаются, что указывает на целесообразность их отдельного измерения ($p<0,001$) в программах ВРТ.
5. Уровень АФК в фолликулярной жидкости выше в группах пациенток с наступившей беременностью и ее пролонгированием

до 12 недель. Уровень АФК увеличивается у пациенток с наступившей беременностью и развитием до 12 недель, что позволяет прогнозировать исходы программ лечения бесплодия методами ВРТ в день трансвагинальной пункции.

6. Общая антиоксидантная способность эякулята достоверно снижена при тератозооспермии (морфология сперматозоидов менее 4%, $p=0,001$). При увеличении общей антиоксидантной способности нативного эякулята частота оплодотворения ооцитов и количество бластоцист отличного качества достоверно снижаются. При увеличении общей антиоксидантной способности эякулята в программах ВРТ достоверно снижается частота оплодотворения ($R_s=-0,288$; $p=0,042$) и количество бластоцист отличного качества ($p=0,001$).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для повышения эффективности программ лечения бесплодия методами ВРТ целесообразно проведение оценки окислительного стресса в периферической крови методами FORT и FORD у женщин с различными типами бесплодия.
2. Женщинам с бесплодием различного генеза при повышении ИМТ $>25 \text{ кг/м}^2$ для снижения уровня окислительного стресса следует рекомендовать снижение массы тела для повышения эффективности программ ВРТ.
3. Супружеским парам с мужским фактором бесплодия и высокими показателями окислительного стресса целесообразно проведение консультации специалистов ВРТ и врачей-андрологов в виду высокого риска получения эмбрионов низкого качества и высоких рисков ранних репродуктивных потерь.
4. При выявлении высоких показателей окислительного стресса методами FORT и FORD для повышения эффективности лечения целесообразно назначение эмпирической прегравидарной подготовки к программе ВРТ с учетом имеющихся современных данных и актуальных клинических рекомендаций.
5. Супружеским парам с бесплодием и выявленными повышенными показателями окислительного стресса в биологических жидкостях рекомендована консультация и лечение у акушера-гинеколога и андролога на этапе подготовки к программам ВРТ вследствие отрицательного влияния окислительного стресса на эмбриологические параметры и репродуктивные исходы программ лечения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Syrkasheva A, Frankevich V, Kindysheva S, Starodubtseva N, Donnikov A, Dolgushina N. The Effect of Bisphenol A on the IVF Outcomes Depending on the Polymorphism of the Detoxification System Genes. *J Pers Med*. 2021 Oct 26;11(11):1091. doi: 10.3390/jpm11111091. PMID: 34834443; PMCID: PMC8624790
2. Skakkebaek NE, Lindahl-Jacobsen R, Levine H, Andersson AM, Jørgensen N, Main KM, Lidegaard Ø, Priskorn L, Holmboe SA, Bräuner EV, Almstrup K, Franca LR, Znaor A, Kortenkamp A, Hart RJ, Juul A. Environmental factors in declining human fertility. *Nat Rev Endocrinol*. 2022 Mar;18(3):139-157. doi: 10.1038/s41574-021-00598-8. Epub 2021 Dec 15. PMID: 34912078.
3. Gualtieri, R.; Kalthur, G.; Barbato, V.; Longobardi, S.; Di Rella, F.; Adiga, S.K.; Talevi, R. Sperm Oxidative Stress during In Vitro Manipulation and Its Effects on Sperm Function and Embryo Development. *Antioxidants* 2021, 10, 1025
4. Gupta, S.; Finelli, R.; Agarwal, A.; Henkel, R. Total antioxidant capacity- Relevance, methods and clinical implications. *Andrologia* 2021, 53, e13624
5. Von Mengden, L.; Klamt, F.; Smitz, J. Redox Biology of Human Cumulus Cells: Basic Concepts, Impact on Oocyte Quality, and Potential Clinical Use. *Antioxid. Redox Signal*. 2020, 32, 522–535.
6. Bedaiwy MA, Elnashar SA, Goldberg JM, Sharma R, Mascha EJ, Arrigain S, Agarwal A, Falcone T. Effect of follicular fluid oxidative stress parameters on intracytoplasmic sperm injection outcome. *Gynecol Endocrinol*. 2012 Jan;28(1):51-5. doi: 10.3109/09513590.2011.579652. Epub 2011 Jun 30. PMID: 21714695.

7. Siristatidis C, Vogiatzi P, Varounis C, Askoxylaki M, Chrelias C, Papantoniou N. The Effect of Reactive Oxygen Species on Embryo Quality in IVF. *In Vivo*. 2016 Mar-Apr;30(2):149-53. PMID: 26912827.
8. Luddi A, Capaldo A, Focarelli R, Gori M, Morgante G, Piomboni P, De Leo V. Antioxidants reduce oxidative stress in follicular fluid of aged women undergoing IVF. *Reprod Biol Endocrinol*. 2016 Sep 7;14(1):57. doi: 10.1186/s12958-016-0184-7. PMID: 27604261; PMCID: PMC5015196.
9. Elizur SE, Lebovitz O, Orvieto R, Dor J, Zan-Bar T. Reactive oxygen species in follicular fluid may serve as biochemical markers to determine ovarian aging and follicular metabolic age. *Gynecol Endocrinol*. 2014 Oct;30(10):705-7. doi: 10.3109/09513590.2014.924100. Epub 2014 Jul 11. PMID: 25014488.
10. Nishihara T, Matsumoto K, Hosoi Y, Morimoto Y. Evaluation of antioxidant status and oxidative stress markers in follicular fluid for human in vitro fertilization outcome. *Reprod Med Biol*. 2018 Aug 24;17(4):481-486. doi: 10.1002/rmb2.12229. PMID: 30377403; PMCID: PMC6194301.
11. Zal F, Ahmadi P, Davari M, Khademi F, Jahromi MA, Anvar Z, Jahromi BN. Glutathione-dependent enzymes in the follicular fluid of the first-retrieved oocyte and their impact on oocyte and embryos in polycystic ovary syndrome: A cross-sectional study. *Int J Reprod Biomed*. 2020 Jun 30;18(6):415-424. doi: 10.18502/ijrm.v13i6.7283. PMID: 32754677; PMCID: PMC7340988.
12. Panner Selvam, M.K.; Agarwal, A.; Henkel, R.; Finelli, R.; Robert, K.A.; Iovine, C.; Baskaran, S. The effect of oxidative and reductive stress on semen parameters and functions of physiologically normal human spermatozoa. *Free Radic. Biol. Med*. 2020, 152, 375–385.

13. Dutta, S.; Majzoub, A.; Agarwal, A. Oxidative stress and sperm function: A systematic review on evaluation and management. *Arab. J. Urol.* 2019, 17, 87–97.
14. Barati E, Nikzad H, Karimian M. Oxidative stress and male infertility: current knowledge of pathophysiology and role of antioxidant therapy in disease management, *Cell Mol Life Sci.* 2020 Jan;77(1):93-113. doi: 10.1007/s00018-019-03253-8. Epub 2019 Aug 3.
15. Liu J, Li Y. Effect of oxidative stress and apoptosis in granulosa cells on the outcome of IVF-ET. 2010 Sep;35(9):990-4. Chinese. doi: 10.3969/j.issn.1672-7347.2010.09.015. PMID: 20871166.
16. Terao H, Wada-Hiraike O, Nagumo A, Kunitomi C, Azhary JMK, Harada M, Hirata T, Hirota Y, Koga K, Fujii T, Osuga Y. Role of oxidative stress in follicular fluid on embryos of patients undergoing assisted reproductive technology treatment, *J Obstet Gynaecol Res.* 2019 Sep;45(9):1884-1891. doi: 10.1111/jog.14040. Epub 2019 Jul 1.
17. Tulić L, Vidaković S, Tulić I, Čurčić M, Stojnić J, Jeremić K. Oxidative Stress Markers in GnRH Agonist and Antagonist Protocols in IVF. *J Med Biochem.* 2017 Apr 22;36(2):163-170. doi: 10.1515/jomb-2017-0001. PMID: 28680360; PMCID: PMC5471649.
18. Florou P, Anagnostis P, Theocharis P, Chourdakis M, Goulis DG. Does coenzyme Q10 supplementation improve fertility outcomes in women undergoing assisted reproductive technology procedures? A systematic review and meta-analysis of randomized-controlled trials. *J Assist Reprod Genet.* 2020 Oct;37(10):2377-2387. doi: 10.1007/s10815-020-01906-3. Epub 2020 Aug 7. PMID: 32767206; PMCID: PMC7550497.
19. Tamura H, Jozaki M, Tanabe M, Shirafuta Y, Mihara Y, Shinagawa M, Tamura I, Maekawa R, Sato S, Taketani T, Takasaki A, Reiter RJ, Sugino N. Importance of Melatonin in Assisted Reproductive Technology and

- Ovarian Aging. *Int J Mol Sci.* 2020 Feb 8;21(3):1135. doi: 10.3390/ijms21031135. PMID: 32046301; PMCID: PMC7036809.
20. Amini L, Chekini R, Nateghi MR, Haghani H, Jamialahmadi T, Sathyapalan T, Sahebkar A. The Effect of Combined Vitamin C and Vitamin E Supplementation on Oxidative Stress Markers in Women with Endometriosis: A Randomized, Triple-Blind Placebo-Controlled Clinical Trial. *Pain Res Manag.* 2021 May 26;2021:5529741. doi: 10.1155/2021/5529741. PMID: 34122682; PMCID: PMC8172324.
21. Orvieto, R.; Shimon, C.; Rienstein, S.; Jonish-Grossman, A.; Shani, H.; Aizer, A. Do human embryos have the ability of self-correction? *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2020, 18, 98.
22. Otasevic V, Kalezic A, Macanovic B, Jankovic A, Stancic A, Garalejic E, Korac A, Korac B., Evaluation of the antioxidative enzymes in the seminal plasma of infertile men: Contribution to classic semen quality analysis, *yst Biol Reprod Med*; 2019 Oct;65(5):343-349.
23. Panner Selvam M.K., Agarwal A., Baskaran S.; Proteomic analysis of seminal plasma from bilateral varicocele patients indicates an oxidative state and increased inflammatory response, *Asian J Androl* 2019;21:544-50
24. Huang C, Cao X, Pang D, Li C., Luo Q, Zou Y, Feng B, Li L, Cheng A, Chen Z ,Is male infertility associated with increased oxidative stress in seminal plasma? A-meta analysis. *Oncotarget.* 2018 May 11;9(36):24494-24513. doi: 10.18632/oncotarget.25075. eCollection 2018 May 11.
25. Xie D, Lu C, Zhu Y, Zhu S, Yang EJ, Jin X., Analysis on the association between sperm DNA fragmentation index and conventional semen parameters, blood microelements and seminal plasma ROS in male patients with infertility, *Exp Ther Med.* 2018 Jun;15(6):5173-5176. doi: 10.3892/etm.2018.6115. Epub 2018 May 2.

26. Hansen, J.M.; Jones, D.P.; Harris, C. The Redox Theory of Development. *Antioxid. Redox Signal.* 2020, 32, 715–740.
27. Smits, R.M.; Mackenzie-Proctor, R.; Yazdani, A.; Stankiewicz, M.T.; Jordan, V.; Showell, M.G. Antioxidants for male subfertility. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2019, 3, Cd007411.
28. Showell, M.G.; Mackenzie-Proctor, R.; Jordan, V.; Hart, R.J. Antioxidants for female subfertility. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2020, 8, Cd007807
29. Houghton, F.D. HYPOXIA AND REPRODUCTIVE HEALTH: Hypoxic regulation of preimplantation embryos: Lessons from human embryonic stem cells. *Reproduction* 2021, 161, F41–F51.
30. Subramanian V, Ravichandran A, Thiagarajan N, Govindarajan M, Dhandayuthapani S, Suresh S., Seminal reactive oxygen species and total antioxidant capacity: Correlations with sperm parameters and impact on male infertility, *Clin Exp Reprod Med.* 2018 Jun;45(2):88-93. doi: 10.5653/cerm.2018.45.2.88. Epub 2018 Jun 29.
31. Barik G, Chaturvedula L, Bobby Z. Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Male Infertility: An Interventional Study. *J Hum Reprod Sci.* 2019 Jul-Sep;12(3):204-209. doi: 10.4103/jhrs.JHRS_135_18. PMID: 31576077; PMCID: PMC6764234.
32. Alahmar AT, Sengupta P., Impact of Coenzyme Q10 and Selenium on Seminal Fluid Parameters and Antioxidant Status in Men with Idiopathic Infertility, *Biol Trace Elem Res.* 2021 Apr;199(4):1246-1252. doi: 10.1007/s12011-020-02251-3. Epub 2020 Jun 22.
33. Sadaghiani S, Fallahi S, Heshmati H, Teshnizi SH, Chaijan HA, Ebrahimi FFA, Khorrami F, Poorrezaeian M, Alizadeh F., Effect of antioxidant supplements on sperm parameters in infertile male smokers: a single-

- blinded clinical trial, *AIMS Public Health*. 2020 Feb 11;7(1):92-99. doi: 10.3934/publichealth.2020009. eCollection 2020. PMID: 32258192
34. Alahmar AT, Sengupta P. Impact of Coenzyme Q10 and Selenium on Seminal Fluid Parameters and Antioxidant Status in Men with Idiopathic Infertility. *Biol Trace Elem Res*. 2021 Apr;199(4):1246-1252. doi: 10.1007/s12011-020-02251-3. Epub 2020 Jun 22. PMID: 32572802.
35. Zorn B, Vidmar G, Meden-Vrtovec H. Seminal reactive oxygen species as predictors of fertilization, embryo quality and pregnancy rates after conventional in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Int J Androl*. 2003 Oct;26(5):279-85. doi: 10.1046/j.1365-2605.2003.00424.x. PMID: 14511216.
36. Nazari L, Salehpour S, Hosseini S, Allameh F, Jahanmardi F, Azizi E, Ghodssi-Ghassemabadi R, Hashemi T. Effect of antioxidant supplementation containing L-carnitine on semen parameters: a prospective interventional study. *JBRA Assist Reprod*. 2021 Feb 2;25(1):76-80. doi: 10.5935/1518-0557.20200043. PMID: 32598834; PMCID: PMC7863100.
37. Haeri F, Nouri M, Nezamoleslami S, Moradi A, Ghiasvand R., Role of dietary antioxidants and vitamins intake in semen quality parameters: A cross-sectional study, *Clin Nutr ESPEN*. 2022 Apr;48:434-440. doi: 10.1016/j.clnesp.2022.01.005. Epub 2022 Jan 10. PMID: 35331525
38. Gualtieri, R.; Kalthur, G.; Barbato, V.; Longobardi, S.; Di Rella, F.; Adiga, S.K.; Talevi, R. Sperm Oxidative Stress during In Vitro Manipulation and Its Effects on Sperm Function and Embryo Development. *Antioxidants* 2021, 10, 1025.
39. Gangwar, R.S.; Bevan, G.H.; Palanivel, R.; Das, L.; Rajagopalan, S. Oxidative stress pathways of air pollution mediated toxicity: Recent insights. *Redox Biol*. 2020, 34, 101545.

40. Sciorio, R.; Rapalini, E.; Esteves, S.C. Air quality in the clinical embryology laboratory: A mini-review. *Ther. Adv. Reprod. Health* 2021, 15, 2633494121990684
41. Hansen, J.M.; Jones, D.P.; Harris, C. The Redox Theory of Development. *Antioxid. Redox Signal.* 2020, 32, 715–740
42. Ng, K.Y.B.; Mingels, R.; Morgan, H.; Macklon, N.; Cheong, Y. In vivo oxygen, temperature and pH dynamics in the female reproductive tract and their importance in human conception: A systematic review. *Hum. Reprod. Update* 2018, 24, 15–34.
43. Bontekoe, S.; Mantikou, E.; van Wely, M.; Seshadri, S.; Repping, S.; Mastenbroek, S. Low oxygen concentrations for embryo culture in assisted reproductive technologies. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2012, 7
44. Huang CH, Chan WH. Rhein Induces Oxidative Stress and Apoptosis in Mouse Blastocysts and Has Immunotoxic Effects during Embryonic Development. *Int J Mol Sci.* 2017 Sep 20;18(9):2018. doi: 10.3390/ijms18092018. PMID: 28930172; PMCID: PMC5618666.
45. Belli, M.; Antonouli, S.; Palmerini, M.G.; Bianchi, S.; Bernardi, S.; Khalili, M.A.; Donfrancesco, O.; Nottola, S.A.; Macchiarelli, G. The effect of low and ultra-low oxygen tensions on mammalian embryo culture and development in experimental and clinical IVF. *Syst. Biol. Reprod. Med.* 2020, 66, 229–235
46. Herbemont, C.; Labrosse, J.; Bennani-Smires, B.; Cedrin-Durnerin, I.; Peigne, M.; Sermondade, N.; Sarandi, S.; Vivot, A.; Vicaut, E.; Talib, Z.; et al. Impact of oxygen tension according to embryo stage of development: A prospective randomized study. *Sci. Rep.* 2021, 11, 22313.

47. Kaser, D.J.; Bogale, B.; Sarda, V.; Farland, L.V.; Williams, P.L.; Racowsky, C. Randomized controlled trial of low (5%) versus ultralow (2%) oxygen for extended culture using bipronucleate and tripronucleate human preimplantation embryos. *Fertil. Steril.* 2018, 109, 1030–1037.e2.
48. De Munck, N.; Janssens, R.; Segers, I.; Tournaye, H.; Van de Velde, H.; Verheyen, G. Influence of ultra-low oxygen (2%) tension on in-vitro human embryo development. *Hum. Reprod.* 2019, 34, 228–234.
49. Truong T, Gardner DK. Antioxidants improve IVF outcome and subsequent embryo development in the mouse. *Hum Reprod.* 2017 Dec 1;32(12):2404-2413. doi: 10.1093/humrep/dex330. PMID: 29136144.
50. Maside C, Martinez CA, Cambra JM, Lucas X, Martinez EA, Gil MA, Rodriguez-Martinez H, Parrilla I, Cuello C. Supplementation with exogenous coenzyme Q10 to media for in vitro maturation and embryo culture fails to promote the developmental competence of porcine embryos. *Reprod Domest Anim.* 2019 Oct;54 Suppl 4:72-77. doi: 10.1111/rda.13486. PMID: 31625244.
51. Kim MK, Park JK, Paek SK, Kim JW, Kwak IP, Lee HJ, Lyu SW, Lee WS. Effects and pregnancy outcomes of L-carnitine supplementation in culture media for human embryo development from in vitro fertilization. *J Obstet Gynaecol Res.* 2018 Nov;44(11):2059-2066. doi: 10.1111/jog.13763. Epub 2018 Aug 1. PMID: 30066982.
52. Кириенко К.В., Апрышко В.П., Харитоновна М.А., Ермилова И.Ю., Конькова А.Л., Болт А.И., Клепуков А.А., Миронова А.Г., Наумова А.А., Бозина Я.В., Стрейф А.Б., Симоненко Е.Ю., Яковенко С.А. Культивирование эмбрионов человека в среде с различным содержанием мелатонина. *Проблемы репродукции.* 2018;24(2):69-74.
53. Li, W.; Goossens, K.; Van Poucke, M.; Forier, K.; Braeckmans, K.; Van Soom, A.; Peelman, L.J. High oxygen tension increases global

- methylation in bovine 4-cell embryos and blastocysts but does not affect general retrotransposon expression. *Reprod. Fertil. Dev.* 2016, 28, 948–959.
54. Zander-Fox, D.L.; Mitchell, M.; Thompson, J.G.; Lane, M. Alterations in mouse embryo intracellular pH by DMO during culture impair implantation and fetal growth. *Reprod. Biomed. Online* 2010, 21, 219–229
55. Feuer, S.; Liu, X.; Donjacour, A.; Simbulan, R.; Maltepe, E.; Rinaudo, P. Common and specific transcriptional signatures in mouse embryos and adult tissues induced by in vitro procedures. *Reproduction* 2016.
56. Ramos-Ibeas, P.; Heras, S.; Gómez-Redondo, I.; Planells, B.; Fernández-González, R.; Pericuesta, E.; Laguna-Barraza, R.; PérezCerezales, S.; Gutiérrez-Adán, A. Embryo responses to stress induced by assisted reproductive technologies. *Mol. Reprod. Dev.* 2019, 86, 1292–1306
57. Gupta, S.; Finelli, R.; Agarwal, A.; Henkel, R. Total antioxidant capacity- Relevance, methods and clinical implications. *Andrologia* 2021, 53, e13624.
58. Sharma R, Harlev A, Agarwal A, Esteves SC. Cigarette Smoking and Semen Quality: A New Meta-analysis Examining the Effect of the 2010 World Health Organization Laboratory Methods for the Examination of Human Semen. *Eur Urol.* 2016 Oct;70(4):635-645. doi: 10.1016/j.eururo.2016.04.010. Epub 2016 Apr 21. PMID: 27113031.
59. Lone SA, Mohanty TK, Baithalu RK, Yadav HP. Sperm protein carbonylation. *Andrologia.* 2019 May;51(4):e13233. doi: 10.1111/and.13233. Epub 2019 Jan 13. PMID: 30637798.
60. Mejlhede MAB, Jepsen JB, Knudsen UB., Oral melatonin supplementation during in vitro fertilization treatment: a systematic PRISMA review and meta-analysis of randomized controlled trials,

- Gynecol Endocrinol. 2021 Dec;37(12):1079-1085. doi: 10.1080/09513590.2021.1974378. Epub 2021 Sep 8. PMID: 34494508
61. Amini L, Chekini R, Nateghi MR, Haghani H, Jamialahmadi T, Sathyapalan T, Sahebkar A., The Effect of Combined Vitamin C and Vitamin E Supplementation on Oxidative Stress Markers in Women with Endometriosis: A Randomized, Triple-Blind Placebo-Controlled Clinical Trial, Pain Res Manag. 2021 May 26;2021:5529741. doi: 10.1155/2021/5529741. eCollection 2021. PMID: 34122682
62. Smits, R.M.; Mackenzie-Proctor, R.; Yazdani, A.; Stankiewicz, M.T.; Jordan, V.; Showell, M.G. Antioxidants for male subfertility. Cochrane Database Syst. Rev. 2019, 3, Cd007411
63. Showell, M.G.; Mackenzie-Proctor, R.; Jordan, V.; Hart, R.J. Antioxidants for female subfertility. Cochrane Database Syst. Rev. 2020, 8.
64. Bellver J. BMI and miscarriage after IVF. Curr Opin Obstet Gynecol. 2022 Jun 1;34(3):114-121.
65. Retraction. J Cell Physiol. 2022 Feb;237(2):1629. doi: 10.1002/jcp.30482. Epub 2021 Jun 30. PMID: 34191282.
66. Гамидов С.И., Шатылко Т.В., Ли К.И., Гасанов Н.Г., Роль антиоксидантных молекул в терапии мужского бесплодия и подготовке мужчины к зачатию ребенка, 2020.
67. Сыркашева, А. Г. Роль антиоксидантной терапии в повышении эффективности программ вспомогательных репродуктивных технологий / А. Г. Сыркашева, Н. В. Долгушина // Медицинский совет. – 2021. – № 12. – С. 353-359. – DOI 10.21518/2079-701X-2021-12-353-359. – EDN LRHHEJ.