

*На правах рукописи*

**СЫРКАШЕВА**

Анастасия Григорьевна

**ПРОФИЛАКТИКА НАРУШЕНИЙ РЕПРОДУКТИВНОЙ  
ФУНКЦИИ, ОБУСЛОВЛЕННЫХ НЕБЛАГОПРИЯТНЫМ  
ВЛИЯНИЕМ АНТРОПОГЕННЫХ ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ, НА  
ОСНОВАНИИ ДИФФЕРЕНЦИРОВАННОГО ПОДХОДА К  
ПРЕГРАВИДАРНОЙ ПОДГОТОВКЕ**

3.1.4. Акушерство и гинекология

**Автореферат**

диссертации на соискание ученой степени

доктора медицинских наук

Москва 2022

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

**Научный консультант:**

доктор медицинских наук, профессор Долгушина Наталия Витальевна

**Официальные оппоненты:**

**Коган Игорь Юрьевич** – член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор, ФГБНУ "Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта" Минобрнауки России, директор.

**Башмакова Надежда Васильевна** – доктор медицинских наук, профессор, заслуженный врач РФ, ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт охраны материнства и детства», главный научный сотрудник.

**Рудакова Елена Борисовна** – доктор медицинских наук, профессор, заслуженный врач РФ, отделение вспомогательных репродуктивных технологий ГБУЗ МО «Московский областной перинатальный центр», научный консультант.

**Ведущая организация:** федеральное государственное бюджетное учреждение «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства имени В.Н. Городкова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «20» декабря 2022 года в 13.00 часов на заседании диссертационного совета 21.1.022.01 на базе ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. В. И. Кулакова» Минздрава России по адресу: 117997, Москва, ул. Академика Опарина, д. 4.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

<https://science.ncagp.ru/upfiles/pdf/Syrkasheva%20AG-disser.pdf?757992227>

Автореферат разослан « \_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2022 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета,

доктор медицинских наук, профессор

Калинина Елена Анатольевна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы

Основным фактором, определяющим успех наступления беременности, является качество гамет – сперматозоидов и ооцитов.

Роль генетических факторов в снижении качества как женских, так и мужских половых клеток, изучена во многих исследованиях (Budhwar S. *et al.*, 2017; Kristensen S., Humaidan P., and Coetzee K., 2019). При этом влияние эпигенетических факторов на фертильность человека, прежде всего на качество гамет, является перспективной и малоизученной областью репродуктивной медицины.

Репродуктивная система человека уязвима к воздействию антропогенных химических веществ (АХВ). Многие АХВ являются эндокринными разрушителями, т.е. могут влиять на биосинтез половых и других гормонов. Также АХВ негативно влияют на митотическое и мейотическое деление, приводя к нарушению оогенеза, сперматогенеза, и раннего эмбрионального развития (Canipari R., De Santis L, and Cecconi S., 2020; Chianese R., 2018; Gallo A., Boni R., and Tosti E., 2020; Salas-Huetos A. *et al.*, 2019). По данным различных исследований, повышенное содержание АХВ ассоциировано с нарушениями менструального цикла (Bjørklund G. *et al.*, 2019; Kumar R., and Sharma A., 2019), снижением эффективности циклов вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) (Chianese R., 2018; Wu H. *et al.*, 2020), повышенным риском невынашивания беременности (Johns D. *et al.*, 2017), задержки роста плода (Казанцева Е. В. *и др.*, 2016) и врожденных аномалий развития (Bjørklund G. *et al.*, 2019).

Нейтрализация токсических веществ в организме человека осуществляется с помощью ферментов системы детоксикации. Гены, кодирующие белки-ферменты системы детоксикации, представлены генами семейств: глутатион-S-трансферазы (*GST: GSTT1, GSTM1, GSTP1*), глутатион пероксидазы (*GPX1*), супероксид дисмутазы (*SOD2, SOD3*), трансфераз (например, N-ацетилтрансфераза 2 - *NAT2* и сульфотрансфераза 1A1 -

*SULT1A1*), гидролаз (эпоксид гидролаза1 - *EPHX1*), цитохромов (цитохром P450 - *CYP1A1*) и др. Несмотря на то, что система детоксикации определяет восприимчивость организма к различным экзогенным воздействиям, роль полиморфизма генов системы детоксикации в репродуктивных исходах не определена. При этом сочетанное воздействие повышенных концентраций АХВ и аллельных вариантов генов системы детоксикации, предрасполагающих к накоплению данных веществ, может оказывать негативное воздействие на здоровье человека, что продемонстрировано на модели развития аллергических, легочных и сердечно-сосудистых заболеваний (Choi M., Kim H., and Hong Y., 2013; Piacentini S. *et al.*, 2010; Su H. *et al.*, 2020).

Прегавидарная подготовка, как перед беременностью, достигаемой естественным путем, так и перед беременностью, достигаемой с помощью ВРТ, включающая необходимый перечень обследований, прием некоторых витаминов и микроэлементов, ведение здорового образа жизни (ЗОЖ) и рекомендации по снижению неблагоприятного эпигенетического воздействия на гамету перед планируемой беременностью, является одним из основополагающих составляющих здоровья будущего потомства (Grieger J. *et al.*, 2018; Jankovic-Karasoulos T. *et al.*, 2021). Разработка мер по снижению экспозиции АХВ на прегавидарном этапе и во время беременности является актуальной задачей здравоохранения, способствующей повышению репродуктивного потенциала, рождаемости и улучшению здоровья детей (Mate A. *et al.*, 2021). В условиях антропогенного загрязнения дополнительной эффективной мерой для снижения накопления АХВ в организме может быть назначение лекарственных препаратов с детоксикационным и антиоксидантным действием (Showell M. *et al.*, 2020; Yao D. and Mills J., 2016). Наибольшие преимущества от назначения данных лекарственных препаратов следует ожидать у пациентов с повышенной экспозицией АХВ, а также у пациентов с неблагоприятным аллельным состоянием генов системы детоксикации.

Цель исследования:

Оптимизация прегравидарной подготовки на основании изучения генетических особенностей системы детоксикации, уровня антропогенных химических веществ и эффективности мер по снижению антропогенной химической нагрузки, на модели пациенток с бесплодием в программах вспомогательных репродуктивных технологий.

Задачи исследования:

1. Выявить факторы риска повышенной экспозиции антропогенных химических веществ (АХВ) у пациенток с бесплодием на основании анкетирования.
2. Оценить содержание некоторых АХВ (свинца, кадмия, ртути, стирола в крови, бисфенола А (БФА) в крови и фолликулярной жидкости) у пациенток, проходящих лечение в программах ВРТ, и выявить взаимосвязь между уровнем данных АХВ и показателями оогенеза с учетом клинико-лабораторных данных пациенток.
3. Оценить содержание стирола и БФА в крови партнеров пациенток, проходящих лечение в программах ВРТ, и выявить взаимосвязь между уровнем данных АХВ и показателями спермограммы с учетом клинико-лабораторных данных пациентов.
4. Изучить связь между уровнем АХВ в организме женщин и полиморфными вариантами генов системы детоксикации.
5. Проанализировать результаты программ ВРТ (показатели раннего эмбриогенеза, частоту наступления беременности, выкидыша, родов живым плодом) в зависимости от клинико-anamnestических, лабораторных, эмбриологических данных, а также уровня АХВ в организме пациенток и генотипа системы детоксикации.
6. Оценить репродуктивные исходы у пациентов с бесплодием при модификации образа жизни на основании повторного анкетирования.

7. Оценить исходы программ ВРТ у пациенток с бесплодием при назначении препаратов с антиоксидантным действием (полиненасыщенные жирные кислоты, коэнзим Q10).

8. Оценить исходы программ ВРТ у пациенток с бесплодием в зависимости от уровня витамина Д в крови с учетом полиморфизма гена рецептора витамина Д и содержания АХВ в организме пациенток.

9. Разработать алгоритм по дифференцированной прегравидарной подготовке с учетом факторов риска экспозиции АХВ, уровня АХВ и генотипа системы детоксикации.

#### Научная новизна

В ходе проведения исследования были получены следующие новые знания:

- Разработана анкета, на основании которой определены факторы риска экспозиции АХВ.

- Проведено исследование содержания АХВ в организме пациентов с бесплодием в программах ВРТ.

- Установлено негативное влияние повышенного содержания АХВ на качество гамет, эмбрионов и результаты программ ВРТ.

- Определена роль генетических особенностей системы детоксикации в накоплении АХВ в организме пациенток и результаты программ ВРТ.

- Изучена связь между содержанием АХВ и уровнем витамина Д у пациенток с бесплодием.

- Проведена оценка репродуктивных исходов при модификации образа жизни, направленной на снижение антропогенной химической нагрузки.

- Проанализирована эффективность назначения препаратов с антиоксидантным эффектом на прегравидарном этапе у пациенток с бесплодием.

### Практическая значимость

Создана шкала экспозиции АХВ на модели пациенток с бесплодием.

Выявлены факторы риска повышенной экспозиции АХВ у пациенток с бесплодием.

Проведена оценка влияния модификации образа жизни, направленного на снижение антропогенной химической нагрузки, на результаты программ ВРТ.

Определены аллельные варианты генов детоксикации, предрасполагающие к накоплению различных АХВ в организме пациенток.

Патогенетически обосновано назначение препаратов с антиоксидантным действием на этапе прегравидарной подготовки.

Создан алгоритм прегравидарной подготовки на основании изученных факторов риска, определения уровня АХВ и молекулярно-генетических особенностей пациенток.

### Положения, выносимые на защиту

1. Повышенная антропогенная нагрузка увеличивает риск негативных исходов программ ВРТ: частота выкидыша увеличивается в 1,6 раза, частота наступления беременности снижается в 1,4 раза, а частота родов – в 1,5 раза. Содержание АХВ определяется особенностями образа жизни пациенток, в первую очередь, особенностями питания.

2. Накопление АХВ в организме зависит от аллельных сочетаний генов системы детоксикации. Содержание в организме тяжелых металлов увеличивается при наличии делеции гена *GSTT1*, отсутствии аллеля G гена *GSTP1*, наличии аллеля T гена *CYP1A1*, отсутствии аллеля A гена *SULT1A1*. Содержание в организме органических веществ увеличивается при наличии делеции гена *GSM*, наличии аллеля G гена *NAT2* и аллеля C гена *GSTP1*, отсутствии аллеля C гена *SOD* и аллеля A гена *SULT1A1*. Сочетанное воздействие повышенного уровня антропогенных химических веществ и генетических особенностей системы детоксикации снижает вероятность наступления беременности за счет снижения качества эмбрионов.

3. Модификация образа жизни, направленная на снижение экспозиции к АХВ, улучшает репродуктивные исходы у пациенток с бесплодием. На прегравидарном этапе модификация образа жизни совместно с назначением препаратов с антиоксидантным действием по сравнению только с назначением препаратов с антиоксидантным действием увеличивает частоту наступления беременности на 7,2%, по сравнению с отсутствием каких-либо назначений - на 23,2%.

4. Применение препаратов с антиоксидантным действием на прегравидарном этапе у пациенток с бесплодием улучшает результаты программ ВРТ: частота наступления беременности увеличивается в 1,6 раза, а частота родов – в 1,8 раза. Для достижения 1 случая наступления беременности в программах ВРТ препараты с антиоксидантным действием должны получить 9 пациенток.

#### Личный вклад автора

Автор участвовал в выборе темы научной работы, разработке цели и задач исследования, в проведении и интерпретации результатов лабораторных исследований, в обобщении и статистической обработке полученных данных. Автором лично осуществлялось обследование и ведение пар с бесплодием на всех этапах ВРТ.

#### Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 3.1.4 – «акушерство и гинекология». Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пунктам 1, 3, 4 и 5 паспорта акушерства и гинекологии.

#### Апробация результатов

Основные положения работы доложены на XVIII Всероссийском форуме «Мать и дитя» (Москва, 2017), XIX Всероссийском форуме «Мать и дитя» (Москва, 2018), XXI Всероссийском форуме «Мать и дитя» (Москва, 2020), XXII Всероссийском форуме «Мать и дитя» (Москва, 2021), XIV Региональном научно-образовательном форуме «Мать и дитя» (Москва,



2021), XXXI Международной конференции РАРЧ (Сочи, 2021), Научно-практическом конгрессе «Гинекологическая эндокринология в возрастном аспекте: проблемы и решения» (Москва, 2021), XXVII Всероссийском конгрессе с международным участием «Амбулаторно-поликлиническая помощь в эпицентре женского здоровья от менархе до менопаузы» (Москва, 2021). Работа доложена на заседании апробационной комиссии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России 16 мая 2022 года.

#### Внедрение результатов исследования в практику

Результаты исследования внедрены и используются в практической работе отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия им. проф. Б. В. Леонова и лаборатории молекулярно-генетических методов ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России. Результаты исследования изложены в 20 печатных работах, из которых 10 оригинальных статей напечатаны в рецензируемых научных журналах, рекомендуемых ВАК.

#### Структура и объем диссертации

Диссертация изложена в традиционной форме. Состоит из оглавления, списка принятых сокращений, введения, обзора литературы, глав собственных исследований, обсуждения полученных результатов, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Работа представлена на 214 страницах машинописного текста, иллюстрирована 10 рисунками и 28 таблицами. Библиографический указатель включает 25 работ на русском языке и 292 работы на английском языке.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Материал и методы исследования

Исследование проводилось на базе ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (директор - академик РАН Г.Т. Сухих). Набор пациентов осуществлялся в отделении вспомогательных технологий в лечении бесплодия им. проф. Б.В. Леонова (заведующий - д.м.н., профессор Е.А. Калинина). Лабораторные исследования проводились в отделе системной биологии в репродукции (заведующий – д.ф.-м.н. В. Е. Франкевич) и в лаборатории молекулярно-генетических методов (заведующий - к.м.н. А.Е. Донников).

Для решения поставленных задач было проведено проспективное исследование. С января 2017 года по декабрь 2019 года для участия в исследовании были отобраны 480 пациенток с бесплодием. На проведение исследования было получено разрешение комиссии по этике биомедицинских исследований ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России, все пациенты подписали информированное добровольное согласие на участие в исследовании.

Для первого этапа исследования были отобраны 300 супружеских пар с бесплодием, всем пациенткам определяли уровень АХВ и генотип системы детоксикации. Для оценки факторов риска, ассоциированных с повышенной экспозицией АХВ, была создана и валидирована анкета, после чего проведено анкетирование включенных в исследование пациенток. Создана шкала баллов для разделения пациенток на группы в зависимости от суммарного уровня АХВ в организме, группу 1 составили 109 пациенток с высоким уровнем АХВ, группу 2 составили 191 пациентка с низким уровнем АХВ (высокий и низкий уровень АХВ определяли на основании медианы суммы баллов уровня каждого из оцененных АХВ:  $\geq 5$  баллов – высокий уровень,  $< 5$  баллов – низкий уровень) (Рисунок 1).



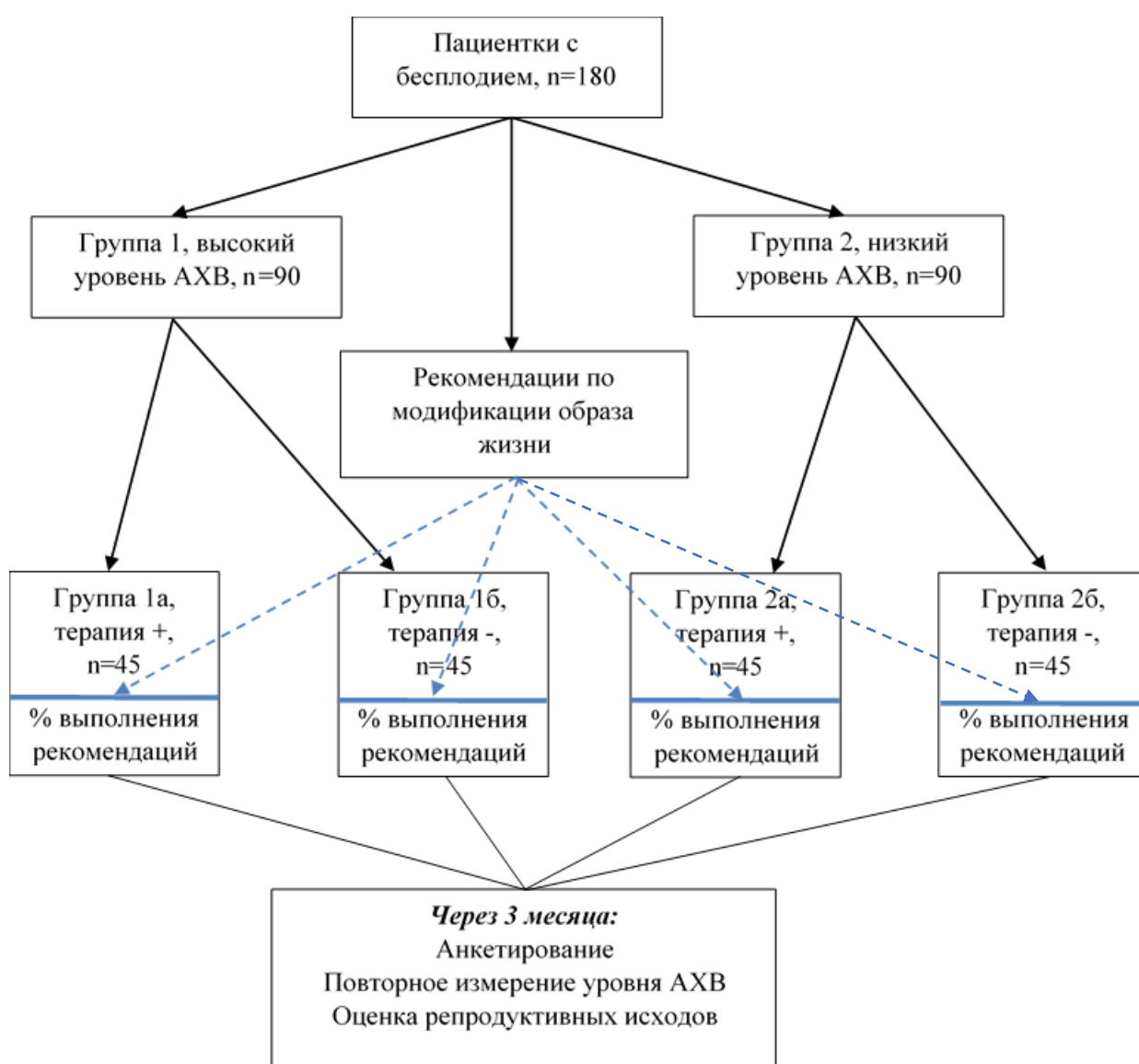
**Рис. 1.** Дизайн первого этапа исследования.

В результате первого этапа исследования были определены факторы образа жизни, ассоциированные с повышенной экспозицией АХВ. Проведена оценка влияния уровня АХВ на репродуктивные исходы, изучена связь АХВ с генотипом системы детоксикации

Также пациентки были стратифицированы на 2 группы в зависимости от наступления беременности в данной программе ВРТ для учета вмешивающихся факторов на результат программы ВРТ: группа I (беременность наступила, n=136) и группа II (беременность не наступила, n=164).

Для проведения второго этапа исследования были отобраны 180 пациенток. Всем пациенткам рекомендовали модификацию образа жизни на основании данных, полученных на первом этапе исследования. Пациентки были рандомизированы на 4 группы в зависимости от исходного уровня АХВ и назначения препаратов с антиоксидантным действием: группу 1а составили 45 пациенток с высоким уровнем АХВ, получавших препараты с антиоксидантным действием, группу 1б – 45 пациенток с высоким уровнем АХВ, не получавших препараты с антиоксидантным действием, группу 2а составили 45 пациенток с низким уровнем АХВ, получавших препараты с антиоксидантным действием, группу 2б – 45 пациенток с низким уровнем АХВ, не получавших препараты с антиоксидантным действием.

Препараты с антиоксидантным действием назначали в течение 3-х менструальных циклов перед вступлением в цикл ВРТ. Использовали комбинацию пероральных антиоксидантов: коэнзим Q10 300 мг/сутки, эйкозапентаеновая кислота 300 мг/сутки, докозагексаеновая кислота 200 мг/сутки перорально. Во время проведения цикла ВРТ производили повторное определение уровня АХВ в организме. На основании повторного анкетирования определяли долю пациенток, соблюдавших рекомендации по модификации образа жизни. В результате второго этапа исследования была определена эффективность препаратов с антиоксидантным действием (Рисунок 2).



**Рис. 2.** Дизайн второго этапа исследования.

Были использованы следующие критерии включения для пациентов:

- нормальный кариотип обоих супругов;
- возраст пациенток 18-37 лет;
- индекс массы тела 18,5-29,9 кг/м<sup>2</sup>;
- отсутствие противопоказаний к ВРТ;
- проживание на территории города Москва и/или Московской области

на протяжении минимум 5 лет на момент включения в исследование.

Критерии исключения из исследования:

- использование донорских ооцитов в изучаемом цикле ВРТ, программа суррогатного материнства;
- со стороны супруга – абсолютная астенозооспермия, 100% тератозооспермия, криптозооспермия, хирургическая экстракция сперматозоидов;
- получение 3-х и менее ооцитов в изучаемом цикле ВРТ;
- прием пероральных антиоксидантов в течение 6 месяцев перед проведением исследования;
- верифицированные заболевания печени, гепатиты В и С, ВИЧ-инфекция;
- наличие противопоказаний для приема антиоксидантов (для задачи 5).

Супружеские пары были обследованы в соответствии с действующими нормативно-правовыми документами Минздрава России.

К специальным методам исследования относили масс-спектрометрические исследования (метод масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой и метод хромато-масс-спектрометрии) для определения уровня кадмия, свинца, ртути, стирола и бисфенола А (БФА) в крови и фолликулярной жидкости пациенток, а также молекулярно-генетические исследования (определение генотипов глутатион S-трансферазы M1 (*GSTM1*), глутатион S-трансферазы T1 (*GSTT1*), глутатион-S-трансферазы P1 (*GSTP1*), N-ацетил трансферазы 2 (*NAT2*), глутатион пероксидазы 1 (*GPX1*),

эпоксид гидролазы 1 (*EPHX1*), цитохрома P450 (*CYP1A1*), сульфотрансферазы 1A1 (*SULT1A1*) в крови пациенток методом ПЦР в реальном времени.

Овариальную стимуляцию во всех изученных протоколах ВРТ проводили по протоколу с ант-ГнРГ. Трансвагинальная пункция яичников, культивирование и перенос эмбрионов, ведение посттрансферного периода и диагностика беременности осуществлялись по стандартизированным методикам. Образцы фолликулярной жидкости (ФЖ) отбирали непосредственно после извлечения ооцитов. Для анализа были отобраны образцы ФЖ из первых 2-3 аспирированных фолликулов. Образцы фолликулярной жидкости, контаминированные кровью, исключались из исследования.

Оценивали следующие исходы программ ВРТ: частота клинической беременности (визуализация плодного яйца в полости матки через 21 день после переноса эмбриона по данным ультразвуковой диагностики), частота выкидыша, частота родов живым плодом.

Статистическая обработка данных выполнялась с помощью пакета статистических программ «Statistica V10» (США), SPSS Statistics 22 (США).

#### Результаты собственных исследований и их обсуждение

При сравнении групп в зависимости от наступления беременности (группы I и II) не было выявлено значимых отличий за исключением частоты миомы матки (14,7% в группе I, 7,3% в группе II,  $p=0,0030$ ), и, соответственно, частоты миомэктомии в анамнезе (11,0% против 4,3%,  $p=0,0222$ ). Также число бластоцист, и, соответственно, уровень бластуляции были выше в группе пациенток с наступившей беременностью (0,50 в группе I, 0,33 в группе II,  $p<0,0001$ ) (Таблица 1).

Таблица 1. Клиническая характеристика пациенток с различными исходами программ ВРТ

Показатели	Группа I (n=136)	Группа II (n=164)	P***
Возраст пациентки, лет*	31,3±3,2	31,5±3,4	0,4486
Возраст партнера пациентки, лет*	33,1±5,1	33,8±4,6	0,2204
Миома матки, n (%)	20 (14,7%)	12 (7,3%)	<b>0,0030</b>
Миомэктомия в анамнезе, n (%)	15 (11,0%)	7 (4,3%)	<b>0,0222</b>
Число ооцитов**	8 (6-12)	9 (5-13)	0,7434
Число бластоцист**	3 (2-4)	2 (1-3)	<b>&lt;0,0001</b>
Уровень бластуляции**	0,50 (0,33-0,67)	0,33 (0,15-0,50)	<b>&lt;0,0001</b>

\*среднее значение ± стандартное отклонение; \*\* медиана (интерквартильный размах); \*\*\*  $\chi^2$ -тест для сравнения категориальных данных, t-тест/тест Манна-Уитни для сравнения непрерывных данных

Всем пациенткам был измерен уровень свинца, кадмия, ртути, стирола и БФА в крови, уровень БФА в фолликулярной жидкости.

Тяжелые металлы (ртуть, свинец, кадмий) определялись в образцах крови 100% пациенток. При проведении корреляционного анализа было отмечено, что уровень ртути находился в положительной корреляционной связи с уровнем свинца ( $r=0,1358$ ,  $p=0,0186$ ), уровень кадмия не имел значимой корреляционной связи с другими металлами.

Стирол, также, как и тяжелые металлы, был обнаружен в образцах крови всех пациенток, включенных в исследование. Бисфенол А был обнаружен в 92,0% (276/300) образцах крови и в 16,8% (49/291) образцах ФЖ пациенток (Таблица 2).

Таблица 2. Содержание АХВ в крови пациенток

	Минимум	Максимум	Медиана	Интерквартильный размах
Кадмий, мкг/л	0,100	3,669	0,317	0,230-0,451
Ртуть, мкг/л	0,055	11,760	0,805	0,413-1,447
Свинец, мкг/л	4,177	192,623	9,856	7,715-13,594
БФА в крови, нг/мл	0	56,43	0,52	0,19-0,66
Стирол в крови, нг/мл	1,30	52,5	8,85	5,65-13,5

Уровень БФА в крови не имел связи с уровнем БФА в ФЖ ( $p=0,3791$ ) и с уровнем стирола в крови ( $p=0,2492$ ). Также уровни органических соединений не имели корреляционной связи с уровнем тяжелых металлов у одних и тех же пациенток.

Для оценки факторов риска повышенной экспозиции АХВ была создана и валидирована анкета, включающая особенности образа жизни и социальный статус пациенток.

Перед использованием анкета была одобрена социологом и психологом, а также прошла пилотное тестирование. Результаты тестирования были следующими (Рисунок 3):

1) Алиментарный путь проникновения АХВ: (а) употребление рыбы было ассоциировано с повышенным уровнем ртути; (б) употребление консервированных продуктов из жестяных банок - с повышенным уровнем свинца, кадмия, БФА и стирола; (в) разогревание пластиковой посуды в микроволновой печи - с повышенным уровнем всех изученных АХВ; (г) употребление бутилированной воды в качестве основного источника питьевой воды - с повышенным уровнем стирола и БФА; (д) употребление водопроводной воды - с повышенным уровнем кадмия.

2) Ингаляционный путь проникновения АХВ: (а) курение было ассоциировано с повышенным уровнем свинца, кадмия и ртути; (б) низкая физическая активность - с повышенным уровнем свинца и стирола; (в) проживание на нижних (1-4) этажах - с повышенным уровнем свинца; (г) работа в тесном офисе - с повышенным уровнем свинца и стирола; (д) нахождение менее 1 часа в день на открытом воздухе - с повышенным уровнем кадмия и свинца.

3) Контактный путь проникновения АХВ: частое использование наличных денежных средств было ассоциировано с повышенным уровнем кадмия и свинца.



	Свинец	Кадмий	Ртуть	БФА	Стирол
Алкоголь	0,076	0,056	0,078	-0,040	0,039
Рыба	0,078	0,103	0,257**	0,081	0,096
Консервы (жестяные банки)	0,196**	0,256**	0,108	0,190**	0,140*
Готовая еда	0,182**	0,179**	0,114*	0,309**	0,195**
Микров. печь для пластика	0,156**	0,206**	0,140*	0,286**	0,179**
Напитки из пласт. бутылок	0,089	0,033	0,040	0,156**	0,246**
Наличные деньги	0,207**	0,173**	-0,012	0,085	0,013

**Рис. 3.** Корреляция между частотой употребления различных продуктов и уровнем АХВ; коэффициент Пирсона, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$

Далее была разработана условная шкала для оценки суммарного уровня АХВ в организме. В случае, если уровень вещества превышал медианный уровень – присваивался 1 балл, верхний квартиль – 2 балла, 97,5 перцентиль – 3 балла. В случае, если уровень вещества не превышал медианный уровень, пациентке присваивали 0 баллов. Таким образом, каждой пациентке было присвоено определенное количество баллов, возможный диапазон числа баллов составил от 0 до 15 баллов. В нашей выборке пациенток число баллов находилось в диапазоне от 0 до 10 баллов. Пациентки были разделены на группы в зависимости от уровня АХВ: группу 1 (высокий уровень АХВ) составили 109 пациенток, имеющих уровень баллов выше медианы (5 и более баллов), группу 2 (низкий уровень АХВ) составила 191 пациентка, имеющая уровень баллов ниже медианы (4 и менее балла) (Таблица 3).

**Таблица 3. Шкала оценки суммарного уровня АХВ в организме**

	<50%, 0 баллов	≥50 %, 1 балл	≥75 %, 2 балла	≥97,5%, 3 балла
Свинец, мкг/л	<9,85	9,85	13,59	35,36
Кадмий, мкг/л	<0,32	0,32	0,45	1,45
Ртуть, мкг/л	<0,81	0,81	1,44	4,50
БФА, нг/мл	<0,52	0,52	0,66	12,65
Стирол, нг/мл	<8,85	8,85	13,5	31,5

При сравнении групп в зависимости от уровня АХВ (группы 1 и 2) не было выявлено значимых отличий за исключением более высокой массы тела ( $p=0,0164$ ), более высокой доли пациенток с первичным бесплодием ( $p=0,0150$ ) и страдающих аллергическими заболеваниями ( $p=0,0535$ ) в группе пациенток с высоким уровнем АХВ (Таблица 4).

**Таблица 4. Клиническая характеристика пациенток с различным уровнем АХВ**

Показатели	Группа 1 (n=109)	Группа 2 (n=191)	P**
Возраст пациентки, лет*	31,6±3,3	31,3±3,2	0,4636
Масса тела, кг*	62,7±7,6	61,6±7,6	0,0164
ИМТ, кг/м <sup>2</sup> *	21,9±2,3	21,9±2,4	0,9183
Бесплодие I, n (%)	53 (48,6%)	72 (37,7%)	0,0150
Аллергии, n (%)	18 (16,5%)	18 (9,4%)	0,0535
Уровень АМГ, нг/мл*	4,6±4,0	4,3±3,3	0,6517

\* среднее значение±стандартное отклонение; \*\*  $\chi^2$ -тест тест для сравнения категориальных данных, t-тест для сравнения непрерывных данных

При оценке параметров эмбриологического этапа было отмечено, что число бластоцист и уровень бластуляции были значимо выше в группе пациенток с низким уровнем АХВ. В группе пациенток с высоким уровнем АХВ было больше пациенток с низким уровнем бластуляции (<30%): 38,5% против 28,8%,  $p=0,0556$ . Относительный риск низкого уровня бластуляции в группе пациенток с высоким уровнем АХВ составил 1,34 (95% ДИ 0,97; 1,85) (Таблица 5).

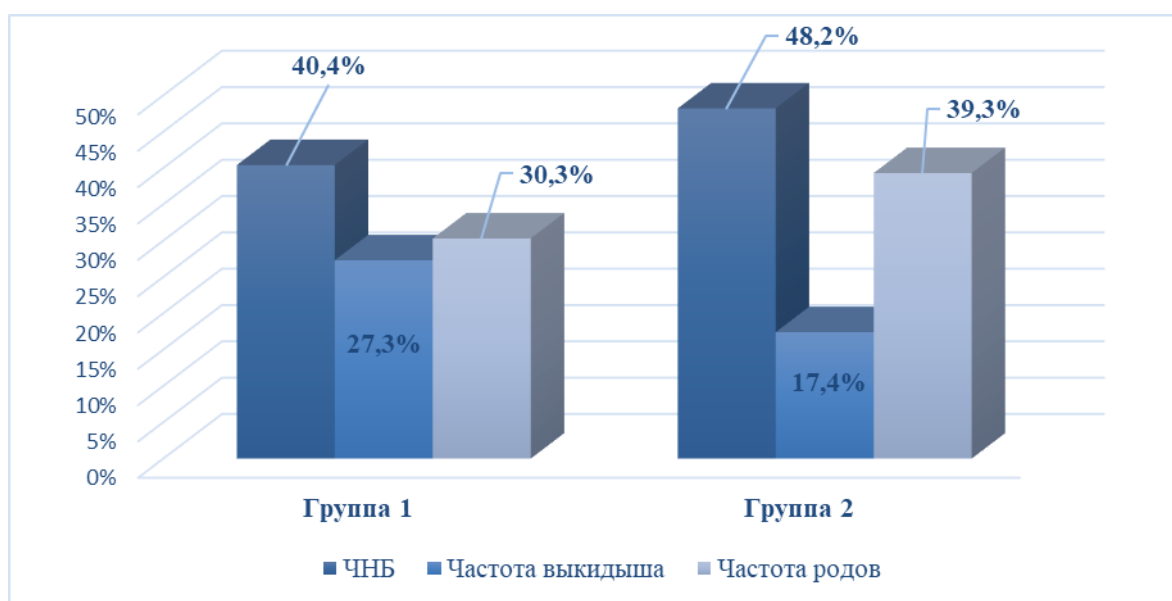
**Таблица 5. Эмбриологические характеристики пациенток с различным уровнем АХВ**

Показатели	Группа 1 (n=109)	Группа 2 (n=191)	P**
Число фолликулов*	10 (6-14)	10 (6-14)	0,5407
Число ОКК*	8 (5-13)	8 (5-12)	0,7221
Число ооцитов на стадии МП*	6 (4-10)	7 (4-10)	0,9503
Доля ооцитов на стадии МП*	0,81 (0,66-1,00)	0,86 (0,71-1,0)	0,3506
Число зигот*	6 (4-9)	6 (4-9)	0,9459
Уровень фертилизации*	100 (80-100)	100 (84-100)	0,3986
Число бластоцист*	2 (1-3)	2 (1-4)	<b>0,0410</b>
Уровень бластуляции*	0,33 (0,20-0,50)	0,50 (0,25-0,64)	<b>0,0004</b>
Уровень бластуляции $\geq 30\%$	67 (61,5%)	136 (71,2%)	<b>0,0556</b>
Уровень бластуляции < 30%	42 (38,5%)	55 (28,8%)	

\*медиана (интерквартильный размах); \*\*  $\chi^2$ -тест тест для сравнения категориальных данных, тест Манна-Уитни для сравнения непрерывных данных

Также был проведен корреляционный анализ между уровнем АХВ и основными эмбриологическими показателями. Уровень свинца находился в отрицательной корреляционной связи с уровнем фертилизации ооцитов ( $r = -0,1404$ ,  $p < 0,05$ ). Уровень кадмия находился в отрицательной корреляционной связи с числом бластоцист ( $r = -0,1168$ ,  $p < 0,05$ ) и уровнем бластуляции ( $r = -0,1421$ ,  $p < 0,05$ ). Уровни ртути, БФА и стирола не были связаны статистически с эмбриологическими показателями.

При оценке клинических исходов программ ВРТ была отмечена тенденция к снижению частоты наступления беременности (ЧНБ) и повышению частоты выкидыша у женщин с высоким уровнем АХВ, хотя различия не достигли статистической значимости. В группе 1 беременность наступила у 44 пациенток (40,4%), в группе 2 – у 92 пациенток (48,2%),  $\Delta = 7,8\%$ ,  $p = 0,1180$ . Беременность закончилась выкидышем в 1 триместре у 12 пациенток (27,3%) в группе 1 и у 16 пациенток (17,4%) в группе 2,  $\Delta = 9,9\%$ ,  $p = 0,1355$ . В результате частота родов была погранично значима выше в группе с низким уровнем АХВ: в группе 1 роды произошли у 33 пациенток (30,3%), в группе 2 роды произошли у 75 пациенток (39,3%),  $\Delta = 9,0\%$ ,  $p = 0,0750$  (Рисунок 4). При оценке перинатальных осложнений не было выявлено различий между группами.



**Рис. 4.** Клинические исходы циклов ВРТ у пациенток с различным уровнем АХВ.

Порог определения БФА в фолликулярной жидкости был аналогичен порогу определения в крови и составил 0,1 мг. В результате проведенного исследования БФА был обнаружен в 16,8% (49/292) образцах ФЖ. Обнаружено, что среди 49 пациенток, у которых определялся БФА в ФЖ, у 25 пациенток уровень БФА был выше в ФЖ, а у других 24 пациенток – в крови. При сравнении данных подгрупп наблюдалась тенденция к снижению количества и качества эмбрионов, если уровень БФА в ФЖ превышал аналогичный уровень в крови.

Для оценки взаимосвязи между уровнем АХВ и показателями сперматогенеза проведено определение уровня стирола и БФА в крови 154 мужчин-партнеров пациенток, включенных в исследование. Медиана возраста мужчин составила 33 года (30-36 лет).

Стирол определялся в 100% образцах крови мужчин (медиана 9,90 нг/мл), бисфенол А был обнаружен в 91,6% (141/154) образцах крови (медиана 0,59 нг/мл). Отмечена положительная корреляционная связь между уровнем стирола в организме пациенток и их супругов ( $r= 0,6924$ ,  $p<0,0001$ ), а также положительная корреляционная связь между уровнем БФА в организме пациенток и их супругов ( $r= 0,5343$ ,  $p<0,0001$ ). Полученные данные также свидетельствуют в пользу того, что экспозиция АХВ определяется особенностями образа жизни пациентов.

Следует отметить, что уровень органических соединений у мужчин был выше по сравнению с аналогичными показателями у женщин. Медиана БФА у женщин составила 0,52 нг/мл, стирола – 8,85 нг/мл.

При этом не отмечено корреляционной связи между уровнями стирола и БФА у одних и тех же мужчин, а также между уровнями данных веществ, возрастом пациентов и основными параметрами спермограммы (концентрация, подвижность, морфология сперматозоидов).

Также были проанализированы основные параметры сперматогенеза и раннего эмбриогенеза в различных квартильных группах стирола и БФА. Наблюдалась тенденция к снижению концентрации сперматозоидов с

увеличением квартиля БФА (69 млн/мл в группе Q1 по сравнению с 51 млн/мл в группе Q4), хотя данные различия не достигли статистической значимости. При сравнении аналогичных параметров в квартильных группах стирола статистических различий не было получено.

Также были проанализированы результаты программ ВРТ в различных квартильных группах стирола и бисфенола А у мужчин. ЧНБ не различалась в группах Q1-Q4 БФА, однако наблюдалась тенденция к повышению частоты выкидыша у пациенток при повышении уровня БФА в крови их партнеров. Частота выкидыша составила 23,5% в группе Q4 по сравнению с 5,6% в группе Q1 и 20,8% в общей группе пациентов. Путем ROC-анализа был определен пороговый уровень БФА у мужчин, при котором повышалась вероятность выкидыша у пациенток в 1-м триместре. Пороговый уровень составил 0,4 нг/мл. ОШ выкидыша у пациенток при уровне БФА у их партнеров 0,4 нг/мл и выше составило 4,06 (95% ДИ 0,77; 40,13).

При оценке исходов программ ВРТ в зависимости от уровня стирола у мужчин было отмечено негативное влияние уровня стирола на эффективность ВРТ: ЧНБ составила 24,3% в группе Q4 по сравнению с 53,8% в группах Q1, Q2 и Q3 ( $p=0,0020$ ). В результате частота родов была минимальной в группе Q4 (21,6% против 36,9% в общей группе пациентов).

Далее был проведен анализ уровня тяжелых металлов в зависимости от генетических особенностей системы детоксикации пациенток и клинических данных пациенток. Было отмечено повышение уровня ртути у пациенток позднего репродуктивного возраста: у пациенток в возрасте до 30 лет медиана уровня ртути составила 0,64 мкг/л, у пациенток в возрасте от 30 до 35 лет – 0,83 мкг/л, у пациенток старше 35 лет – 0,95 мкг/л ( $p=0,0219$ ). Уровень кадмия был выше у пациенток с избыточной массой тела (медиана 0,43 мкг/л) по сравнению с пациентками с нормальным ИМТ (медиана 0,30 мкг/л),  $p=0,0190$ . Уровень ртути был погранично значимо выше при наличии делеции гена *GSTT1*: 0,89 мкг/л против 0,78 мкг/л,  $p=0,0602$ . Уровень свинца и ртути в крови пациенток был значимо ниже у пациенток с отсутствием

аллеля Т гена *CYP1A1* (ртуть 0,34 мкг/л против 0,82 мкг/л,  $p=0,0515$ ; свинец 6,31 мкг/л против 9,96 мкг/л,  $p=0,0032$ ). Уровень свинца был ниже у пациенток с наличием аллеля G гена *GSTP1* (9,51 мкг/л против 10,16 мкг/л,  $p=0,0684$ ). Уровень ртути был выше у пациенток с отсутствием аллеля А гена *SULT1A1* (0,88 мкг/л против 0,72 мкг/л,  $p=0,0068$ ). Уровень кадмия не был связан с генетическими особенностями системы детоксикации (Таблица 6).

**Таблица 6. Концентрация Hg, Pb и Cd в крови пациенток в зависимости от клинико-лабораторных данных и полиморфизма генов системы детоксикации**

Факторы	Hg		Pb		Cd	
	медиана	p-уровень*	медиана	p-уровень*	медиана	p-уровень*
<b>Возраст (лет)</b>						
<30	0,64	<b>0,0219</b>	9,72	0,9815	0,30	0,6102
30-<35	0,83		9,75		0,31	
≥35	0,95		9,94		0,34	
<b>ИМТ (кг/м<sup>2</sup>)</b>						
<25	0,81	0,4419	9,96	0,6034	0,30	<b>0,0149</b>
≥25	0,70		9,50		0,43	
<b>АМГ, нг/мл</b>						
≥1,2	0,79	0,6983	9,72	0,2057	0,31	0,5981
<1,2	0,83		10,09		0,34	
<b>GSTT1</b>						
наличие гена	0,78	<b>0,0602</b>	9,74	0,3455	0,31	0,6009
делеция гена	0,89		10,17		0,33	
<b>GSTP1</b>						
G+	0,70	0,1205	9,51	<b>0,0684</b>	0,29	0,1877
G-	0,90		10,16		0,32	
<b>CYP1A1</b>						
T+	0,82	<b>0,0515</b>	9,96	<b>0,0032</b>	0,32	0,2658
T-	0,34		6,31		0,27	
<b>SULT1A1</b>						
A+	0,72	<b>0,0688</b>	9,93	0,9381	0,31	0,9629
A-	0,88		9,74		0,30	

\* Крускала-Уоллиса/Манна-Уитни

С целью оценки сочетанного влияния тяжелых металлов и полиморфизма генов детоксикации на результаты программ ВРТ был проведен регрессионный анализ. В качестве исходов оценивали следующие показатели: уровень фертилизации (<90% или ≥90%), уровень бластуляции (<30% или ≥30%), ЧНБ, частоту родов живым плодом. Для создания модели были отобраны показатели, выявленные при проведении однофакторного анализа. При проведении регрессионного анализа выявлено, что сочетанный показатель *CYP1A1*\*Pb в крови значимо влиял на фертилизацию ооцитов (Таблица 7).

Таблица 7. Регрессионный анализ сочетанного влияние содержания **Hd/Pb** и полиморфизма генов системы детоксикации на исходы программ ВРТ

Модель*	Фертилизация		Бластуляция		ЧНБ		Частота живорождения	
	$\beta$ *	р-уровень	$\beta$ *	р-уровень	$\beta$ *	р-уровень	$\beta$ *	р-уровень
Модель 1: связь с <i>GSTT1</i>								
концентрация Hg	-0,0810	0,5885	-0,1620	0,2975	0,1333	0,3501	0,0608	0,6820
<b>сочетанный показатель <i>GSTT1</i>*Hg</b>	0,0509	0,5532	0,0353	0,6921	0,0633	0,7377	0,0047	0,9806
Модель 2: связь с <i>GSTP1</i>								
концентрация Pb	-5,4464	<b>0,0068</b>	1,0178	0,6291	0,5480	0,7768	1,7041	0,3963
<b>сочетанный показатель <i>GSTP1</i>*Pb</b>	-0,8061	0,3883	-0,2479	0,7986	0,7967	0,7258	2,2950	0,3310
Модель 3: связь с <i>CYP1A1</i>								
концентрация Hg	-0,0810	0,5885	-0,1620	0,2975	0,1333	0,3501	0,0608	0,6820
<b>сочетанный показатель <i>CYP1A1</i>*Hg</b>	-0,0854	0,5693	-0,1667	0,2851	0,2653	0,3501	0,1169	0,6941
концентрация Pb	-5,4464	<b>0,0068</b>	1,0178	0,6291	0,5480	0,7768	1,7041	0,3963
<b>сочетанный показатель <i>CYP1A1</i>*Pb</b>	-5,4049	<b>0,0075</b>	0,9945	0,6381	1,2075	0,7551	3,4823	0,3869
Модель 4: связь с <i>SULT1A1</i>								
концентрация Hg	-0,0810	0,5885	-0,1620	0,2975	0,1333	0,3501	0,0608	0,6820
<b>сочетанный показатель <i>SULT1A1</i>*Hg</b>	0,2933	0,5885	1,5371	0,2160	0,6412	0,4238	0,1211	0,7280

\*- коэффициент регрессии -F-критерий/линейная регрессия

Далее был проведен анализ уровня органических веществ в зависимости от генетических особенностей системы детоксикации пациенток и клинических данных пациенток. Было отмечено, что у пациенток с более высоким ИМТ ( $\geq 25$  кг/м<sup>2</sup>) чаще определялся БФА в фолликулярной жидкости (31,6% против 14,6%,  $p=0,0122$ ), а медиана БФА в крови была ниже (0,38 нг/мл против 0,53 нг/мл,  $p=0,0411$ ). У пациенток с отсутствием аллеля А гена *SULT1A1* значимо чаще определяли БФА в ФЖ (22,6% против 13,5%,  $p=0,0341$ ). Также была обнаружена погранично значимая связь между уровнем БФА в крови и наличием аллеля G гена *GSTP1rs1695*, аллеля C гена *GSTP1rs1138272*, частотой определения БФА в ФЖ и наличием аллеля C гена *SOD2*. Уровень стирола в крови пациенток был значимо выше при наличии

делеции гена *GSM*, при наличии аллеля С гена *GSTP1*rs1138272, аллеля С гена *NAT2*rs1801280, аллеля G гена *NAT2*rs179930. Также отмечено погранично значимое повышение уровня стирола при отсутствии аллеля А гена *NAT2*rs17993 и аллеля С гена *SOD* (Таблица 8).

**Таблица 8. Концентрация БФА и стирола в организме пациенток в зависимости от клинико-лабораторных данных и полиморфизма генов системы детоксикации**

Факторы	БФА в крови		БФА определяется в ФЖ, %		Стирол в крови	
	медиана	р-уровень*	медиана	р-уровень**	медиана	р-уровень*
<b>Возраст (лет)</b>						
<30	0,52	0,8810	13,2%	0,2151	9,10	0,2875
30-<35	0,52		20,9%		9,40	
≥35	0,52		13,1%		8,15	
<b>ИМТ (кг/м<sup>2</sup>)</b>						
<25	0,53	<b>0,0411</b>	14,6%	<b>0,0122</b>	8,80	0,7091
≥25	0,38		31,6%		9,50	
<b>АМГ, нг/мл</b>						
≥1,2	0,52	0,5336	17,2%	0,4420	8,25	0,5918
<1,2	0,55		14,6%		8,90	
<b><i>GSM</i></b>						
наличие гена	0,52	0,5131	18,8%	0,2112	8,00	<b>0,0017</b>
делеция гена	0,52		14,5%		10,10	
<b><i>GSTP1</i> rs1695</b>						
G+	0,51	<b>0,0769</b>	17,1%	0,5121	9,20	0,9421
G-	0,54		16,5%		8,60	
<b><i>GSTP1</i>rs1138272</b>						
C+	0,52	<b>0,0745</b>	16,8%	0,6050	8,90	<b>0,0252</b>
C-	0,18		20,0%		5,20	
<b><i>SOD</i></b>						
C+	0,52	0,9355	18,8%	<b>0,0821</b>	8,60	<b>0,0636</b>
C-	0,53		11,0%		10,75	
<b><i>CYP1A1</i></b>						
AC	0,52	0,4865	-	<b>0,0582</b>	10,75	0,1934
CC	0,52		17,8%		8,80	
<b><i>NAT2</i>rs1801280</b>						
C+	0,52	0,3210	15,5%	0,4001	9,70	<b>0,0061</b>
C-	0,49		19,8%		7,10	
<b><i>NAT2</i>rs179930</b>						
G+	0,52	0,1546	17,3%	0,3120	9,20	<b>0,0196</b>
G-	0,39		10,0%		6,20	
<b><i>NAT2</i>rs17993</b>						
A+	0,49	0,8152	15,4%	0,6212	7,10	<b>0,0615</b>
A-	0,52		16,9%		9,10	
<b><i>SULT1A1</i></b>						
A+	0,52	0,3354	13,5%	<b>0,0341</b>	9,20	0,1395
A-	0,53		22,6%		8,50	

\* Крускала-Уоллиса/Манна-Уитни тест; \*\*  $\chi^2$ -тест

Аналогично предыдущему этапу исследования, был проведен регрессионный анализ для проверки влияния каждой модели, выделенной в



ходе проведения однофакторного анализа, на различные результаты программ ВРТ – уровень фертилизации, бластуляции, ЧНБ, частоту живорождения. Погранично значимые различия получены при сочетанном влиянии аллеля А гена *CYP11A1*rs1799814 и наличия БФА в фолликулярной жидкости на уровень бластуляции, а также при сочетанном влиянии аллеля А гена *NAT2*rs179930 и содержания стирола на частоту живорождения.

Для оценки связи между уровнем витамина Д, полиморфизмом гена рецептора витамина Д и содержанием АХВ в организме пациенток были отобраны 100 пациенток, которым проводили исследование уровня витамина Д методом масс-спектрометрии и определение генотипа рецептора витамина Д (*VDR*). Среди включенных в исследование пациенток 50% (n=50) имели достаточный уровень витамина Д, 36% (n=36) имели недостаточный уровень витамина Д, 14% (n=14) имели дефицит витамина Д.

Среди генетических особенностей рецептора к витамину Д изучали три различных полиморфизма гена *VDR* (FOKI-rs2228570, BsmI-rs1544410, TaqI-rs731236). При оценке связи между уровнем витамина Д и генетическими особенностями его рецептора отмечена связь между содержанием витамина Д и наличием аллеля С в гене *VDR* (TaqI-rs731236), которая была погранично значимой. Пациентки с наличием аллеля С (n=58) вышеуказанного гена имели медианный уровень витамина Д 30,8 нг/мл, пациентки с отсутствием аллеля С (n=42) имели медианный уровень витамина Д 28,7 нг/мл (p=0,0971). Распространенность дефицита витамина Д была выше у пациенток с отсутствием аллеля С гена *VDR* (TaqI-rs731236): 21,4% против 8,6%, p=0,0645, ОР=2,49 (95% ДИ 0,90; 6,88); а также у пациенток с отсутствием аллеля А гена *VDR* (BsmI-rs1544410): 22,0% против 8,5%, p=0,0544, ОР=2,81 (95% ДИ 1,01; 7,80).

Для оценки связи между содержанием АХВ и уровнем витамина Д у пациенток был проведен корреляционный анализ. Не было выявлено статистически значимой связи (p<0,05).

Уровень витамина Д у пациенток с различным уровнем АХВ в организме также не имел статистических различий. В подгруппе пациенток с высоким уровнем АХВ средний уровень витамина Д составил 31,5 нг/мл, в группе с низким уровнем АХВ – 30,5 нг/мл ( $p=0,6490$ , t-тест).

Затем оценили медиану уровня витамина Д и частоту сниженного уровня витамина Д (30 нг/мл и менее) в квартильных группах отдельных АХВ. При проведении данного анализа отмечена тенденция к снижению витамина Д у пациенток с повышенным уровнем органических веществ. Медиана витамина Д составила 33,7-30,1-29,4-25,6 нг/мл в группах Q1-Q4 стирола, и 32,1-32,8-27,2-28,6 в группах Q1-Q4 бисфенола А. Соответственно, в подгруппах с более высоким содержанием органических веществ наблюдалась большая распространенность сниженного уровня витамина Д (Таблица 9).

**Таблица 9. Анализ содержания витамина Д в квартильных группах различных АХВ**

<b>Стирол</b>	<b>Q1</b>	<b>Q2</b>	<b>Q3</b>	<b>Q4</b>	<b>P*</b>
Витамин Д медиана	33,7	30,1	29,4	25,6	<b>0,0422</b>
↓Витамин Д, n (%)	12 (48,0%)	8 (32,0%)	12 (48,0%)	18 (69,2%)	<b>0,0681</b>
<b>БФА</b>	<b>Q1</b>	<b>Q2</b>	<b>Q3</b>	<b>Q4</b>	
Витамин Д медиана	32,1	32,8	27,2	28,6	<b>0,0459</b>
↓Витамин Д, n (%)	9 (36,0%)	9 (36,0%)	14 (60,9%)	18 (66,7%)	<b>0,0465</b>
<b>Свинец</b>	<b>Q1</b>	<b>Q2</b>	<b>Q3</b>	<b>Q4</b>	
Витамин Д медиана	28,6	28,9	31,9	31,7	0,4769
↓Витамин Д, n (%)	15 (60,0%)	15 (60,0%)	8 (32,0%)	12 (48,0%)	0,1523
<b>Ртуть</b>	<b>Q1</b>	<b>Q2</b>	<b>Q3</b>	<b>Q4</b>	
Витамин Д медиана	27,7	31,7	30,2	28,9	0,4328
↓Витамин Д, n (%)	14 (56,0%)	10 (40,0%)	12 (48,0%)	14 (56,0%)	0,6245
<b>Кадмий</b>	<b>Q1</b>	<b>Q2</b>	<b>Q3</b>	<b>Q4</b>	
Витамин Д медиана	30,1	29,4	30,9	30,0	0,9367
↓Витамин Д, n (%)	12 (48,0%)	14 (53,8%)	12 (48,0%)	12 (48,0%)	0,9723

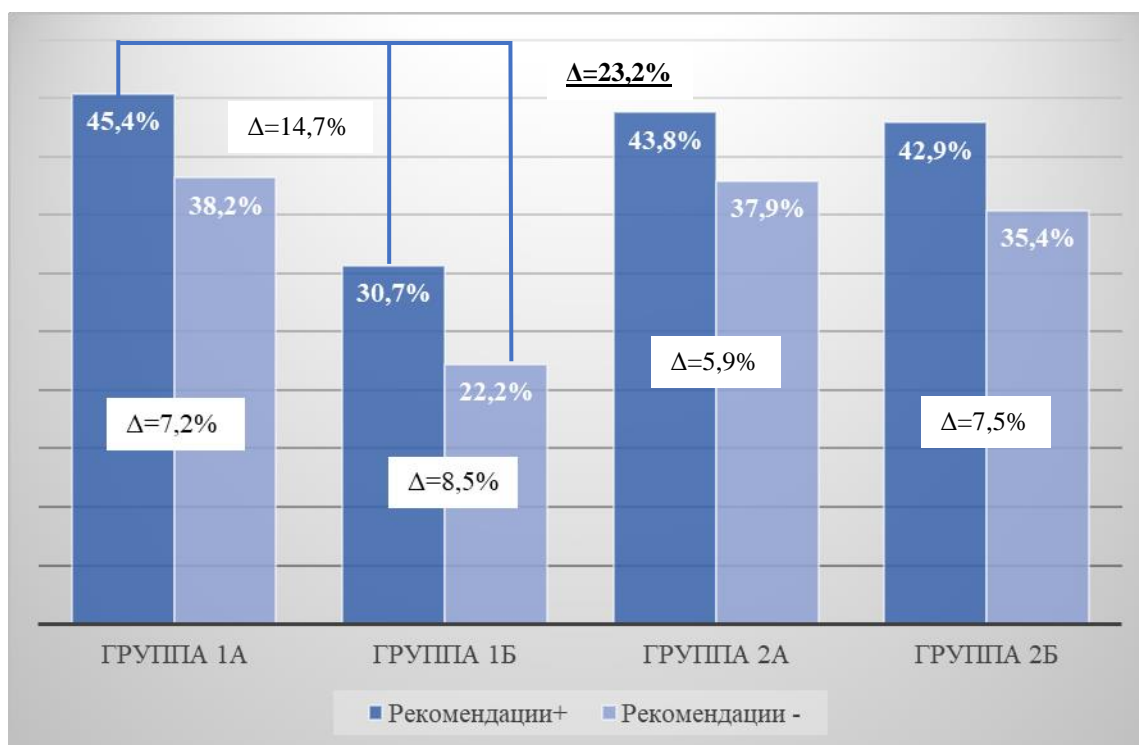
\*Крускала-Уоллиса/  $\chi^2$ -тест

ОР сниженного уровня витамина Д у пациенток с уровнем стирола выше медианы (по сравнению с уровнем ниже медианы) составил 1,50 (95% ДИ 1,00; 2,26). ОР сниженного уровня витамина Д у пациенток с уровнем бисфенола А выше медианы (по сравнению с уровнем ниже медианы) составил 1,78 (95% ДИ 2,16; 2,72). При анализе уровня витамина Д и частоты сниженного уровня витамина Д в различных квартильных группах тяжелых металлов не было найдено статистических различий.

На **втором этапе** было проведено исследование влияния модификации образа жизни и препаратов с антиоксидантным действием на содержание АХВ в организме пациенток и исходы программ ВРТ. Для данного этапа были отобраны 180 пациенток с бесплодием, которым перед проведением ВРТ определяли уровень АХВ методом масс-спектрометрии. Для разделения пациенток на группы (высокий/низкий уровень АХВ) использована шкала баллов, разработанная на предыдущем этапе исследования. Через 3 месяца всем пациенткам провели повторное анкетирование (для определения доли пациенток, выполняющих рекомендации), а также повторное определение уровня АХВ и оценку исходов ВРТ.

В группе 1а рекомендации по модификации образа жизни соблюдали 11 пациенток (24,4%), в группе 1б – 13 пациенток (28,8%), в группе 2а – 16 пациенток (35,6%), в группе 2б – 14 пациенток (31,1%).

Наблюдала тенденцию к повышению ЧНБ в подгруппах пациенток, которые следовали рекомендациям по модификации образа жизни (Рисунок 5). Максимальные различия в ЧНБ ( $\Delta=23,2\%$ ) наблюдали при сравнении подгруппы пациенток, которые изначально имели высокий уровень АХВ, принимали препараты с антиоксидантным действием и изменили образ жизни, по сравнению с подгруппой пациенток, которые также имели высокий уровень АХВ, но не изменили образ жизни и не получали терапию ЧНБ в данных группах составила 26,8% и 19,6%, соответственно.



**Рис.5.** Частота наступления беременности в циклах ВРТ в зависимости от приема препаратов с антиоксидантным действием и модификации образа жизни.

Всем пациенткам, включенным в данный этап исследования, проводили двукратное определение уровня АХВ в крови. Первое измерение проводили за 3 месяца до проведения цикла ВРТ. Второе измерение проводили в день трансвагинальной пункции яичников в цикле ВРТ. Проведена сравнительная оценка содержания АХВ при первом и повторном измерении.

Отмечено снижение уровня АХВ при измерении №2 в группе пациенток с исходно высоким уровнем АХВ, получавших препараты с антиоксидантным действием (группа 1а). В других трех подгруппах уровень АХВ в двух измерениях не имел статистических различий (Таблица 10).

Далее была проведена оценка основных параметров оогенеза и раннего эмбриогенеза в группах сравнения. При сравнении параметров оогенеза в группах 1а и 1б (высокий уровень АХВ, терапия +/-) отмечена тенденция к повышению доли зрелых ооцитов в общей когорте у пациенток, получавших препараты с антиоксидантным действием (0,83 против 0,76,  $p=0,0844$ ). При

сравнении эмбриологических параметров в группах 2а и 2б (низкий уровень АХВ, терапия +/-) не выявлено статистически значимых различий.

**Таблица 10. Содержание АХВ в организме пациенток до и после назначения препаратов с антиоксидантным действием**

	Измерение №1	Измерение №2	P, тест Уилкоксона
Группа 1а (высокий уровень АХВ, терапия +)			
Свинец, мкг/л	18,41 (11,95-22,19)	15,23 (10,33-19,37)	<b>&lt;0,0001</b>
Ртуть, мкг/л	1,66 (1,12-1,94)	1,03 (0,89-1,09)	<b>&lt;0,0001</b>
Кадмий, мкг/л	0,50 (0,38-0,65)	0,35 (0,29-0,46)	<b>&lt;0,0001</b>
БФА, нг/мл	0,56 (0,46-0,85)	0,50 (0,32-0,68)	<b>0,0043</b>
Стирол, нг/мл	8,30 (5,20-12,40)	6,20 (4,70-8,90)	<b>0,0036</b>
Группа 1б (высокий уровень АХВ, терапия -)			
Свинец, мкг/л	16,24 (11,93-23,18)	16,58 (11,43-23,57)	0,2386
Ртуть, мкг/л	1,53 (0,95-2,60)	1,58 (0,89-2,10)	0,1869
Кадмий, мкг/л	0,48 (0,32-0,70)	0,50 (0,35-0,75)	0,6600
БФА, нг/мл	0,78 (0,48-0,91)	0,80 (0,55-1,15)	0,1915
Стирол, нг/мл	9,70 (6,80-13,70)	10,35 (7,70-14,10)	0,2263
Группа 2а (низкий уровень АХВ, терапия +)			
Свинец, мкг/л	9,50 (7,43-12,98)	9,56 (8,20-10,52)	0,8522
Ртуть, мкг/л	0,58 (0,23-1,18)	0,53 (0,25-0,95)	0,8611
Кадмий, мкг/л	0,32 (0,22-0,39)	0,30 (0,21-0,45)	0,9684
БФА, нг/мл	0,28 (0,15-0,50)	0,30 (0,16-0,45)	0,5321
Стирол, нг/мл	10,70 (6,50-15,40)	9,70 (6,20-13,60)	0,5509
Группа 2б (низкий уровень АХВ, терапия -)			
Свинец, мкг/л	9,88 (8,27-12,85)	9,33 (7,29-13,49)	0,2263
Ртуть, мкг/л	0,39 (0,17-0,63)	0,38 (0,25-0,54)	0,1397
Кадмий, мкг/л	0,23 (0,19-0,30)	0,24 (0,19-0,29)	0,4269
БФА, нг/мл	0,39 (0,11-0,81)	0,32 (0,07-0,82)	0,1566
Стирол, нг/мл	10,65 (7,50-15,40)	11,50 (7,65-15,25)	0,8875

Данные представлены как медиана (интерквартильный размах)

При оценке исходов программ ВРТ наблюдали повышение ЧНБ и живорождения в группе 1а (высокий уровень АХВ, терапия +). В подгруппе пациенток с низким уровнем АХВ прием препаратов с антиоксидантным действием не приводил к повышению эффективности ВРТ (Таблица 11).

**Таблица 11. Результаты циклов ВРТ в зависимости от уровня АХВ и назначения препаратов с антиоксидантным действием**

	Группа 1а, n=45	Группа 1б, n=45	ОШ 1а/1б (95% ДИ)	Группа 2а, n=45	Группа 2б, n=45	ОШ 2а/2б (95% ДИ)
ЧНБ	18 (40,0%)	13 (28,9%)	<b>1,64</b> <b>(0,63; 4,35)</b>	18 (40,0%)	17 (37,8%)	1,10 (0,43; 2,79)
Частота родов	17 (37,7%)	11 (24,4%)	<b>1,88</b> <b>(0,69; 5,19)</b>	16 (35,6%)	15 (33,3%)	1,10 (0,42; 2,89)

Было рассчитано число пациентов, лечению подвергаемых (ЧПЛП, англ. The Number Needed to Treat, NNT). В подгруппе пациенток с высоким уровнем АХВ (группа 1), абсолютное снижение риска (АСР) было рассчитано по формуле  $18/45 - 13/45 = 0,4 - 0,289 = 0,111$ . ЧПЛП было рассчитано по формуле  $1/0,111 = 9$ . В подгруппе пациенток с низким уровнем АХВ (группа 2), АСР было рассчитано по формуле  $18/45 - 17/45 = 0,4 - 0,378 = 0,022$ . ЧПЛП было рассчитано по формуле  $1/0,022 = 45,4 \sim 45$ .

## Приложение 1.

### Алгоритм прегравидарной подготовки



## ВЫВОДЫ

1. Факторами риска, ассоциированными с повышенной экспозицией АХВ, являются: частое ( $>1$  раза в неделю) употребление рыбы, консервированных продуктов из жестяных банок, готовой еды, напитков из пластиковых бутылок, использование наличных денежных средств, курение, разогревание пластиковой посуды в микроволновой печи, низкая физическая активность, недостаточное ( $<1$  часа в день) пребывание на открытом воздухе, работа в условиях небольшого закрытого помещения и проживание на 1-4 этажах зданий.

2. Клинико-anamnestическими особенностями женщин с высоким уровнем АХВ являются: преобладание первичного бесплодия (48,6% против 37,7%,  $p=0,0150$ ), более высокая масса тела (62,7 кг против 61,6 кг,  $p=0,0164$ ) и повышенная частота аллергических заболеваний (16,5% против 9,4%,  $p=0,0535$ ).

3. Содержание органических АХВ в организме пациенток имеет значимую положительную корреляционную связь с содержанием данных веществ в организме их супругов. Для бисфенола А коэффициент корреляции ( $r$ ) составляет 0,5343 ( $p<0,0001$ ), для стирола - 0,6924, ( $p<0,0001$ ).

4. Уровень БФА в крови у мужчин  $\geq 2,14$  нг/мл ассоциирован со снижением концентрации сперматозоидов в 1,4 раза. Уровень БФА в крови у мужчин  $>0,4$  нг/мл повышает вероятность выкидыша в 1 триместре у женщин в 4,1 раза.

5. Уровень стирола в крови у мужчин не связан с концентрацией, подвижностью и морфологией сперматозоидов. При этом уровень стирола  $\geq 15,4$  нг/мл снижает частоту наступления беременности в циклах ВРТ в 3,6 раза, частоту родов – в 2,6 раза.

6. Повышение уровня свинца в крови пациенток ассоциировано со снижением частоты оплодотворения ооцитов ( $r= -0,1404$ ,  $p<0,05$ ), повышение уровня кадмия - со снижением числа полученных бластоцист ( $r= - 0,1168$ ,  $p<0,05$ ) и частоты бластуляции ( $r= - 0,1421$ ,  $p<0,05$ ). Относительный риск



снижения частоты бластуляции (<30%) у пациенток с высоким уровнем АХВ составляет 1,34 (95% ДИ 0,97; 1,85).

7. При повышенном уровне АХВ частота наступления беременности снижается в 1,4 раза, частота выкидыша увеличивается в 1,5 раза, что приводит к снижению частоты родов в 1,5 раза.

8. Уровень тяжелых металлов в организме пациенток зависит от генетических особенностей системы детоксикации. Выявлены аллельные варианты (отсутствие делеции гена *GSTT1*, наличие аллеля G гена *GSTP1*rs1695 и аллеля A гена *SULT1A1*rs9282861, отсутствие аллеля T гена *CYP1A1*rs4646903), которые имеют протективное значение и предотвращают накопление тяжелых металлов в крови. Одним из патогенетических механизмов воздействия тяжелых металлов на репродуктивное здоровье является влияние повышенной экспозиции свинца на частоту фертилизации при наличии полиморфизма гена *CYP1A1*rs4646903.

9. Содержание органических соединений в организме также зависит от генетических особенностей системы детоксикации. Выявлены аллельные варианты, предрасполагающие к накоплению стирола в организме (делеция гена *GSM*, наличие аллеля G гена *NAT2*rs179930, наличие аллеля C гена *NAT2*rs1801280, наличие аллеля C гена *GSTP1*rs1138272 и отсутствие аллеля C гена *SOD*rs4880). Частота наличия в фолликулярной жидкости детектируемого уровня БФА была выше при отсутствии аллеля A гена *SULT1A1*rs9282861, а также погранично значимо выше при наличии аллеля C гена *SOD*rs4880 и отсутствии аллеля C гена *CYP1A1*rs1799814. Уровень БФА был погранично значимо выше у пациенток, имеющих аллель C гена *GSTP1*rs1138272, а также не имеющих аллеля G гена *GSTP1*rs1695. Патогенетическим механизмом воздействия органических соединений на репродукцию является влияние БФА в фолликулярной жидкости на уровень бластуляции при наличии полиморфизма гена *CYP1A1*rs1799814 и влияние стирола в крови на частоту живорождения при наличии полиморфизма гена *NAT2*rs179930.

10. Модификация образа жизни, способствующая снижению антропогенной химической нагрузки, в комплексе с назначением препаратов с антиоксидантным действием на этапе прегравидарной подготовки повышает эффективность программ ВРТ. У пациенток с высоким уровнем АХВ при сочетанном применении препаратов с антиоксидантным действием и модификации образа жизни частота наступления беременности составляет 26,8%, при отсутствии модификации образа жизни - 19,6%.

11. Назначение препаратов с антиоксидантным действием на этапе прегравидарной подготовки у пациенток с высоким уровнем АХВ увеличивает частоту наступления беременности в 1,6 раза, а частоту родов – в 1,8 раза. Для достижения 1 дополнительного случая наступления беременности препараты с антиоксидантным действием должны получить 9 пациенток.

12. Содержание витамина Д в организме пациенток с бесплодием имеет связь с генетическими особенностями рецептора витамина Д. У пациенток с отсутствием аллеля С гена *VDR* (TaqI-rs731236) риск дефицита витамина Д (20 нг/мл и менее) увеличивается в 2,5 раза, с отсутствием аллеля А гена *VDR* (BsmI-rs1544410) – в 2,8 раза.

13. Риск недостаточности витамина Д (<30 нг/мл) увеличивается при повышенном уровне органических АХВ. При уровне БФА  $\geq 0,52$  нг/мл риск недостаточности витамина Д увеличивается в 1,78 раза, при уровне стирола  $\geq 8,85$  нг/мл – в 1,5 раза.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Рекомендовано проведение анкетирования пациенток, планирующих беременность, с целью определения факторов повышенной экспозиции АХВ.

2. Пациенткам, планирующим беременность и/или проведение цикла ВРТ, рекомендована модификация образа жизни:

- a. отказ от курения;
- b. ограничение потребления рыбы;
- c. ограничение потребления продуктов, упакованных в жестяные консервные банки;
- d. сокращение использования готовой еды (еда в упаковке из кафе/супермаркета);
- e. отказ от приготовления продуктов в пластиковой посуде в микроволновой печи;
- f. сокращение употребления напитков из пластиковых бутылок;
- g. отказ от использования в качестве основного источника питьевой воды бутилированной воды (оптимальным источником питьевой воды является вода, очищенная с помощью фильтров);
- h. оптимальный режим физической активности;
- i. ограничение использования наличных денежных средств, тщательное мытье рук после контакта с монетами/купюрами;
- j. нахождение не менее 1 часа в день на открытом воздухе.

3. Пациенткам, имеющих клинико-анамнестические предикторы экспозиции к АХВ, рекомендовано проводить дополнительное обследование на полиморфизм генов детоксикации: *GSTT1*, *GSTP1*rs1695, *GSM*, *CYP1A1*rs4646903, *NAT2*rs179930, *NAT2*rs1801280, *GSTP1*rs1138272, *SOD*rs4880, *SULT1A1*rs9282861, *CYP1A1*rs1799814.

4. При наличии «неблагоприятных» аллельных вариантов генов детоксикации (делеция гена *GSTT1*, делеция гена *GSM*, отсутствие аллеля G гена *GSTP1*rs1695, наличие аллеля T гена *CYP1A1*rs4646903, наличие аллеля

G гена *NAT2rs179930*, наличие аллеля С гена *NAT2rs1801280*, наличие аллеля С гена *GSTP1rs1138272* и отсутствие аллеля С гена *SODrs4880*) рекомендовано определение уровня АХВ в организме пациенток.

5. Пациенткам, имеющим повышенный уровень АХВ в организме и/или «неблагоприятные» полиморфизмы генов детоксикации, рекомендовано назначение препаратов с антиоксидантным действием на прегравидарном этапе. Рекомендуемая схема терапии: коэнзим Q10 300 мг/сутки, эйкозапентаеновая кислота 300 мг/сутки, докозагексаеновая кислота 200 мг/сутки перорально, в течение 3 месяцев перед планированием беременности.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Влияние тяжелых металлов на эффективность программ вспомогательных репродуктивных технологий в зависимости от полиморфизма генов системы детоксикации / Сыркашева А.Г., Долгушина Н.В., Франкевич В.Е., Донников А.Е. // **Акушерство и гинекология.** – 2021. - № 7.- С. 95-101
2. Ассоциация между уровнем тяжелых металлов в организме женщин с бесплодием и исходами программ вспомогательных репродуктивных технологий / Сыркашева А.Г., Франкевич В.Е., Долгушина Н.В. // **Акушерство и гинекология.** – 2020.- № 11. – С. 124-130.
3. Влияние антропогенных химических веществ на эффективность программ вспомогательных репродуктивных технологий / Франкевич В.Е., Сыркашева А.Г., Долгушина Н.В. // **Акушерство и гинекология.** – 2021. - №7 . – С. 102-106.
4. Элементный состав крови пациенток с бесплодием в программах вспомогательных репродуктивных технологий / Сыркашева А. Г., Долгушина Н. В., Франкевич В. Е. // **Вестник РНИМУ.** – 2021. - № 1. – С. 45-50.
5. Концентрация бисфенола а в крови мужчин: влияние на результаты программ вспомогательных репродуктивных технологий / Сыркашева А. Г., Киндышева С. В., Франкевич В. Е., Долгушина Н. В. // **Проблемы репродукции.** – 2021. - № 4. - 135-141.
6. Влияние бисфенола А на исходы программ вспомогательных репродуктивных технологий у пациентов с бесплодием / Сыркашева А. Г., Стародубцева Н. Л., Киндышева С. В., Франкевич В. Е., Долгушина Н. В. // **Гинекология.** – 2021. - № 2. - 161-166.
7. Бисфенол А в организме пациенток с бесплодием: влияние на результаты программ вспомогательных репродуктивных технологий / Сыркашева А. Г., Стародубцева Н. Л., Киндышева С. В., Франкевич В. Е., Долгушина Н. В. // **Акушерство и гинекология.** – 2021. - №7. – С. 112-120.

8. Ассоциация уровня витамина D и полиморфизма гена VDR с исходами программ вспомогательных репродуктивных технологий / Сыркашева А. Г., Киндышева С. В., Франкевич В. Е., Донников А. Е., Долгушина Н. В. // **Гинекология.** - 2022. - № 1. - 30-34.

9. Роль антиоксидантной терапии в повышении эффективности программ вспомогательных репродуктивных технологий / Сыркашева А. Г., Долгушина Н. В. // **Медицинский совет.** - 2021. - №12. – С. 353-359.

10. Полиморфизмы гена рецептора витамина D и эффективность программ вспомогательных репродуктивных технологий / Сыркашева А. Г., Романов А. Ю., Донников А. Е., Долгушина Н. В. // **Медицинский совет.** - 2021. - №12. – С. 360-364.

11. The effect of bisphenol A on the IVF outcomes depending on the polymorphism of the detoxification system genes. Влияние бисфенола А на эффективность вспомогательных репродуктивных технологий в зависимости от полиморфизма генов системы детоксикации. / Syrkasheva A. G., Kindysheva S. V., Frankevich V. E., Starodubtseva N. L., Donnikov A. E., Dolgushina N. V. Сыркашева А. Г., Киндышева С. В., Франкевич В. Е., Стародубцева Н. Л., Донников А. Е., Долгушина Н. В. // *Journal of Personalized Medicine.* – 2021. - № 11. – P. 1091-1100. Журнал персонализированной медицины. - № 11. – С. 1091-1100.