

*На правах рукописи*



**Агаджанян**

Диана Сейрановна

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

3.1.4. Акушерство и гинекология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2023

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

**Научные руководители:**

**Смольникова Вероника Юрьевна** — доцент, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени профессора Б.В. Леонова Института репродуктивной медицины ФГБУ «НМИЦ АГП им.В.И.Кулакова» Минздрава России.

**Красный Алексей Михайлович** — кандидат биологических наук, руководитель лаборатории цитологии ФГБУ «НМИЦ АГП им.В.И.Кулакова» Минздрава России.

**Официальные оппоненты:**

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

**Гзгзян Александр Мкртичевич** – доктор медицинских наук, профессор, руководитель отделения вспомогательных репродуктивных технологий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта» Минобрнауки России.

**Ведущая организация:**

ФГБУ «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства имени В. Н. Городкова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита диссертации состоится «16» мая 2023 г. на заседании диссертационного совета 21.1.022.01 на базе ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России по адресу: 117997, г. Москва, ул. Академика Опарина, д.4.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБУ «НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова» Минздрава России

<https://science.ncagp.ru/upfiles/pdf/Agadzhanian%20DS-disser.pdf?1646718739>

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2023 г.

**Ученый секретарь**  
диссертационного совета, доктор  
медицинских наук, профессор

**Е.А. Калинина**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### 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 [Syrkasheva A. et al., 2021; Skakkebaek NE. et al., 2022]. 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. 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. Дисбаланс между прооксидантами и антиоксидантами может привести к нарушениям деятельности репродуктивной системы [Skakkebaek NE. et al., 2022]. Окислительный стресс нарушает процессы сперматогенеза, созревания ооцитов, стероидогенеза в яичниках, овуляции, оплодотворения, имплантации и эмбрионального развития, приводя к бесплодию или прерыванию беременности [Gualtieri, R. et al., 2021].

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. 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.

### **Степень разработанности темы исследования**

На сегодняшний день в литературе опубликованы достаточно противоречивые данные о влиянии окислительного стресса на возникновение бесплодия у супружеских пар. Определения уровня активных форм кислорода и общей антиоксидантной защиты в периферической крови, фолликулярной жидкости и эякуляте у супружеских пар с различными типами бесплодия позволят повысить шансы положительного исхода в программах ВРТ путем назначения прегравидарной подготовки.

### **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 клиничко-анамнестические критерии.

3. Провести сравнительный анализ частоты наступления беременности и ранних репродуктивных потерь в 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 28,9 кг/м<sup>2</sup>). 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 нед 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 нед 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 бластоцист 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 и сбор биологического материала, а также клиническую и статистическую интерпретацию полученных данных. 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.

### **Апробация работы**

Работа обсуждена на межклинической конференции 23.06.2022 и заседании апробационной комиссии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (09.01.2023, протокол №1), а также представлена в виде устного доклада на Всероссийском форуме «Мать и дитя» (Москва, 2021).

### **Внедрение результатов исследования в практику**

Полученные в работе результаты позволили начать разработку тест-системы по оценке окислительного стресса у пациентов с бесплодием, внедрение которой происходит в отделении вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени профессора Б.В. Леонова ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России.

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.

### **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.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

В работе обследовано 115 супружеских пар, обратившихся по поводу лечения бесплодия в отделение вспомогательных репродуктивных технологий в лечении бесплодия имени профессора Б.В. Леонова (руководитель — профессор, д.м.н. Калинина Е.А.). В исследование включались женщины в возрасте до 38 лет с сохранённым овариальным резервом по данным УЗИ и гормонального профиля, а также с отсутствием противопоказаний для проведения программ ВРТ. Критериями исключения являлись противопоказания к проведению программы ВРТ, изложенные в приказе Минздрава России №803н от 31.07.2020 г. «О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению».

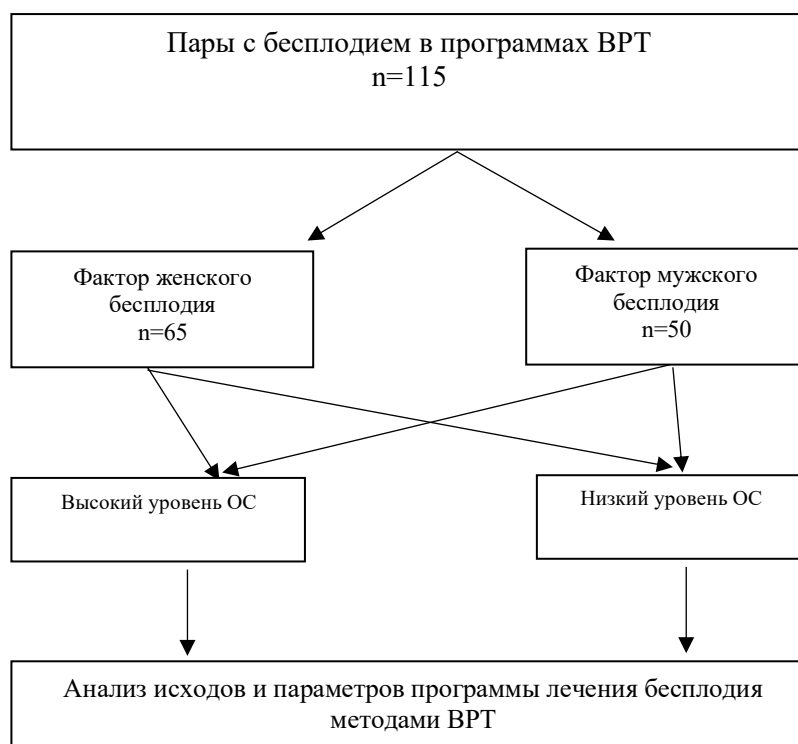
Перед началом программы от каждой супружеской пары было получено письменное добровольное информированное согласие на участие в исследовании. Все пациенты прошли полное обследование перед проведением программы ВРТ, которое включало сбор анамнестических данных, клинико-лабораторные и функциональные методы исследования в соответствии с действующими клиническими рекомендациями «Женское бесплодие» (2021).

Для решения поставленных задач все супружеские пары были разделены на 2 группы: 1 группу составили супружеские пары с женским фактором бесплодия (n=65), 2 группу — супружеские пары с мужским фактором бесплодия (n=50). Дизайн исследования представлен на рисунке 1.

Овариальная стимуляция проводилась по протоколу с препаратами антагонистов 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. 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-мя и более фолликулами размеров  $\geq 17$  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.



**Рис. 1.** Дизайн исследования

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 1.

Таблица 1. **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

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 ( $\beta$ -ХГЧ) для диагностики беременности.

Из специальных методов обследования в работе использованы: оценка окислительного стресса и уровня АФК в периферической крови, фолликулярной жидкости и эякуляте с помощью анализатора FORM 3000 (с наборами FORD и FORT) в день трансвагинальной пункции фолликулов яичников.

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  $p$ -value=0,05 был принят как критический.

### **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

Для решения первой задачи были оценены клинико-anamнестические данные и параметры фолликуло-, оогенеза и раннего эмбриогенеза у 65 пациенток с различными факторами бесплодия.

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. Согласно представленным данным, включенные в исследование женщины соответствовали обозначенным критериям включения/исключения, большинство без вредных привычек, распространенность фактора мужского бесплодия — 61,5%, трубно-перитонеального фактора — 78,4%.

Таблица 2. Клинико-анамнестические 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 <sup>2</sup> *	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]

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]

Женщины, включенные в исследование, 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: Me [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 бластоцист не осуществляли. Как видно из таблицы 4, супружеские пары были сопоставимы и по эмбриологическим показателям программы лечения бесплодия методами ВРТ. Для решения второй задачи в день трансвагинальной пункции яичников проводили забор периферической крови и фолликулярной жидкости для определения общего уровня активных форм кислорода и показателей общей антиоксидантной защиты у женщин с бесплодием и выявляли наиболее

значимые клинико-anamnestические критерии. Для выявления связей между основными клиническими и эмбриологическими показателями программ ВРТ и понимания прогностической значимости выделенных критериев была рассчитана корреляция Спирмена, представленная в таблице 5. Значимые корреляции отмечены звездочкой (\*).

**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	<b>0,188 (0,107)</b>	<b>0,238 (0,039)*</b>
АМГ	0,079 (0,499)	-0,126 (0,281)
ФСГ	-0,052 (0,662)	0,030 (0,803)
Кол-во дней стимуляции	<b>0,293 (0,011)*</b>	<b>-0,069 (0,557)</b>
% зрелости ооцитов	0,162 (0,164)	-0,064 (0,582)
% 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)

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.

**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)
% зрелости ооцитов	-0,021 (0,892)	-0,027 (0,865)
% 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)

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.

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 решения 3 задачи был проведен сравнительный анализ частоты наступления беременности и ранних репродуктивных потерь в группах с женским фактором бесплодия с учетом показателей АФК и антиоксидантной защиты. 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. Группу с клинически подтвержденной беременностью составили 27 женщин, с отсутствием беременности — 38 пар. Результаты оценки с уровнем достоверности показаны в таблице 7.

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 ( $0,1 > p > 0,05$ ) к различию средних значений АФК в периферической крови у пациенток с успешно развивающейся и прервавшейся до 12 недель беременностью ( $p=0,064$ ).



Таблица 7. Сравнение средних значений АФК и ОАС в периферической крови и фолликулярной жидкости по группам пациенток

	<b>Беременность наступила (n=27)</b>	<b>Беременность не наступила (n=38)</b>	<b>p-value</b>
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]	<b>0,024</b>
	<b>Беременность наступила (n=12)</b>	<b>Беременность не наступила (n=25)</b>	<b>p-value</b>
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
	<b>Прогрессирующая беременность в 12 недель(n=22)</b>	<b>Прерывание беременности в 12 недель (n=43)</b>	<b>p-value</b>
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]	<b>0,039</b>
	<b>Прогрессирующая беременность в 12 недель (n=10)</b>	<b>Прерывание беременности в 12 недель (n=27)</b>	<b>p-value</b>
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

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 8.

Таблица 8. Сравнение средних значений АФК и ОАС

	<b>АФК (n=43)</b>	<b>ОАС (n=43)</b>	<b>Т-критерий Стьюдента (p- value)</b>
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 8 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):

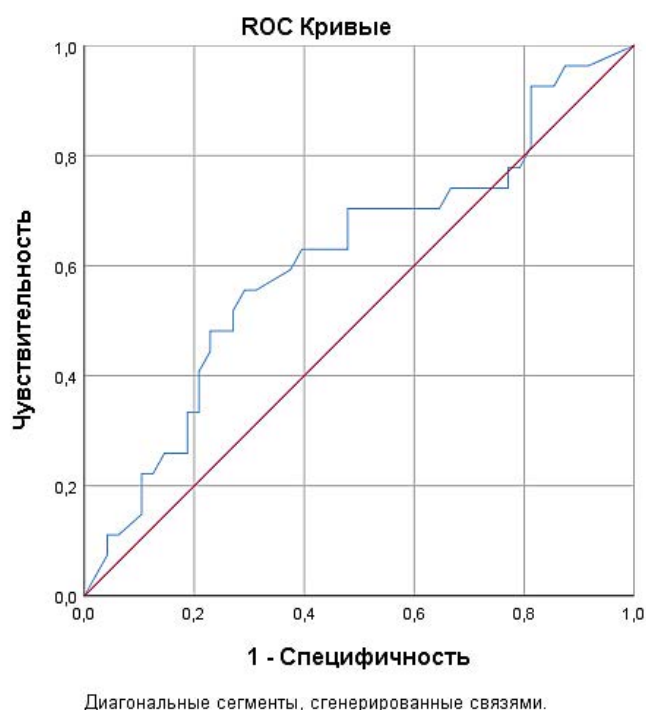
$$P=1/(1+e^{-z}) * 100\% \quad z=-4,3+1,0 * \text{ХАФК-кровь}, \quad (1)$$

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 1.

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 20,7%. 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.



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

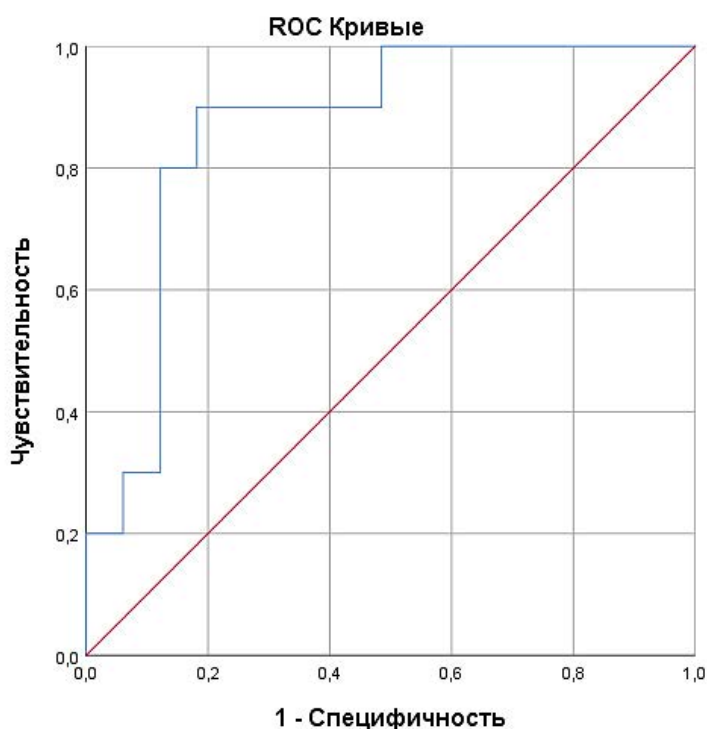
Также была разработана прогностическая модель для определения вероятности развития беременности до 12 нед в зависимости от показателей АФК и ОАС в ФЖ методом бинарной логистической регрессии. Наблюдаемая зависимость описывается уравнением (2):

$$P = 1 / (1 + e^{-z}) * 100\% \quad z = -3,65 + 2,86 * \text{ХАФК-фж} - 2,95 * \text{ХОАС-фж}, \quad (2)$$

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 с 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  $P$  было определено с помощью метода анализа ROC-кривых. Полученная кривая представлена на рисунке 2.



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

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 33,8%. При значениях  $P > 33,8\%$  определялась высокая вероятность развития беременности до 12 недель, а при значениях  $P < 33,8\%$  — низкая. Чувствительность и специфичность модели (2) при данном пороговом значении составили 80,0% и 87,9%, соответственно.

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.

На следующем этапе для решения 4 задачи было обследовано 50 супружеских пар с диагнозом мужское бесплодие. Возраст женщин составил 33 года, возраст мужчин — 35,9 лет. Описательная статистика участников исследования представлена в таблице 9.

**Таблица 9. Клинико-anamnestические 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 <sup>2</sup> *	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 10. 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.

**Таблица 10. 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]

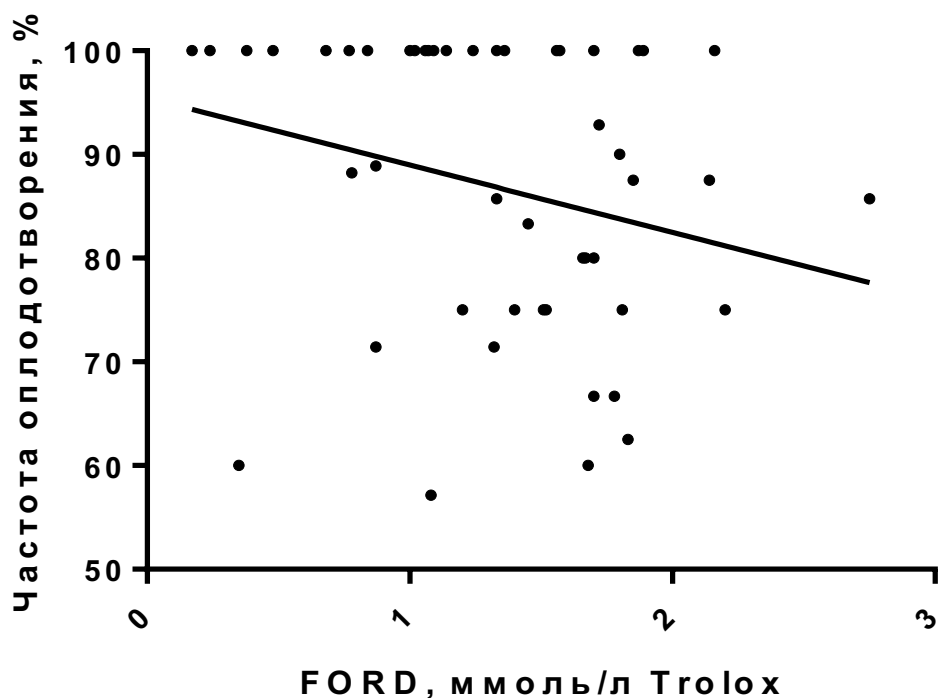
Для выявления возможной связи ОАС эякулята с основными клиническими и эмбриологическими показателями программ ВРТ был проведен корреляционный анализ Спирмена. Результаты представлены в таблице 11. По данным корреляционного анализа была выявлена отрицательная корреляция общей антиоксидантной способности эякулята с уровнем оплодотворения ооцитов ( $r=-0,288$ ;  $p=0,042$ ), то есть при увеличении суммарной антиоксидантной способности методом FORD частота оплодотворения снижалась (рис.3). 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 ( $r=0,275$ ;  $p=0,053$ ).

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 супружеской пары диагностировали беременность, в то время как у 29 был отрицательный результат. 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 12. Значимые результаты обозначены звездочкой (\*). 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 — 38,7, а в другой группе — 64,2 ( $U=180,5$ ,  $p=0,015$ ).

Таблица 11. 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
<b>Частота оплодотворения, %</b>	<b>-0,288</b>	<b>0,042</b>
Эмбрионы отличного качества (5 сутки)	0,112	0,439
Эмбрионы хорошего качества (5 сутки)	0,151	0,296
Эмбрионы неудовлетв. качества (5 сутки)	-0,059	0,684
Криоконсервированные эмбрионы	0,031	0,832
Зрелость перенесенного эмбриона (степень экспансии полости бластоцисты)	0,275	<b>0,058</b>

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 2,6%, в группе с ее отсутствием — 1,2%. 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 отсутствием беременности — 0,45 ( $U=285$ ,  $p=0,627$ ).



**Рис. 3.** Изменение частоты оплодотворения ооцитов в зависимости от уровня антиоксидантной способности



Таблица 12. 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 эмбрионов отличного качества (5 день)	0,158	0,693	128,5	<b>0,001*</b>
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 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	<b>0,015*</b>
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	<b>0,001*</b>
ОАС, ммоль/л Trolox	0,948	0,335	285,0	0,627

## 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 кг/м<sup>2</sup> 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 бластоцист 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  $>25$  кг/м<sup>2</sup> 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Активные формы кислорода и компоненты системы антиоксидантной защиты как маркеры прогнозирования качества эмбрионов у супружеских пар с различными типами бесплодия. / Смольникова В.Ю., Агаджанян Д.С., Красный А.М. // **Акушерство и гинекология.** 2020. № 11. С. 55-60.
2. Особенности эмбриологического этапа программ лечения бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий в зависимости от уровня общей антиоксидантной способности нативного эякулята. /Агаджанян Д.С., Лобанова Н.Н., Смольникова В.Ю., Макарова Н.П., Красный А.М., Щипицына В.С., Садекова А.А., Кокоева Д.Н., Калинина Е.А. // **Акушерство и гинекология.** 2022. № 5. С. 101-108.
3. Оценка маркеров окислительного стресса у женщин с бесплодием в программах вспомогательных репродуктивных технологий. / Агаджанян Д.С., Смольникова В.Ю., Красный А.М., Лобанова Н.Н., Щипицына В.С., Садекова А.А., Макарова Н.П., Калинина Е.А. // **Акушерство и гинекология.** 2022. № 9. С. 64-70.