

На правах рукописи

ЛИХАЧЕВА Виктория Васильевна

**ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОЕ ОПЛОДОТВОРЕНИЕ:
ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ РАЗЛИЧНЫХ
ФОРМ БЕСПЛОДИЯ И ИХ ВЛИЯНИЕ НА ИСХОДЫ ЛЕЧЕНИЯ**

14.01.01 – Акушерство и гинекология

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук**

Москва – 2020 год

Работа выполнена в Новокузнецком государственном институте усовершенствования врачей – филиале федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный консультант:

член-корреспондент РАН,
доктор медицинских наук, профессор **Краснопольская Ксения Владиславовна**

Официальные оппоненты:

Долгушина Наталия Витальевна – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заместитель директора – руководитель департамента организации научной деятельности;

Гзгзян Александр Мкртичевич – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, руководитель отделения вспомогательных репродуктивных технологий;

Варганян Эмма Врановна – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Российский университет дружбы народов» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, профессор кафедры акушерства, гинекологии и репродуктивной медицины факультета непрерывного медицинского образования медицинского института.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится «_____» _____ 2020 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.048.01 при Государственном бюджетном учреждении здравоохранения Московской области «Московский областной научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии» по адресу: 101000, Москва, ул. Покровка, д. 22А.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке (<http://moniiag.ru>) Государственного бюджетного учреждения здравоохранения Московской области «Московский областной научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии» по адресу: 101000, Москва, ул. Покровка, д. 22А.

Автореферат разослан «_____» _____ 20_____ г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор

Зайдиева Янсият Зайдилаевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Прогрессирующее ухудшение репродуктивного здоровья является не только медицинской, но и социальной проблемой. По данным литературы, в мире бесплодны не менее 48,5 млн супружеских пар, из которых более половины нуждаются в применении вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) (Bahamondes L. et al., 2014). В структуре причин бесплодия наиболее часто встречаются: нарушение проходимости маточных труб, воспалительные заболевания органов малого таза, ановуляция, врожденные пороки развития гениталий, заболевания с неуточненным патогенезом (наружный генитальный эндометриоз, аденомиоз) и аутоиммунными проявлениями, а также мужской фактор. Применение ВРТ позволяет лишь отчасти решить проблему бесплодия, поскольку даже при получении эмбрионов приемлемого качества и отсутствии патологии эндометрия эффективность программ экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) не превышает 38% при использовании собственного генетического материала (Регистр ВРТ РАРЧ, 2017 г.). Все еще недостаточный терапевтический потенциал метода ЭКО предопределяет актуальность дальнейших исследований, направленных на повышение его эффективности (Струкова С.А., 2013; Краснопольская К.В., 2016; Fatemi H.M. et al., 2009). Отсутствие имплантации эмбрионов хорошего качества в программах ЭКО, не связанное с влиянием возрастного и маточного факторов, позволяет предположить воздействие иммунологического статуса пациентки на данный процесс.

В результате научного поиска рядом исследователей показано, что одной из причин отсутствия имплантации эмбрионов и прогрессирования беременности являются изменения цитокинового профиля, особенно IL-6, IL-8, IL-11, LIF, интерферона-гамма (ИФН- γ), TGF- β , EGF, TNF- α , сосудисто-эндотелиального (VEGF) и других факторов роста (Singh M. et al., 2011; Altun T. et al., 2011; Bahamondes L. et al., 2014; Rahiminejad M.E. et al., 2015; Lingling Gao et al., 2016), наблюдаемых при различных заболеваниях. Особое внимание уделяется ряду полифункциональных белков, в числе которых альфа-2-

макроглобулин ($\alpha 2$ -МГ), альфа-1-антитрипсин ($\alpha 1$ -АТ), ассоциированный с беременностью альфа-2-гликопротеин (АБГ), лактоферрин (ЛФ), альбумин (АЛБ) (Зорин Н.А. и др., 2013; Templer S., Sacks G.A., 2016).

Несмотря на повышенный интерес к иммунологическим исследованиям в области репродуктивной медицины, на сегодняшний день отсутствуют данные о динамике иммунологических показателей у пациенток с различными формами бесплодия в процессе индукции суперовуляции в программах ЭКО и их влиянии на результативность данных программ.

В этой связи представляется актуальным определение не только динамики вышеперечисленных биомаркёров в программах стимуляции суперовуляции у пациенток с различными формами бесплодия, но и возможность прогнозирования исхода программы ЭКО в зависимости от выявленных изменений.

Степень разработанности темы исследования

Изучению роли различных биомаркёров в прогнозировании исходов программ ЭКО уделяется большое внимание (Nyalwidhe J., Burch T., 2013; Tortorella C., 2014). Однако, отсутствуют данные о динамике иммунологических параметров в процессе стимуляции суперовуляции у пациенток с различными формами бесплодия.

Также не проводилась оценка комплекса иммунологических параметров ($\alpha 2$ -МГ, $\alpha 1$ -АТ, АБГ, ЛФ, АЛБ, ФНО- α , ИЛ-6, ИЛ-8, ИФН- γ , VEGF) в сыворотке крови и фолликулярной жидкости (ФЖ) с определением роли конкретных иммунологических маркёров в прогнозировании исхода программ ЭКО при различных формах бесплодия.

Цель исследования: определить роль иммунологических и биохимических параметров в прогнозировании исходов программ экстракорпорального оплодотворения у пациенток с различными формами бесплодия (мужской, трубно-перитонеальной, эндокринной на фоне синдрома поликистозных яичников и эндометриоз-ассоциированной).

Для достижения поставленной цели определены следующие **задачи исследования:**

1. Изучить сывороточное содержание регуляторно-транспортных белков и цитокинов у здоровых фертильных женщин, а также у пациенток с первичным и вторичным бесплодием мужского генеза.

2. Оценить динамику изучаемых иммунологических показателей сыворотки крови в ответ на индукцию суперовуляции и введение триггера финального созревания ооцитов, а также иммунологический состав фолликулярной жидкости у пациенток с мужским фактором бесплодия и взаимосвязь их с исходом программ ЭКО.

3. Уточнить особенности системных и локальных иммунологических изменений у пациенток с трубно-перитонеальным бесплодием в зависимости от степени выраженности перенесённого воспаления в малом тазу, динамику их в программах ЭКО и влияние на результативность.

4. Определить особенности системного и локального иммунитета у больных с синдромом поликистозных яичников (СПЯ) и эндокринным бесплодием в зависимости от вида триггера финального созревания ооцитов, влияние их на исход программы ЭКО и риск развития синдрома гиперстимуляции яичников.

5. Изучить характер системных и местных иммунологических изменений у инфертильных пациенток с наружным генитальным эндометриозом 1–2 ст. (НГЭ 1-2 ст.) и оценить их влияние его на исходы программ ЭКО.

6. Разработать систему прогнозирования исхода программы ЭКО при селективном переносе в полость матки нативного эмбриона с учетом особенностей иммунологического профиля женщины.

7. Провести сравнительный анализ частоты наступления беременности в группах риска отрицательного исхода программ ЭКО при переносе в полость матки нативных эмбрионов и в криоциклах.

Научная новизна исследования

Проведено комплексное исследование иммунологического профиля инфертильных пациенток, принимающих участие в программах ЭКО. Изучение

иммунологических параметров здоровых женщин и пациенток с бесплодием мужского генеза позволило определить референсные значения данных показателей для фертильных небеременных женщин в возрасте до 35 лет с сохраненным овариальным резервом.

Продемонстрирован ряд изменений в белковом и цитокиновом профиле венозной крови инфертильных пациенток с наиболее распространенными факторами бесплодия (трубно-перитонеальном, эндокринном на фоне СПЯ, эндометриоз-ассоциированном при НГЭ 1–2 ст.), отличающих их от здоровых фертильных женщин и показана динамика данных иммунологических показателей в процессе индукции суперовуляции в программе ЭКО, присущая каждой из нозологических форм.

Определена взаимосвязь иммунологических сдвигов при стимуляции суперовуляции с исходом программ ЭКО у пациентов с различными формами бесплодия.

Определены критерии развития «поздней» формы синдрома гиперстимуляции яичников на основе изучения биохимических и иммунологических параметров сыворотки крови и ФЖ.

Разработан алгоритм персонифицированного прогнозирования риска отрицательного исхода программы ЭКО у пациенток с трубно-перитонеальным, эндокринным на фоне СПЯ, эндометриоз-ассоциированным бесплодием при НГЭ 1-2 ст., основанный на математической модели уравнения логит-регрессии с учетом изменений уровней регуляторно-транспортных белков и цитокинов, позволяющий с достаточно высокой вероятностью прогнозировать исход лечения в программе ЭКО при селективном переносе в полость матки нативного эмбриона.

Теоретическая и практическая значимость работы

В результате проведенного исследования показана динамика ряда иммуно-регуляторных белков и цитокинов при проведении индукции суперовуляции в программах ЭКО у здоровых женщин (с бесплодием мужского генеза), что позволило определить референсные значения данных параметров для программ ЭКО.

Полученные данные в сопоставлении с аналогичными значениями у пациенток с наиболее распространенными формами бесплодия (трубно-перитонеальной, эндокринной на фоне СПЯ и ассоциированной с НГЭ 1-2 ст.) позволили выявить особенности иммунологического профиля женщин при этих заболеваниях с оценкой влияния их на исход программ ЭКО, что легло в основу построения математической модели прогнозирования отрицательного результата данных программ.

При получении результатов, прогнозирующих негативный исход процедуры ЭКО с переносом в полость матки нативного эмбриона рекомендуется сегментация цикла с отсроченным эмбриотрансфером. Такая тактика позволяет повысить частоту наступления беременности у пациенток группы риска отрицательного исхода программ ЭКО.

Методология и методы исследования

Настоящая работа была выполнена на базе Клиники женского здоровья и репродукции человека «Медика-2» г. Новокузнецк, с 2016 года вошедшей в группу компаний «Мать и дитя», а также НИЛ иммунологии Новокузнецкого ГИУВа – филиала ФГБОУ ДПО РМАНПО МЗ РФ в 2013 – 2018 гг. Для решения поставленных задач в работе ретроспективно обработаны 3969 циклов ЭКО для выявления клинических предикторов неудач имплантации, а также проспективно отслежены клинические исходы 317 лечебных циклов ЭКО у пациенток с углубленным иммунологическим обследованием при наиболее распространенных формах бесплодия: трубно-перитонеальной, эндокринной (на фоне СПЯ), эндометриоз-ассоциированной (при НГЭ 1-2 степени). Группу контроля составили пациентки с бесплодием мужского генеза.

Предметом исследования являлись изменения содержания регуляторно-транспортных белков и цитокинов в венозной крови и фолликулярной жидкости инфертильных пациенток при перечисленных факторах бесплодия.

При написании работы в методологическом плане использовалась совокупность общенаучных и специальных методов. Кроме того, применялся метод формализации, заключающийся в разработке математического коэффициента с учетом значимых клинических и лабораторных показателей для объективизации оценки риска отрицательного исхода программ ЭКО.

Из экспериментальных методов исследования использовались: метод наблюдения (анализ анамнеза и данных клинико-лабораторного обследования инфертильных пациенток, а также ретроспективное изучение распространенности среди причин бесплодия конкретных нозологических форм и влияние их на результативность программ ЭКО), метод эксперимента (изучение содержания регуляторно-транспортных белков и цитокинов в образцах сыворотки венозной крови и фолликулярной жидкости), метод сравнения (анализ лабораторных данных в зависимости от причины бесплодия, динамики их в ходе индукции суперовуляции в программе ЭКО, а также влияния на ее исход и развитие синдрома гиперстимуляции яичников, коррелятивный анализ результатов исследования). Из эмпирическо-теоретических методов использовались методы аналогии, индукции и дедукции (сравнение полученных результатов с опубликованными данными других авторов, позволяющее выдвинуть ряд предположений по различиям в патогенезе бесплодия при разных заболеваниях органов малого таза, динамики их в ответ на индукцию суперовуляции и исходов программ ЭКО, а также по наличию общих тенденций и изменений, позволяющих сформировать обобщенные рекомендации по прогнозу исхода программ ЭКО и развития синдрома гиперстимуляции яичников (СГЯ) и тактике ведения пациенток группы риска).

У всех пациентов, включенных в исследование, получено информированное согласие.

Положения, выносимые на защиту:

1. Иммунологический профиль здоровых фертильных небеременных женщин в возрасте до 35 лет с сохранным овариальным резервом и пациенток с мужским фактором бесплодия сопоставим. Отсутствие влияния динамики сывороточных показателей в программе ЭКО на ее результат позволяет расценивать данную ситуацию как нормальную иммунную реакцию на проведение индукции суперовуляции и введение триггера финального созревания ооцитов и использовать значения данных показателей в качестве референсных. Иммунологический и биохимический состав фолликулярной жидкости здоровых женщин (с бесплодием мужского генеза) не отличается в

подгруппах с положительным и отрицательным результатом программ ЭКО, что также позволяет использовать диапазон полученных иммунологических значений в качестве референсных для программ ЭКО.

2. Иммунологический профиль и частота наступления беременности в программах ЭКО у пациенток с ТПБ зависят от выраженности и сохраняющейся субклинической активности перенесённого воспаления, проявлением чего являются повышенные сывороточные значения ФНО- α и α 1-АТ. При минимальном поражении маточных труб и отсутствии лабораторных признаков воспаления (подгруппа 1) динамика иммунологических показателей и частота наступления беременности (38,3%) была аналогична группе контроля (38,0%). При наличии лабораторных признаков субклинического воспаления (подгруппа 2) частота наступления беременности значительно ниже (24,4%), чем в группе контроля (38%), а отрицательный исход программ ЭКО ассоциируется с повышением концентрации ФНО- α в сыворотке крови ≥ 3 пкг/мл (с чувствительностью 100%) и снижением уровня ОБ в фолликулярной жидкости ≤ 57 г/л (с чувствительностью 80%).

3. Особенности изучаемых показателей инфертильных пациенток с СПЯ являются повышенные концентрации общего белка и альбумина в сыворотке крови. Динамика иммунологических показателей в сыворотке крови и состав ФЖ зависит от вида триггера финального созревания ооцитов. Предикторами отрицательного исхода программ ЭКО при СПЯ с применением ХГЧ-триггера являются снижение уровня ИЛ-8 ≤ 130 пкг/мл (чувствительность 90%) и альбумина ≤ 38 г/л (чувствительность 80%) в фолликулярной жидкости. В развитии «поздней» формы синдрома гиперстимуляции яичников предикторная роль принадлежит повышению α 1-АТ, ассоциированного с беременностью α 2-гликопротеина, сосудисто-эндотелиального фактора роста VEGF в сыворотке крови и ИФН- γ в ФЖ при достоверном снижении уровней АЛБ, ФНО- α и ИЛ-8 в обеих биологических жидкостях.

4. Иммунологический профиль инфертильных женщин с НГЭ 1-2 ст. отличается от группы контроля повышением сывороточных значений α 2-МГ, α 1-АТ, ИФН- γ , АЛБ, ОБ и снижением концентрации ИЛ-6 в сыворотке крови, а также снижением концентрации ЛФ, ИЛ-8 и повышением уровня ОБ и ИФН- γ в фолликулярной жидкости. ЧНБ в данной группе (37,5%) не отличается от

группы контроля (38%). Предиктором отрицательного исхода программы ЭКО является повышенный уровень сывороточного АЛБ в день ТВП $\geq 47,5$ г/л (с чувствительностью 80%).

5. Выявленные изменения изученных показателей и коррелятивных взаимосвязей подтверждают активное участие регуляторно-транспортных белков и цитокинов в патогенезе имплантации человеческого эмбриона, что позволяет усовершенствовать прогнозирование исхода программ ЭКО путем создания высокоэффективной компьютерной программы расчета риска отрицательного их исхода в стимулированном цикле и рекомендовать сегментацию цикла с «отсроченным» переносом эмбрионов с целью повышения эффективности данных программ.

Личный вклад автора в проведенное исследование

Личный вклад автора заключается в постановке основных задач исследования; разработке методологии и комплекса процедур для их решения; в отборе женщин в группы исследования; непосредственном проведении исследования на всех его этапах; в построении алгоритма выработки рекомендаций по управлению состоянием пациенток с выраженными функциональными нарушениями; построении прогнозирующей модели риска отрицательного исхода программы ЭКО, оценке качества алгоритма и модели; разработке программных реализаций построенных моделей и алгоритма; написании и подготовке к публикации научных работ по теме диссертации, а также оформлении патентов на изобретение.

Степень достоверности и апробация работы

Степень достоверности полученных результатов достигнута за счет количества наблюдений, объема проведенных исследований, использования современных методов статистической обработки материала.

Диссертационная работа обсуждена на заседании апробационной комиссии Новокузнецкого государственного института усовершенствования врачей – филиала федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации 27 ноября 2018 года (протокол № 9).

Внедрение результатов исследования в практическое здравоохранение

Результаты данного исследования используются в работе Клиники женского здоровья и репродукции человека «Медика-2» ГК «Мать и дитя» г. Новокузнецк, отделениях ВРТ Новокузнецкого перинатального центра и ООО «Медиасервис», используются в образовательных программах кафедры акушерства и гинекологии Новокузнецкого государственного института усовершенствования врачей – филиала Российской медицинской академии непрерывного последипломного образования.

Публикации

Печатных работ по данной теме в журналах, сборниках и материалах российской и международных конференций – 24, в том числе в журналах из перечня ВАК при Минобрнауки РФ – 10, патентов на изобретение – 7, программа для ЭВМ - 1.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 208 страницах машинописного текста, содержит введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, 8 глав, отражающих собственные результаты, заключение и выводы. Работа содержит 41 таблицу, иллюстрирована 48 рисунками. Список использованной литературы содержит 322 наименования, из них: 123 отечественных и 199 иностранных источников.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования

Настоящая работа является результатом исследования, проводившегося на протяжении 2013–2018 гг. в Клинике женского здоровья и репродукции человека «Медика-2» г. Новокузнецк, с 2016 г. вошедшей в группу компаний «Мать и дитя». **Основные группы** составили 317 инфертильных пациенток, принимавших участие в программах ЭКО.

Критерии включения: 1) отсутствие противопоказаний к ЭКО и вынашиванию беременности; 2) возраст до 35 лет; 3) сохранённый овариальный резерв; 4) изолированная причина бесплодия; 5) наличие эмбриона высокого класса качества.

Критерии исключения: 1) аномалии развития матки; 2) аденомиоз; 3) тяжелые формы наружного генитального эндометриоза; 4) миома с деформацией полости матки; 5) гипоплазия эндометрия; 6) возраст старше 35 лет; 7) ожирение; 8) злокачественные новообразования (в том числе в анамнезе); 9) инфекционные и аутоиммунные заболевания.

Все пациентки были разделены на 4 группы в зависимости от причины бесплодия (трубно-перитонеальное, эндокринное на фоне СПЯ, эндометриоз-ассоциированное и связанное с мужским фактором). Здоровые женщины с бесплодием мужского генеза составили группу контроля.

В дальнейшем, по факту наступления клинической беременности пациентки каждой группы были разделены на подгруппы: с положительным и отрицательным результатом программы ЭКО.

Кроме того, отдельную группу составили 11 пациенток из группы СПЯ, наступление беременности у которых осложнилось развитием «поздней» формы синдрома гиперстимуляции яичников.

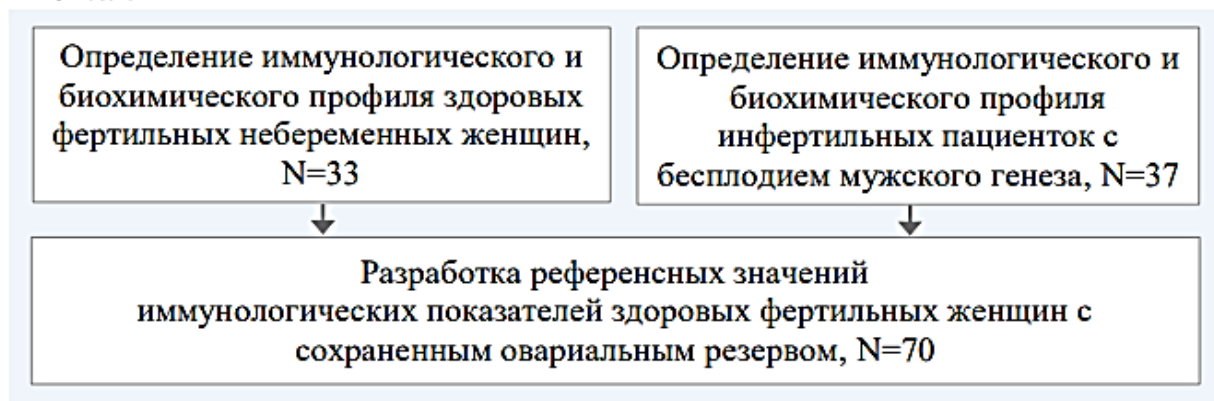
Дизайн исследования представлен на рис. 1.

На первом этапе проведено изучение иммунологических и биохимических показателей здоровых фертильных женщин, а также пациенток с бесплодием мужского генеза. Сопоставимость полученных данных в этих двух группах позволила сформировать средние и диапазон референсных значений изучаемых показателей для здоровых женщин с сохранённым овариальным резервом.

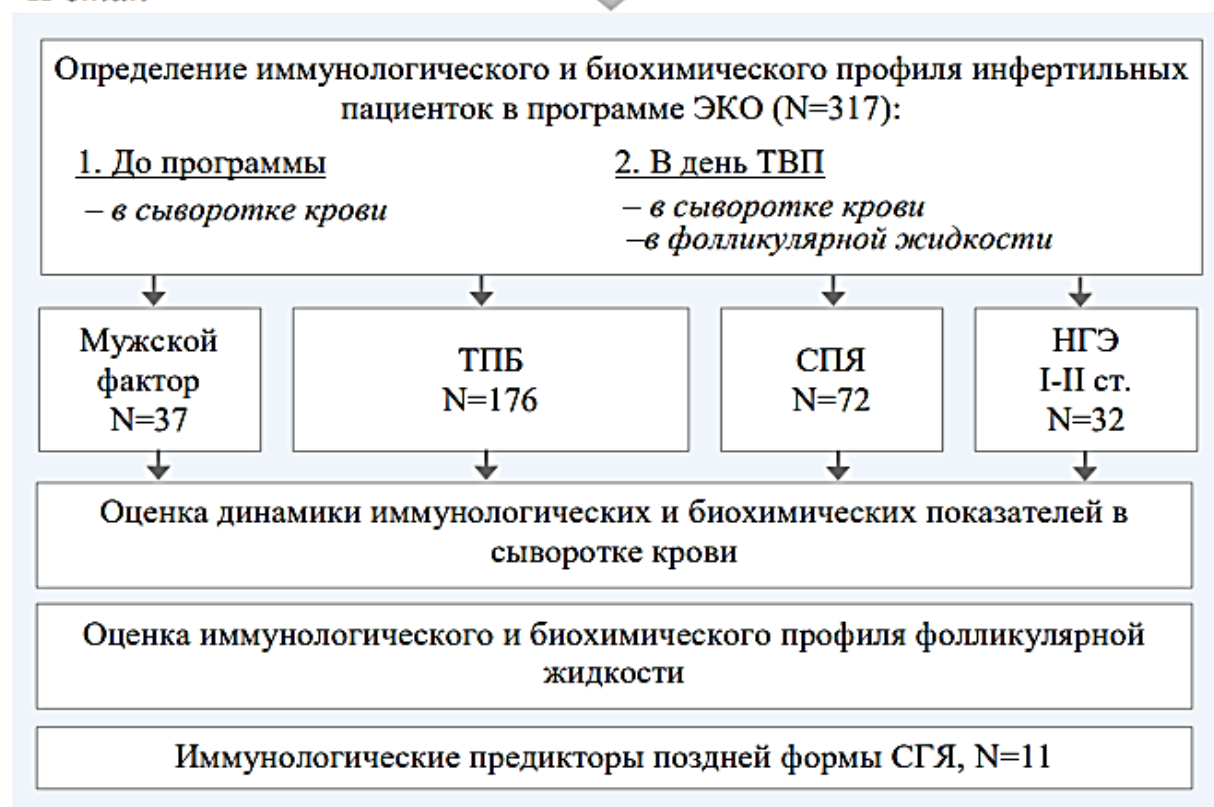
На втором этапе выявлены особенности иммунологического и биохимического профиля пациенток при наиболее распространенных формах женского бесплодия (трубно-перитонеальной, эндокринной на фоне синдрома поликистозных яичников и ассоциированной с НГЭ 1–2 степени) и проведена оценка динамики исследуемых показателей в сыворотке крови от вступления в программу ЭКО ко дню трансвагинальной пункции фолликулов, а также

исследование состава ФЖ. Полученные данные сравнивали с показателями группы контроля (мужской фактор бесплодия) и оценивали влияние их на результативность программ ЭКО в данных группах. Кроме того, исследованы иммунологические параметры у пациенток с развившимся синдромом гиперстимуляции яичников в группе с эндокринным бесплодием.

I этап



II этап



III этап

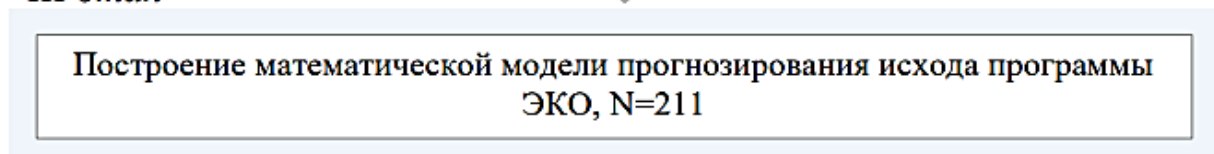


Рисунок 1 – Дизайн исследования

На третьем этапе разработана компьютерная программа прогнозирования отрицательного исхода программ ЭКО с использованием математической модели логит-регрессии с учетом клинико-иммунологического профиля пациенток на основании ретроспективного анализа 3.969 циклов ЭКО и проспективного исследования с анализом иммунологических параметров 211 пациенток.

Клиническое обследование проводилось согласно приказа Министерства здравоохранения РФ от 30 августа 2012 г. № 107н «О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению». Содержание $\alpha 2$ -МГ, $\alpha 1$ -АТ и АБГ определяли методом количественного низковольтного ракетного иммуноэлектрофореза. Концентрацию ЛФ, цитокинов (ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО- α , ИФН- γ , VEGF) в сыворотке крови и фолликулярной жидкости – методом ИФА с использованием соответствующих коммерческих тест-систем ЗАО «Вектор - Бест» (г. Новосибирск, Россия). Концентрации АЛБ и ОБ сыворотки крови и фолликулярной жидкости изучали биохимическими методами. Все расчеты проводились в свободно распространяемой программной среде статистической обработки данных R v.3.4.0., включающей все необходимые методы описательной и вариационной статистики. Нормальность распределения проверялась с помощью критерия Колмогорова-Смирнова (D_{KS}). Для сравнения признаков, распределение которых отлично от нормального, применялись критерии Манна–Уитни (две группы) и Краскела–Уоллиса (три группы) для несвязанных выборок и критерий Вилкоксона для связанных выборок. Взаимосвязь между показателями определялась с помощью коэффициента корреляции Спирмена. Сравнение качественных признаков проводилось с помощью критерия Хи-квадрат. Для определения критического значения отдельно для каждого иммунологического показателя, независимо от влияния других показателей, применялся метод однофакторной логистической регрессии. На основе построенной модели проводился поиск порога отсечения (критического уровня показателя) при заранее заданном уровне чувствительности. За приемлемый уровень чувствительности была принята величина 80%. Для выявления критических значений каждого

показателя с учетом их взаимосвязи и характера совместного влияния на результат программы применялся метод деревьев решений (CHAID) с итерационным делением всего диапазона на отдельные интервалы. В качестве метода моделирования при большом числе качественных и количественных показателей выбрана логистическая регрессия с регуляризацией (метод LASSO). Общая оценка согласия модели и реальных данных оценивалась с использованием теста Хосмера–Лемешова. В качестве критерия, определяющего возможность классификации с помощью построенной модели, использовался критерий Колмогорова–Смирнова для двух выборок. Качество модели оценивалось с помощью ROC-кривой (показатель AUC). Пороговая точка отсечения определялась с помощью индекса J-Юдена. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез в данном исследовании принимали равным 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Регуляторно-транспортные белки и цитокины в оценке иммунологического и биохимического профиля здоровых фертильных женщин и инфертильных пациенток с бесплодием мужского генеза в программах экстракорпорального оплодотворения

При сравнении иммунологических показателей пациенток с мужским фактором бесплодия и здоровых фертильных женщин достоверных отличий выявлено не было, в связи чем показатели пациенток с мужским генезом бесплодия использовались в качестве контрольных. Частота наступления клинической беременности в результате проведенных программ ЭКО (ИКСИ) в данной группе составила 38% (14/37). Динамика иммунологических и биохимических параметров в цикле стимуляции характеризовалась достоверным снижением концентраций АЛБ и ИЛ-8, а также повышением уровня VEGF в составе сыворотки крови без влияния на результативность программ ЭКО (табл.1). Отсутствие влияния изучаемых параметров на исход программы ЭКО позволяет интерпретировать их как нормальную иммунную реакцию на проводимое лечение, а полученные значения использовать в качестве референсных.

Таблица 1 – Сывороточные концентрации иммунологических и биохимических показателей женщин группы контроля (мужской фактор бесплодия) в зависимости от исхода программы ЭКО

Показатели	До стимуляции			После стимуляции (день ТВП)			Анализ динамики
	Б+	Б-	U(p)	Б+	Б-	U(p)	
Альбумин г/л	45,98 ±0,62	45,83 ±0,77	0,54 (0,589)	43,57 ±0,45	42,23 ±0,76	1,31 (0,19)	W^{к(+)}=2,07, p=0,038 W^{к(-)}=2,76, p=0,006
ИЛ-8 пкг/мл	6,36 ±0,43	7,03 ±0,56	0,77 (0,442)	3,74 ±0,57	3,97 ±0,99	0,49 (0,625)	W^{к(+)}=2,66, p=0,008 W^{к(-)}=2,10, p=0,036
VEGF пкг/мл	86,34 ±9,97	79,54 ±9,58	0,44 (0,662)	136,84 ±15,06	134,02 ±20,16	0,58 (0,561)	W^{к(+)}=2,34, p=0,019 W^{к(-)}=2,10, p=0,035

Примечание. Здесь и ниже: U(p) – критерий Манна-Уитни; W^{к(+)}, W^{к(-)} – критерий для связанных выборок Вилкоксона.

Исследуемые иммунологические показатели в составе ФЖ в день трансвагинальной пункции фолликулов (ТВП) в подгруппах с первичным и вторичным бесплодием мужского генеза были идентичны и не имели достоверных отличий у пациенток с положительным и отрицательным исходом программы ЭКО (табл. 2).

Таблица 2 – Иммунологические и биохимические показатели в составе ФЖ в день ТВП у пациенток группы контроля (с мужским фактором бесплодия) с положительным и отрицательным исходом программы ЭКО

Показатели	Б+	Б-	Сравнение по исходу U(p)
α2-МГ г/л	0,14±0,02	0,17±0,02	1,52(0,128)
α1-АТ г/л	0,23±0,03	0,26±0,03	0,57(0,571)
ЛФ мг/л	0,19±0,02	0,18±0,03	0,93(0,351)
Альбумин г/л	41,93±0,71	41,91±0,72	0,31(0,758)
ОБ г/л	61,91±1,06	61,69±0,64	0,27(0,784)
ФНО-α пкг/мл	1,85±0,54	1,33±0,18	0,22(0,826)
ИЛ-6 пкг/мл	12,55±2,6	13,82±1,54	0,99(0,324)
ИЛ-8 пкг/мл	248,53±18,29	252,41±18,14	0,16(0,87)
ИФН-γ пкг/мл	4,76±0,59	5,05±0,44	0,08(0,935)

Таким образом, динамика иммунологических параметров в программе ЭКО у женщин контрольной группы (с мужским фактором бесплодия) характеризовалась достоверным снижением сывороточных концентраций АЛБ и ИЛ-8, а также повышением уровня VEGF. Выявленные изменения не оказывали влияния на результативность программ ЭКО, что позволяет расценивать данную ситуацию как нормальную реакцию на индукцию суперовуляции и введение триггера финального созревания ооцитов. Анализируя полученные данные, с учетом описанных функций сывороточного альбумина (Клигуненко Е.Н., Зозуля О.А., 2017), можно предположить, что динамическое снижение его уровня в процессе стимуляции яичников может быть результатом активного расходования данной субстанции при транспортировке лекарственных веществ и связывании избытка эстрогенов в условиях усиленного стероидогенеза. Проведение индукции суперовуляции в нашем исследовании сопровождалось также снижением концентрации сывороточного ИЛ-8, при этом содержание данного хемокина в ФЖ в несколько десятков раз превышало его сывороточные значения. Это обстоятельство доказывает активное участие ИЛ-8 не только в иммунных процессах, но и в регуляции фолликулогенеза и овуляции, что согласуется с результатами ранее проведенных научных исследований (Gazvani M.R. et al., 2000; Gerard N. et al., 2004; Malizia B.A. et al. 2010). Что касается повышения сывороточной концентрации VEGF в день ТВП, то выявленная закономерность согласуется с данными литературы и может быть расценена как одно из звеньев воспалительной реакции, инициированной введением овуляторной дозы ХГЧ, имитирующей выброс ЛГ, целью которого является созревание ооцита и разрыв стенки фолликула (Борисова М.А. и др., 2017 г.).

Регуляторно-транспортные белки и цитокины в оценке иммунологического профиля пациенток с различными формами бесплодия и предикции исходов программ экстракорпорального оплодотворения

На втором этапе исследования в ходе изучения содержания регуляторно-транспортных белков и цитокинов в крови инфертильных пациенток с различными заболеваниями органов малого таза нами выявлены

иммунологические маркеры этих заболеваний с оценкой влияния их на исход программ ЭКО.

С учетом выявления существенных различий в содержании изученных иммунологических параметров, отражающих активность субклинического воспаления, а также частоты наступления беременности, пациентки группы **трубно-перитонеального бесплодия** (ТПБ) были разделены на 2 подгруппы. Первую подгруппу составили 94 женщины, иммунологический профиль и ЧНБ – 38,3% (36/94) у которых не имели существенных отличий от группы контроля, а поражения маточных труб были минимальными (состояния после операций по поводу трубных беременностей, аппендэктомии и т.д.). Вторую подгруппу ТПБ составили 82 пациентки, иммунологический профиль которых отличался повышенными значениями ФНО- α и α 1-АТ в сыворотке крови и гораздо более низкой ЧНБ – 24,4% (20/82). В анамнезе у пациенток 2-ой подгруппы ТПБ были более выраженные воспалительные изменения органов малого таза с исходом в адгезивный пельвиоперитонит, сакто-гидросальпинкс, хронический эндометрит. В связи с наличием значимых отличий в ЧНБ и иммунологическом статусе пациентки 1-ой и 2-ой подгрупп ТПБ в дальнейшем рассматривались по отдельности.

Проведенный анализ изучаемых иммунологических показателей сыворотки крови пациенток 1-ой подгруппы ТПБ продемонстрировал их идентичность группе контроля относительно как исходных значений до начала стимуляции яичников, так и динамики их в ответ на проводимую индукцию суперовуляции в виде достоверного снижения концентраций АЛБ, ИЛ-8 и повышения VEGF (табл. 3). Особенностью, отличающей иммунологический профиль пациенток данной подгруппы от контрольной, являлись исходно повышенные значения ИФН- γ , сохраняющиеся в процессе индукции суперовуляции. Выявленные иммунологические особенности у пациенток 1-ой подгруппы ТПБ влияния на исход программы ЭКО не оказывали. Причиной повышения уровня ИФН- γ в крови является активация системы адаптивного иммунитета в ответ на повышенную экспрессию Toll-подобных рецепторов в результате воздействия бактериальной или вирусной инфекции (Turner M.L., 2014; Ezz M.A. et al., 2019). В нашем исследовании отсутствие зависимости частоты наступления беременности в 1-ой подгруппе ТПБ от уровня ИФН- γ (умеренное повышение данного показателя как у забеременевших, так и у

незабеременевших пациенток) позволяет расценивать данный феномен как адекватную компенсаторную реакцию адаптивного иммунитета.

Таблица 3 – Регуляторно-транспортные белки и цитокины сыворотки крови в 1-й подгруппе ТПБ и контрольной группе в зависимости от исхода программы ЭКО

Показатели	Группа	До стимуляции			В день ТВП			Анализ динамики
		Б+	Б-	U(p)	Б+	Б-	U(p)	
Альбумин г/л	Конт.	45,98 ±0,62	45,83 ±0,77	0,54 (0,589)	43,57 ±0,45	42,23 ±0,76	1,31 (0,19)	W^{K(+)}=2,07, p=0,038 W^{K(-)}=2,76, p=0,006
	ТПБ-1	46,84 ±0,58	46,94 ±0,91	0,21 (0,836)	43,48 ±0,46	43,70 ±0,91	0,33 (0,745)	W^{TP(+)}=3,57, p=0<0,001 W^{TP(-)}=3,58, p=0<0,001
	U ^{K/TP} (p)	0,67 (0,5)	0,65 (0,517)	-	0,18 (0,855)	1,23 (0,22)	-	-
ИЛ-8 пкг/мл	Конт.	6,36 ±0,43	7,03 ±0,56	0,77 (0,442)	3,74 ±0,57	3,97 ±0,99	0,49 (0,625)	W^{K(+)}=2,66, p=0,008 W^{K(-)}=2,10, p=0,036
	ТПБ-1	6,25 ±0,5	7,71 ±0,74	0,95 (0,342)	3,59 ±0,46	4,42 ±0,89	0,02 (0,987)	W^{TP(+)}=3,11, p=0,002 W^{TP(-)}=3,57, p<0,001
	U ^{K/TP} (p)	0,46 (0,646)	0,14 (0,89)	-	0,24 (0,807)	0,27 (0,789)	-	-
ИФН-γ пкг/мл	Конт.	5,07 ±0,46	4,14 ±0,25	1,46 (0,145)	4,63 ±0,35	4,4 ±0,35	0,46 (0,643)	W^{K(+)}=0,78, p=0,433 W^{K(-)}=0,05, p=0,955
	ТПБ-1	6,38 ±0,36	5,41 ±0,29	1,75 (0,08)	6,16 ±0,44	6,63 ±0,42	0,62 (0,537)	W^{TP(+)}=0,28, p=0,779 W^{TP(-)}=1,89, p=0,059
	U ^{K/TP} (p)	2,22 (0,026)	2,72 (0,006)	-	2,23 (0,026)	3,38 (0,001)	-	-
VEGF пкг/мл	Конт.	86,34 ±9,97	79,54 ±9,58	0,44 (0,662)	136,84 ±15,06	134,02 ±20,16	0,58 (0,561)	W^{K(+)}=2,34, p=0,019 W^{K(-)}=2,10, p=0,035
	ТПБ-1	90,42 ±8,44	74,39 ±9,31	1,14 (0,253)	158,1 ±17,98	142,27 ±12,86	1,7 (0,089)	W^{TP(+)}=2,29, p=0,022 W^{TP(-)}=2,73, p=0,006
	U ^{K/TP} (p)	1,24 (0,215)	0,05 (0,97)	-	1,02 (0,305)	0,25 (0,803)	-	-

Сохраняющаяся активность субклинического воспаления в органах малого таза у пациенток 2-ой подгруппы ТПБ проявлялась повышением уровня острофазового белка $\alpha 1$ -АТ, а также цитокина ФНО- α (таб.4).

Таблица 4 – Концентрации регуляторно-транспортных белков и цитокинов сыворотки крови инфертильных пациенток 2-ой подгруппы ТПБ и группы контроля в зависимости от исхода программы ЭКО

Показатели	Группа	До стимуляции			После стимуляции (день ТВП)			Анализ динамики
		Б+	Б-	U(p)	Б+	Б-	U(p)	
$\alpha 1$ -АТ г/л	Конт.	3,18 $\pm 0,15$	2,98 $\pm 0,11$	0,85 (0,395)	2,95 $\pm 0,18$	3,13 $\pm 0,09$	0,44 (0,659)	$W^{K(+)}=1,12, p=0,260$ $W^{K(-)}=1,13, p=0,255$
	ТПБ-2	4,03 $\pm 0,12$	3,96 $\pm 0,13$	0,48 (0,632)	3,2 $\pm 0,12$	3,16 $\pm 0,12$	0,29 (0,772)	$W^{TP(+)}=4,11, p<0,001$ $W^{TP(-)}=3,74, p<0,001$
	$U^{K/TP}(p)$	3,38 (0,001)	4,48 (<0,001)	-	1,23 (0,22)	0,07 (0,941)	-	-
Альбумин г/л	Конт.	45,98 $\pm 0,62$	45,83 $\pm 0,77$	0,54 (0,589)	43,57 $\pm 0,45$	42,23 $\pm 0,76$	1,31 (0,19)	$W^{K(+)}=2,07, p=0,038$ $W^{K(-)}=2,76, p=0,006$
	ТПБ-2	45,85 $\pm 0,54$	46,91 $\pm 0,5$	1,45 (0,148)	45,42 $\pm 0,43$	43,75 $\pm 0,5$	2,04 (0,041)	$W^{TP(+)}=0,79, p=0,427$ $W^{TP(-)}=4,58, p<0,001$
	$U^{K/TP}(p)$	0,42 (0,671)	1,07 (0,283)	-	2,31 (0,021)	1,56 (0,118)	-	-
ФНО- α пкг/мл	Конт.	1,22 $\pm 0,08$	1,04 $\pm 0,09$	1,28 (0,2)	1,58 $\pm 0,33$	1,36 $\pm 0,33$	0,62 (0,533)	$W^{K(+)}=1,10, p=0,271$ $W^{K(-)}=0,34, p=0,733$
	ТПБ-2	2,55 $\pm 0,19$	2,23 $\pm 0,15$	1,73 (0,084)	1,33 $\pm 0,25$	2,34 $\pm 0,32$	1,97 (0,049)	$W^{TP(+)}=3,06, p=0,002$ $W^{TP(-)}=0,43, p=0,670$
	$U^{K/TP}(p)$	3,66 (<0,001)	4,23 (<0,001)	-	0,49 (0,624)	2,1 (0,036)	-	-
ИЛ-8 пкг/мл	Конт.	6,36 $\pm 0,43$	7,03 $\pm 0,56$	0,77 (0,442)	3,74 $\pm 0,57$	3,97 $\pm 0,99$	0,49 (0,625)	$W^{K(+)}=2,66, p=0,008$ $W^{K(-)}=2,10, p=0,036$
	ТПБ-2	6,77 $\pm 0,38$	7,04 $\pm 0,96$	0,93 (0,353)	3,19 $\pm 0,44$	4,67 $\pm 1,15$	0,68 (0,497)	$W^{TP(+)}=3,98,$ $p<0,001$ $W^{TP(-)}=2,94, p=0,003$
	$U^{K/TP}(p)$	0,49 (0,625)	0,97 (0,334)	-	0,81 (0,421)	0,23 (0,815)	-	-
ИФН- γ пкг/мл	Конт.	5,07 $\pm 0,46$	4,14 $\pm 0,25$	1,46 (0,145)	4,63 $\pm 0,35$	4,4 $\pm 0,35$	0,46 (0,643)	$W^{K(+)}=0,78, p=0,433$ $W^{K(-)}=0,05, p=0,955$
	ТПБ-2	6,05 $\pm 0,24$	5,38 $\pm 0,3$	1,21 (0,227)	5,8 $\pm 0,35$	6,31 $\pm 0,5$	0,73 (0,465)	$W^{TP(+)}=1,79, p=0,073$ $W^{TP(-)}=1,68, p=0,093$
	$U^{K/TP}(p)$	2,04 (0,041)	2,64 (0,008)	-	1,97 (0,049)	2,17 (0,030)	-	-
VEGF пкг/мл	Конт.	86,34 $\pm 9,97$	79,54 $\pm 9,58$	0,44 (0,662)	136,84 $\pm 15,06$	134,02 $\pm 20,16$	0,58 (0,561)	$W^{K(+)}=2,34, p=0,019$ $W^{K(-)}=2,10, p=0,035$
	ТПБ-2	100,33 $\pm 6,65$	95,3 $\pm 6,39$	0,44 (0,657)	176,64 $\pm 23,81$	146,33 $\pm 18,79$	1,14 (0,255)	$W^{TP(+)}=2,84, p=0,005$ $W^{TP(-)}=1,98, p=0,047$
	$U^{K/TP}(p)$	1,73 (0,084)	1,52 (0,128)	-	1,64 (0,101)	0,87 (0,384)	-	-

Сопоставив динамические изменения сывороточной концентрации ФНО- α с исходом лечения в программах ЭКО мы выявили, что положительный результат данных программ ассоциировался с нормальным уровнем сывороточных значений ФНО- α в день ТВП. А при отрицательном исходе лечения концентрация данного показателя в сыворотке крови в день ТВП была повышенной, значительно превышая соответствующие показатели женщин группы контроля и пациенток 2-ой подгруппы ТПБ с положительным исходом лечения. Выявление при негативном исходе программ ЭКО у женщин 2-ой подгруппы ТПБ повышенных значений провоспалительного ФНО- α в сыворотке крови при отсутствии ожидаемой реакции в виде повышения ЛФ и интерлейкинов может свидетельствовать в пользу истощения иммунологических резервов в условиях «напряженного» иммунитета и наличия вялотекущего субклинического воспаления в органах малого таза.

Проведенный анализ состава ФЖ у пациенток 1-ой подгруппы ТПБ не выявил существенных отличий от группы контроля, и также не отличался в подгруппах с положительным и отрицательным исходом программы ЭКО. Данный факт является свидетельством локализации патологического процесса только на уровне маточных труб и незадействованности овариальной ткани.

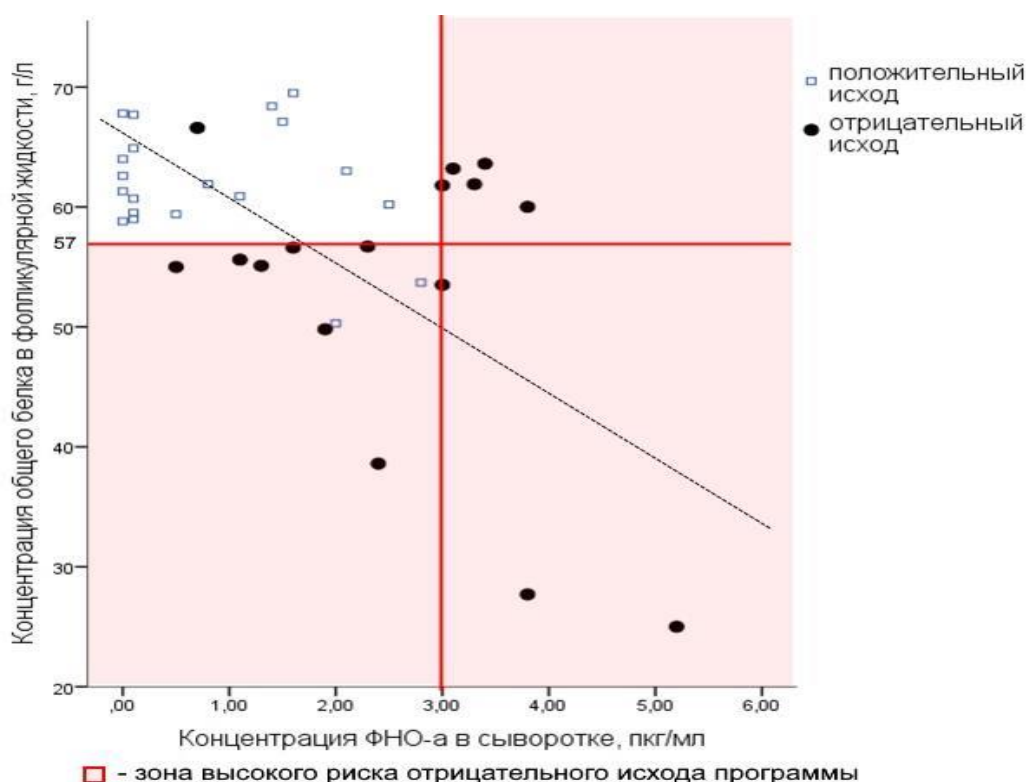
Таблица 5 – Уровень регуляторно-транспортных белков и цитокинов ФЖ у пациенток 2-ой подгруппы ТПБ в зависимости от исхода программы ЭКО

Показатели		Б+	Б-	U(p)
Альбумин г/л	Конт.	41,93 \pm 0,71	41,91 \pm 0,72	0,31(0,758)
	ТПБ-2	41,54 \pm 0,62	37,19 \pm 1,3	2,79(0,005)
	U(p) ^к	0,67(0,500)	2,83(0,005)	-
ОБ г/л	Конт.	61,91 \pm 1,06	61,69 \pm 0,64	0,27(0,784)
	ОТБ	60,57 \pm 1,12	51,47 \pm 2,42	3,59(<0,001)
	U(p) ^к	0,6(0,547)	4,15(<0,001)	-

Достоверно сниженные значения ОБ и АЛБ в ФЖ пациенток с отрицательным исходом программы ЭКО во 2-ой подгруппе ТПБ (табл. 5) указывают на неблагоприятные условия развития ооцитов, что впоследствии

сказывается на качестве и потенциале имплантации эмбрионов и отражают, вероятно, глубокие структурные повреждения овариальной ткани с нарушением микроциркуляции, накоплением продуктов перекисного окисления липидов и резким снижением антиоксидантной активности в условиях низкой концентрации альбумина.

В результате проведенного исследования установлено негативное влияние на исход программ ЭКО у пациенток с ТПБ повышенной концентрации сывороточного ФНО- α и сниженных значений ОБ в ФЖ. Проведение корреляционного и многофакторного регрессионного анализа с расчетом критических значений данных показателей выявило непосредственное влияние на отрицательный исход программы ЭКО во 2-й подгруппе ТПБ повышенного уровня ФНО- α в сыворотке крови более 3 пкг/мл и снижения концентрации ОБ в ФЖ менее 57 г/л (рис.2).



Р и с у н о к 2 – Взаимосвязь значений ФНО- α сыворотки крови и ОБ в ФЖ с отрицательным исходом программы ЭКО у пациенток 2-й подгруппы ТПБ

Из рисунка видно, что концентрация ФНО- α в сыворотке крови и ОБ в составе ФЖ взаимосвязаны между собой ($r_s = -0,529$, $p = 0,002$): с ростом ФНО- α в сыворотке крови одновременно снижается ОБ в ФЖ.

На основе проведенного статистического анализа был разработан следующий алгоритм прогноза отрицательного исхода программы у женщин с ТПБ:

1) определение уровня ФНО- α в сыворотке крови, если он выше, либо равен 3 пкг/мл, то с вероятностью 100% (8/8) у женщины будет отрицательный исход;

2) если уровень ФНО- α в сыворотке крови ниже 3,0 пкг/мл, следует определить уровень ОБ в ФЖ;

3) если уровень ОБ в ФЖ ниже 57 г/л, то с вероятностью 80% (8/10) у женщины беременность не наступит.

Точность работы данного алгоритма – 92% (34/36), чувствительность (способность выявлять отрицательный результат) – 94% (16/17), специфичность (способность выявлять положительный результат) – 90% (18/20).

Особенностями иммунологического профиля инфертильных пациенток с **синдромом поликистозных яичников (СПЯ)**, отличающими их от здоровых женщин, в нашем исследовании были высокие уровни ОБ и АЛБ сыворотки крови. Возможно, это связано с увеличением вязкости крови при СПЯ, на что указывает в своей работе J. Michael (2016). Динамика изучаемых иммунологических параметров в сыворотке крови и состав ФЖ в данной группе зависели от вида триггера овуляции: при использовании стандартного триггера в виде хорионического гонадотропина человека (хГЧ) динамика сывороточных показателей была аналогична группе контроля. Отличительными признаками было повышение концентраций α 2-МГ, α 1-АТ, ОБ, ИФН- γ и снижение уровня ФНО- α (табл.6).

При росте в программе ЭКО от 20 и более фолликулов проводилась замена триггера овуляции на аналог гонадотропин-рилизинг гормона (а-ГнРГ) трипторелин в дозе 0,2 мг и криоконсервация всех полученных эмбрионов с целью профилактики синдрома гиперстимуляции яичников (СГЯ). При этом аналогично группе контроля снижался только уровень АЛБ сыворотки крови, тогда как динамика ИЛ-8 была обратной группе контроля (в сторону увеличения) и отсутствовало повышение концентрации сосудисто-эндотелиального фактора роста VEGF (табл. 7).

Таблица 6 – Уровень регуляторно-транспортных белков и цитокинов в составе сыворотки крови инфертильных пациенток с СПЯ (триггер хГЧ) и группы контроля (мужской фактор) до начала индукции суперовуляции и в день ТВП

Показ.	Контроль			СПЯ - хГЧ			Между группами	
	до	после	W(p)	до	после	W(p)	U(p) ^{до}	U(p) ^{после}
α2-МГ г/л	2,57 ±0,09	2,54 ±0,12	0,04 (0,970)	2,42 ±0,10	3,09 ±0,11	4,36 (<0,001)	1,08 (0,281)	2,02 (0,043)
	2,07-3,04	1,8-3,34		2,00-2,81	1,83-4,06			
α1-АТ г/л	3,08 ±0,13	3,05 ±0,09	0,07 (0,945)	3,03 ±0,12	3,81 ±0,20	3,67 (<0,001)	0,83 (0,409)	2,15 (0,032)
	2,5-3,70	2,30- 3,60		2,4-3,65	2,05-5,4			
	0,76-1,44	0,68- 1,56		0,77-1,42	0,3-1,61			
АЛБ г/л	45,79 ±0,55	42,85 ±0,46	3,56 (<0,001)	49,5 ±0,66	43,62 ±0,79	4,46 (<0,001)	3,33 (0,001)	0,48 (0,631)
	41,5- 50,3	40,2- 45,5		46,7-54,1	39,22-47,6			
ОБ г/л	75,6 ±0,95	76,23 ±0,83	0,47 (0,632)	81,0 ±0,71	84,81 ±0,83	3,63 (<0,001)	2,78 (0,005)	5,78 (<0,001)
	69,8- 82,7	72,8- 81,9		77,0-86,1	77,36-89,5			
ФНО-α пкг/мл	1,15 ±0,06	1,46 ±0,23	0,91 (0,361)	0,97 ±0,06	0,47 ±0,12	3,52 (<0,001)	1,6 (0,103)	3,00 (0,003)
	0,7-1,7	0,3-2,7		0,5-1,70	0-1,51			
ИЛ-8 пкг/мл	6,38 ±0,36	3,87 ±0,6	3,29 (0,001)	5,41 ±0,42	2,88 ±0,5	3,66 (<0,001)	1,14 (0,255)	1,62 (0,105)
	3,5-9,5	1,1-6,7		2,1-9,0	0,13-5,5			
ИФН-γ пкг/мл	4,36 ±0,20	4,5 ±0,25	0,45 (0,648)	4,51 ±0,19	7,3 ±0,18	4,63 (<0,001)	0,19 (0,853)	5,88 (<0,001)
	2,6-5,9	3,2-5,9		3,4-5,3	4,96-8,8			
VEGF пкг/мл	87,48 ±8,05	135,33 ±12,64	3,12 (0,002)	81,4 ±9,16	153,52 ±18,37	2,87 (0,004)	0,81 (0,416)	0,01 (0,993)
	41,0-140,5	43,2 -19,1		29,4- 130,04	47,51- 323,38			

Таблица 7 – Сывороточные значения регуляторно-транспортных белков и цитокинов в подгруппе инфертильных пациенток с СПЯ (триггер а-ГнРГ) и группы контроля (мужской фактор) до начала индукции суперовуляции и в день ТВП

Показатели	Контроль			СПЯ - а-ГнРГ			Между группами	
	до	после	W(p)	до	после	W(p)	U(p) ^{до}	U(p) ^{после}
ЛФ мг/л	1,12 ±0,05	1,09 ±0,07	0,32 (0,749)	1,01 ±0,04	1,69 ±0,15	2,12 (0,034)	0,42 (0,675)	2,14 (0,033)
	0,76-1,44	0,68-1,56		0,64-1,38	0,88-2,34			
АЛБ г/л	45,79 ±0,55	42,85 ±0,46	3,56 (<0,001)	49,66 ±0,48	46,21 ±0,49	3,19 (0,001)	3,33 (0,001)	4,13 (<0,001)
	41,5-50,3	40,2-45,5		45,4-55,7	42,53-49,35			
ОБ г/л	75,6 ±0,95	76,23 ±0,83	0,60 (0,550)	81,0 ±0,84	80,26 ±0,63	0,47 (0,641)	2,78 (0,005)	3,49 (<0,001)
	69,8-82,7	72,8-81,9		77,4-85,9	75,3-84,4			
ИЛ-8 пкг/мл	6,38 ±0,36	3,87 ±0,6	4,09 (<0,001)	5,74 ±0,44	10,19 ±1,81	2,01 (0,047)	1,14 (0,255)	4,27 (<0,001)
	3,5-9,5	1,1-6,7		2,3-8,7	3,68-16,9			
ИФН-γ пкг/мл	4,36 ±0,20	4,5 ±0,25	0,64 (0,525)	4,39 ±0,24	6,98 ±0,46	3,62 (<0,001)	0,19 (0,853)	4,28 (<0,001)
	2,6-5,9	3,2-5,9		3,1-5,8	3,78-8,95			
VEGF пкг/мл	87,48 ±8,05	135,33 ±12,64	2,89 (0,004)	71,6 ±7,23	91,45 ±9,97	0,94 (0,346)	0,81 (0,416)	2,04 (0,045)
	41,0- 140,5	43,2-190,1		45,8- 103,1	20,96- 170,98			

Состав ФЖ пациенток с СПЯ также различался в подгруппах с разным триггером овуляции: при использовании хГЧ отмечалось повышение концентрации ИФН-γ при сниженных значениях АЛБ и ИЛ-8; а при замене триггера на а-Гн-РГ – повышение содержания ОБ и АЛБ (табл. 8).

Многие авторы относят СПЯ к аутоиммунной патологии (Guo R. et al., 2015). Согласно полученных нами данных, у инфертильных пациенток при этой патологии действительно наблюдался дисбаланс белкового и цитокинового профиля, не соответствующий ни классическим воспалительным проявлениям, ни иммунодефицитным состояниям. Результаты проведенного исследования не подтверждают мнения ряда авторов, утверждающих, что развитие СПЯ

сопряжено с признаками хронического воспаления низкой степени выраженности (Pawelczak M., Rosenthal J., 2014; Haoula Z., 2014; Mortada R., 2015; Zheng Peng, Yifan Sun, 2016).

Таблица 8 – Регуляторно-транспортные белки и цитокины в ФЖ в день ТВП инфертильных пациенток с СПЯ (подгруппы с хГЧ-триггером и а-ГнРГ-триггером) и группы контроля

Показатели		Концентрация в группах (M±m) и диапазон (Dz)			Сравнение между группами U(p)		
		Контроль	хГЧ	а-ГнРГ	хГЧ- контроль	а-ГнРГ – контроль	хГЧ- а-ГнРГ
АЛБ г/л	M±m	41,92±0,5	38,54±0,91	44,34±0,52	3,17	2,91	4,77
	Dz	39,1-44,85	31,76-43,8	41,6-47,6	(0,002)	(0,004)	(<0,001)
ОБ г/л	M±m	61,78±0,57	63,03±0,71	70,84±0,63	1,47	5,97	5,26
	Dz	58,40-65,74	60,24-67,37	67,2-75,2	(0,141)	(<0,001)	(<0,001)
ИЛ-8 пкг/мл	M±m	250,7±12,7	164,58±16,84	235,45±21,05	3,68	0,64	2,35
	Dz	169,24-334,46	85,25-297,67	104,35-394,1	(<0,001)	(0,522)	(0,019)
ИФН-γ пкг/мл	M±m	4,92±0,35	6,98±0,24	4,48±0,23	4,02	1,3	5,25
	Dz	3,00-7,38	5,7-8,2	3,4-5,75	(<0,001)	(0,193)	(<0,001)

Перенос нативных эмбрионов в лечебном цикле у пациенток с СПЯ осуществлялся только в подгруппе пациенток с ростом до 20 фолликулов и применением хГЧ – триггера. Оказалось, что несмотря на довольно-таки значимые отличия иммунного спектра по изучаемым показателям в сыворотке крови (повышение α2-МГ, α1-АТ, ИФН-γ, ОБ, а также снижение концентрации ФНО-α) в процессе проведения процедуры ЭКО, они не оказывают отрицательного влияния на исход программы, а частота имплантации не ниже, а наоборот, несколько превышает данный показатель в контрольной группе - 44% (20/46). Данный феномен можно объяснить тем, что при СПЯ исходный статус инфертильных пациенток характеризуется повышенными значениями ОБ и АЛБ, что отражает хороший их энергетический и антиоксидантный потенциал, а перечисленные изменения иммунного профиля в процессе индукции суперовуляции и введении хГЧ-триггера являются компенсаторными.

Что касается локального интраовариального статуса, исследованного посредством изучения состава ФЖ у пациенток с СПЯ с применением хГЧ-триггера, то здесь также, как в сыворотке крови, отмечено повышение уровня ИФН- γ , не оказывающее влияния на исход программы ЭКО. Однако, наряду с повышенными значениями ИФН- γ , в ряде случаев отмечались также значительно сниженные уровни АЛБ и ИЛ-8, ассоциированные с отрицательным завершением программы (табл. 9). Что касается дефицита АЛБ в ФЖ, то здесь повторяется ситуация, имевшая место при анализе факторов отсутствия имплантации у женщин с трубно-перитонеальным бесплодием. Это наводит на мысль о возможной общности патогенетических механизмов, препятствующих имплантации при бесплодии «яичникового» генеза (при СПЯ и хроническом аднексите). Недостаток же ИЛ-8 в ФЖ отражает, вероятно, неполноценность молекулярных механизмов, ответственных за созревание ооцита с последующей его активацией и, как следствие, формирование эмбриона с низким потенциалом имплантации.

Таблица 9 – Регуляторно-транспортные белки и цитокины в ФЖ инфертильных женщин группы СПЯ (хГЧ триггер) и группы контроля в зависимости от исхода программы ЭКО

Показатели		Фолликулярная жидкость		
		Б+	Б-	U(p)
Альбумин г/л	Контроль	41,93±0,71	41,91±0,72	0,31(0,758)
	СПЯ(хГЧ)	40,96±0,95	36,3±1,28	2,69(0,007)
	U(p) ^к	1,14(0,253)	3,08(0,002)	-
ИЛ-8 пкг/мл	Контроль	248,53±18,29	252,41±18,14	0,16(0,87)
	СПЯ(хГЧ)	203,83±24,85	125,33±16,99	2,45(0,014)
	U(p) ^к	1,42(0,157)	3,65(<0,001)	-
ИФН- γ пкг/мл	Контроль	4,76±0,59	5,05±0,44	0,08(0,935)
	СПЯ(хГЧ)	7,13±0,43	6,83±0,22	0,75(0,452)
	U(p) ^к	2,84(0,005)	2,57(0,01)	-

После определения предикторов отрицательного исхода программ ЭКО в составе ФЖ пациенток с эндокринным бесплодием на фоне СПЯ были рассчитаны критические значения данных показателей с учетом их взаимосвязи и характера совместного влияния на результат данной программы. Значения этих показателей, ассоциированных с отрицательным исходом программы ЭКО, составили для АЛБ 38 г/л и ниже и для ИЛ-8 - 130 пкг/мл и ниже (рис. 3.).

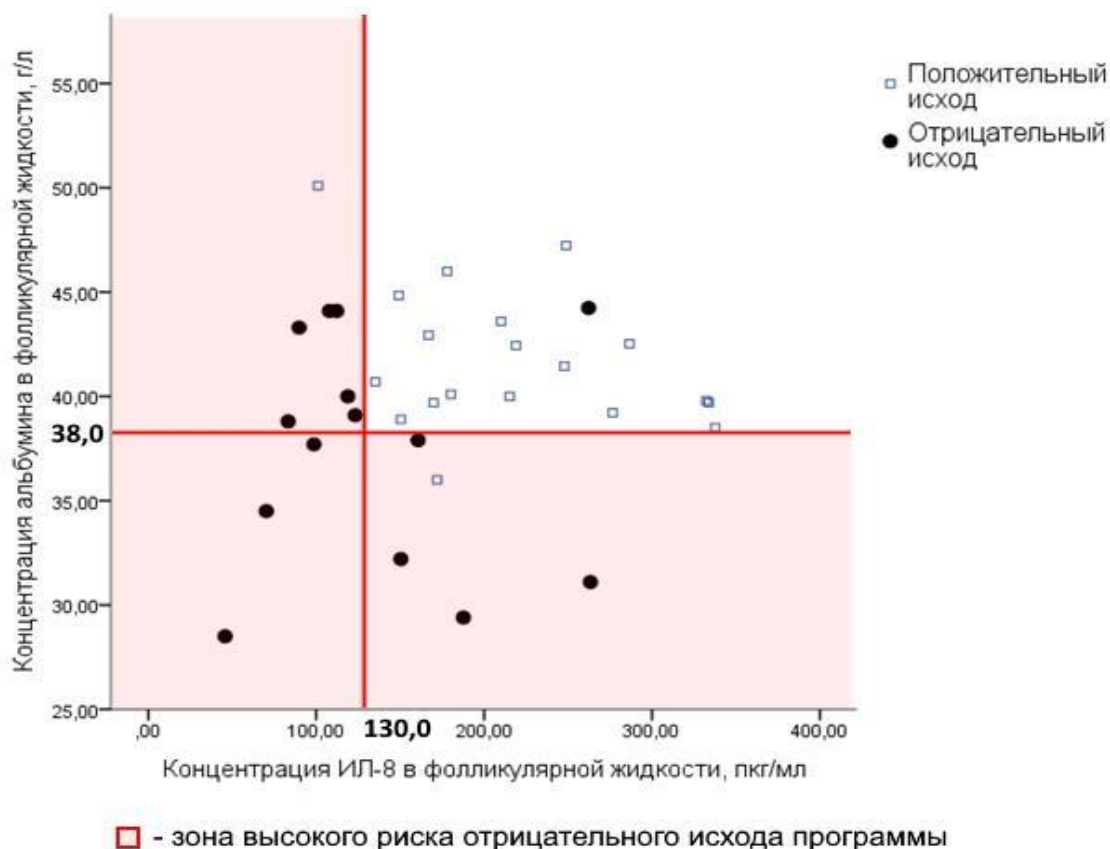


Рисунок 3 – Взаимосвязь уровня ИЛ-8 и АЛБ в ФЖ с отрицательным исходом программы ЭКО у пациенток с СПЯ

На основе проведенного анализа был разработан следующий алгоритм прогноза отрицательного исхода программы у женщин с СПЯ:

1) определить уровень ИЛ-8 в ФЖ, если он существенно ниже нормативных значений (169,2-344,5 пкг/мл), а именно ниже, либо равен 130 пкг/мл, то с вероятностью 90% исход программы будет отрицательный;

2) если уровень ИЛ-8 в ФЖ соответствует нормативам, то необходимо определить уровень АЛБ в ФЖ;

3) если АЛБ соответствует нормативам (39,1–44,8 г/л), то вероятность положительного исхода 94% (отрицательного 6%).

4) если АЛБ ниже либо равен 38 г/л, то с вероятностью 80% можно прогнозировать отрицательный исход.

Точность работы алгоритма – 91% (30/33), чувствительность (способность выявлять отрицательный результат) – 93% (13/14), специфичность (способность выявлять положительный результат) – 90% (17/19).

Кроме эффективности программ ЭКО репродуктологов всего мира продолжает беспокоить вопрос безопасности данного метода: несмотря на существующие методы профилактики такого грозного ятрогенного осложнения ЭКО как синдром гиперстимуляции яичников (СГЯ), он продолжает встречаться с частотой от 0,02% - 5% лечебных циклов (D'Angelo A., 2017), составив 0,5% на число начатых циклов в РФ в 2017 г. (Регистр ВРТ РАРЧ, 2017 г.). В настоящее время СГЯ рассматривают с позиций системной воспалительной реакции (systemic inflammatory response syndrome), пусковым фактором которой является введение овуляторной дозы хГЧ. Летальность при СГЯ, колеблется от 1/45000 до 1/500000 (Le Gouez A., 2011), что актуализирует поиск маркеров этого состояния, имеющих предикторное значение.

Наше исследование продемонстрировало предикторную роль повышения α 1-АТ (выше 4,6 г/л), ассоциированного с беременностью α 2-гликопротеина (выше 0,02 г/л) и сосудисто-эндотелиального фактора роста VEGF (выше 220 пкг/мл) в сыворотке крови в день ТВП, а также повышенных уровней ИФН- γ (выше 8,5 пкг/мл) в ФЖ при достоверно сниженных значениях АЛБ, ФНО- α и ИЛ-8 в обеих биологических жидкостях при СПЯ в отношении развития «поздней» формы СГЯ у 11 забеременевших в программе ЭКО пациенток (табл.10). По сути, выявленные изменения можно интерпретировать как проявление синдрома системного воспалительного ответа (ССВО) на фоне массивного повреждения сосудистого эндотелия в результате введения овуляторной дозы ХГЧ, то есть доклинические проявления СГЯ. При резком повышении уровней ИФН- γ внутри растущего фолликула и α -1 АТ, АБГ и VEGF в сыворотке крови в ответ на введение овуляторной дозы ХГЧ резко повышается проницаемость стенок сосудов с транссудацией жидкой части крови в «третье» пространство со снижением уровней АЛБ, ФНО, ИЛ-8 в сыворотке крови и ФЖ с исходом в гиповолемию, гемоконцентрацию и

гиперкоагуляцию. В дальнейшем при имплантации эмбриона и повторном повышении уровня ХГЧ эти процессы прогрессируют, приводя к развитию клинических форм СГЯ разной степени выраженности.

Таблица 10 – Концентрации регуляторно-транспортных белков, цитокинов сыворотке крови и ФЖ, а также стероидных гормонов в сыворотке крови в день ТВП забеременевших в программе ЭКО женщин с СПЯ в зависимости от наличия и отсутствия «поздней» формы СГЯ

Сыворотка крови	СГЯ		Без СГЯ		Сравнение групп U(p)
	Средние значения	Диапазон	Средние значения	Диапазон	
a1-AT	4,94±0,30	2,12-9,67	2,56±0,10	1,2-4,1	4,08 (p<0,001)
АБГ	0,019±0,003	0,011-0,047	0,008±0,001	0,002-0,014	2,64 (p=0,008)
ФНО-α	0,75±0,151	0,00-2,37	1,63±0,151	0,38-3,62	3,97 (p<0,001)
АЛБ	41,07±0,394	36,64-45,62	45,53±0,351	40,32-49,90	5,03 (p<0,001)
ИЛ-8	2,01±0,320	0,00-5,94	3,52±0,360	0,02-7,41	2,21 (p=0,027)
VEGF	244,7±12,8	181,7-315,9	127,2±7,94	70,9-186,7	5,21 (p<0,001)
Фолликулярная жидкость		Диапазон		Диапазон	
ИФН-γ	7,92±0,345	2,96-13,75	5,36±0,222	2,17-8,57	4,88 (p<0,001)
ФНО-α	0,85±0,130	0,00-1,64	1,97±0,290	0,39-3,88	4,06 (p<0,001)
АЛБ	40,60±0,810	35,42-43,83	42,33±0,334	36,85-46,43	2,16 (p =0,031)
ИЛ-8	117,80±6,601	88,8-158,23	245,73±9,630	109,8-374,2	5,00 (p<0,001)
ГОРМОНЫ		Диапазон		Диапазон	
Эстрадиол, пмоль/л	8107,63±124,15	4468-11545	7892,37±264,35	4018-11467	0,69 (p=0,502)
Прогестерон, нг/мл	0,71±0,118	0,20-1,58	0,97±0,247	0,21-1,73	0,86 (p=0,399)

Иммунологическими и биохимическими маркерами **наружного генитального эндометриоза** 1–2 ст. в нашем исследовании были повышенные сывороточные уровни $\alpha 2$ -МГ, $\alpha 1$ -АТ, ИФН- γ , ОБ, АЛБ и сниженные значения ИЛ-6 (табл.11). Это подтверждает мнение некоторых авторов о наличии реакции острофазовых белков при НГЭ (Drews K., Skrzypczak J., 1995) в ответ на повышение протеиназной активности патологических очагов, которая снижается после хирургического удаления эндометриоидных гетеротопий. Частота наступления беременности в данной группе составила 37,5% (12/32) и не отличалась от таковой в группе контроля. Среди особенностей динамики исследованных иммунологических показателей в процессе индукции суперовуляции в данной группе пациенток стоит выделить АЛБ сыворотки крови, сохраняющийся повышенный уровень которого ко дню ТВП являлся предиктором отрицательного исхода программы ЭКО у пациенток с НГЭ 1–2 ст. Повышенные по сравнению с группой контроля сывороточные значения АЛБ при НГЭ 1–2 ст. и отсутствие динамического снижения его концентрации ко дню трансвагинальной пункции фолликулов, характерного для группы контроля, может быть отражением патологического накопления его в сосудистом русле ввиду нарушения утилизации печенью. Нарушение транспортной функции АЛБ может быть результатом блокады его связывающих центров токсичными лигандами и уменьшением его резервной связывающей способности и как результат – нарушение его детоксикационной и антиоксидантной функций, ведущие к усугублению эндотоксикоза, а также накоплению свободных радикалов с их повреждающим действием как общим, так и локальным, на уровне растущего фолликула с комплексом кумулюс-ооцит (Грызунов Ю.А., Федоровский Н.М., 2004 г.). Кроме того, одной из возможных причин «блокады» функций сывороточного АЛБ могут быть изменения структуры его молекулы в результате нестабильности конформации, вызванной воздействием токсичных лигандов, влекущие за собой утрату основных его функций (Сахаров В.Н., Литвицкий П.Ф., 2016). Это наводит на мысль о том, что НГЭ 1-2 ст. можно рассматривать с точки зрения «конформационных» болезней, в патогенезе которых ключевым звеном является нарушение третичной структуры белков, их агрегация, в результате чего белки становятся недоступными для протеаз.

Таблица 11 – Содержание регуляторно-транспортных белков и цитокинов в сыворотке крови инфертильных пациенток с НГЭ 1-2 ст. и группы контроля в зависимости от исхода программы ЭКО

Показатели	Группа	До стимуляции			В день ТВП			Анализ динамики
		Б +	Б –	U(p)	Б +	Б –	U(p)	
$\alpha 2$ -МГ г/л	Контроль n - 37	2,52 $\pm 0,15$	2,61 $\pm 0,11$	1,00 (0,32)	2,43 $\pm 0,19$	2,64 $\pm 0,15$	0,99 (0,323)	$W^{K(+)}=0,314, p=0,754$ $W^{K(-)}=0,409, p=0,683$
	НГЭ n - 32	3,14 $\pm 0,16$	3,18 $\pm 0,16$	0,27 (0,788)	3,23 $\pm 0,27$	3,1 $\pm 0,16$	0,29 (0,773)	$W^{TP(+)}=0,314, p=0,754$ $W^{TP(-)}=0,189, p=0,850$
	$U^{K/TP}$ (p)	2,67 (0,008)	2,35 (0,019)	-	2,15 (0,032)	1,98 (0,048)	-	-
$\alpha 1$ -АТ г/л	Контроль	3,18 $\pm 0,15$	2,98 $\pm 0,11$	0,85 (0,395)	2,95 $\pm 0,18$	3,13 $\pm 0,09$	0,44 (0,659)	$W^{K(+)}=1,125, p=0,26$ $W^{K(-)}=1,139, p=0,255$
	НГЭ	3,77 $\pm 0,17$	3,85 $\pm 0,18$	0,33 (0,744)	4,02 $\pm 0,29$	3,92 $\pm 0,2$	0,3 (0,764)	$W^{TP(+)}=0,664, p=0,507$ $W^{TP(-)}=0,414, p=0,679$
	$U^{K/TP}$ (p)	2,23 (0,026)	3,06 (0,002)	-	2,37 (0,018)	3,12 (0,002)	-	-
Альбу- мин г/л	Контроль	45,98 $\pm 0,62$	45,83 $\pm 0,77$	0,54 (0,589)	43,57 $\pm 0,45$	42,23 $\pm 0,76$	1,31 (0,19)	$W^{K(+)}=2,072, p=0,038$ $W^{K(-)}=2,767, p=0,006$
	НГЭ	48,69 $\pm 0,99$	48,11 $\pm 0,78$	0,4 (0,687)	43,24 $\pm 0,69$	46,18 $\pm 0,85$	2,18 (0,029)	$W^{TP(+)}=2,934, p=0,003$ $W^{TP(-)}=1,154, p=0,248$
	$U^{K/TP}$ (p)	1,99 (0,047)	1,99 (0,047)	-	0,79 (0,427)	2,78 (0,005)	-	-
ОБ г/л	Контроль	74,61 $\pm 2,57$	75,1 $\pm 1,37$	0,29 (0,771)	77,06 $\pm 0,89$	75,51 $\pm 1,34$	0,58 (0,565)	$W^{K(+)}=0,314, p=0,753$ $W^{K(-)}=0,369, p=0,712$
	НГЭ	80,44 $\pm 1,54$	83,07 $\pm 1,44$	1,59 (0,111)	82,46 $\pm 1,56$	83,06 $\pm 1,51$	0,22 (0,829)	$W^{TP(+)}=1,172, p=0,241$ $W^{TP(-)}=0,152, p=0,879$
	$U^{K/TP}$ (p)	2,09 (0,037)	3,28 (0,001)	-	2,88 (0,004)	3,22 (0,001)	-	-
ИЛ-6 пкг/мл	Контроль	1,35 $\pm 0,1$	1,39 $\pm 0,08$	0,21 (0,834)	1,22 $\pm 0,22$	1,84 $\pm 0,3$	1,67 (0,095)	$W^{K(+)}=0,267, p=0,789$ $W^{K(-)}=1,084, p=0,278$
	НГЭ	0,91 $\pm 0,14$	0,92 $\pm 0,19$	0,65 (0,517)	0,54 $\pm 0,15$	0,81 $\pm 0,17$	1,2 (0,229)	$W^{TP(+)}=1,54, p=0,123$ $W^{TP(-)}=0,035, p=0,972$
	$U^{K/TP}$ (p)	2,08 (0,037)	2,79 (0,005)	-	2,14 (0,032)	2,22 (0,027)	-	-

Продолжение таблицы 11								
ИЛ-8 пкг/мл	Контроль	6,36 ±0,43	7,03 ±0,56	0,77 (0,442)	3,74 ±0,57	3,97 ±0,99	0,49 (0,625)	W^{K(+)}=2,667, p=0,008 W^{K(-)}=2,102, p=0,036
	НГЭ	7,45 ±0,56	7,66 ±0,48	0,21 (0,833)	3,05 ±0,38	3,66 ±0,46	0,72 (0,47)	W^{ГР(+)}=2,803, p=0,005 W^{ГР(-)}=3,68, p=<0,001
	U ^{K/ГР} (p)	1,36 (0,174)	0,63 (0,529)	-	0,83 (0,409)	0,6 (0,551)	-	-
ИФН-γ пкг/мл	Контроль	5,07 ±0,46	4,14 ±0,25	1,46 (0,145)	4,63 ±0,35	4,4 ±0,35	0,46 (0,643)	W ^{K(+)} =0,785, p=0,433 W ^{K(-)} =0,057, p=0,955
	НГЭ	6,38 ±0,34	6,3 ±0,36	0,45 (0,656)	6,45 ±0,35	6,35 ±0,41	0,38 (0,701)	W ^{ГР(+)} =0,296, p=0,767 W ^{ГР(-)} =0,632, p=0,528
	U ^{K/ГР} (p)	2,21 (0,027)	3,84 (0,001)	-	2,94 (0,003)	3,19 (0,001)	-	-
VEGF пкг/мл	Контроль	86,34 ±9,97	79,54 ±9,58	0,44 (0,662)	136,84 ±15,06	134,02 ±20,16	0,58 (0,561)	W^{K(+)}=2,341, p=0,019 W^{K(-)}=2,103, p=0,035
	НГЭ	78,21 ±13,71	92,02 ±9,00	0,85 (0,394)	128,39 ±10,45	122,95 ±9,6	0,52 (0,604)	W^{ГР(+)}=2,201, p=0,028 W^{ГР(-)}=1,988, p=0,047
	U ^{K/ГР} (p)	0,13 (0,898)	1,09 (0,275)	-	0,78 (0,438)	0,02 (0,987)	-	-

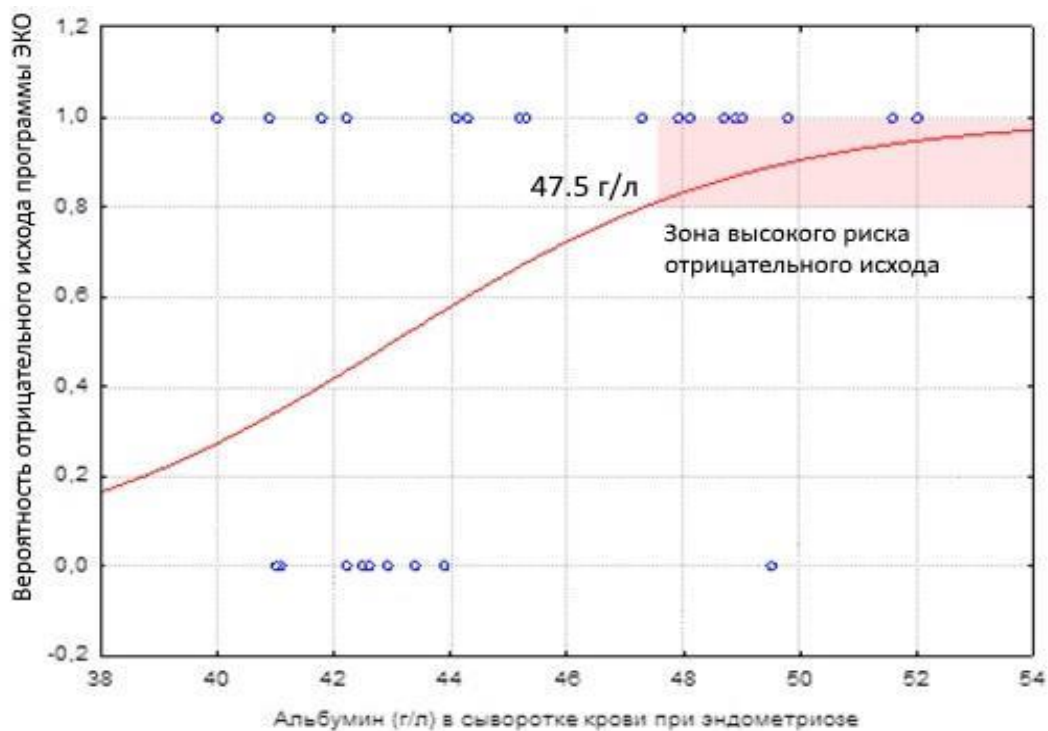


Рисунок 4 – Ассоциация уровня АЛБ в сыворотке женщин с НГЭ 1-2 ст. и исхода программы ЭКО

Расчет критического значения уровня сывороточного АЛБ с помощью логит-регрессии продемонстрировал риск отрицательного исхода программы ЭКО при его значении в день ТВП выше 47,5 г/л (с чувствительностью 80%) – рис. 4.

Особенностями локального иммунологического профиля у инфертильных пациенток с НГЭ 1-2 ст. было повышение концентрации ОБ и ИФН- γ , а также снижение уровня ЛФ и ИЛ-8 в составе ФЖ, однако выявленные изменения не оказывали влияния на исход программы ЭКО (табл. 12).

Таблица 12 – Содержание регуляторно-транспортных белков и цитокинов в составе ФЖ инфертильных пациенток с НГЭ 1-2 ст. и группы контроля в зависимости от результата программы ЭКО

Показатели в ФЖ в день ТВП		Б +	Б -	U(p)
ЛФ мг/л	Конт.	0,19±0,02	0,18±0,03	0,93(0,351)
	НГЭ	0,14±0,02	0,12±0,01	0,6(0,548)
	U(p) ^к	2,11(0,035)	2,08(0,038)	
ОБ г/л	Конт.	61,91±1,06	61,69±0,64	0,27(0,784)
	НГЭ	66,36±1,7	66,69±0,92	0,11(0,916)
	U(p) ^к	2,04(0,047)	3,7(<0,001)	
ИЛ-8 пкг/мл	Конт.	248,53±18,29	252,41±18,14	0,16(0,87)
	НГЭ	188,89±24,46	189,84±12,21	0,34(0,732)
	U(p) ^к	1,96(0,050)	2,54(0,011)	
ИФН- γ пкг/мл	Конт.	4,76±0,59	5,05±0,44	0,08(0,935)
	НГЭ	6,48±0,26	6,14±0,36	1,35(0,178)
	U(p) ^к	2,89(0,004)	2,39(0,017)	

Составление прогностического алгоритма риска отрицательного исхода программы экстракорпорального оплодотворения у инфертильных пациенток при бесплодии различного генеза с использованием клинических, иммунологических и биохимических предикторов

Известно, что абсолютно достоверных методов прогнозирования положительного или отрицательного исхода программы ЭКО не существует. Однако выявленные нами сходные изменения в уровнях иммунорегуляторных белков и цитокинов сыворотки крови и ФЖ при отрицательном исходе программ ЭКО побудило нас к созданию **математической модели** риска

неудачного ее завершения с целью формирования дополнительных показаний для криоконсервации эмбрионов и отсроченного эмбриотрансфера после нивелирования иммунологического дисбаланса, вызванного индукцией суперовуляции. При построении данной модели учитывались также и клинические факторы риска неудачного завершения программы ЭКО, рассчитанные нами на основании анализа 3969 циклов.

Итоговое уравнение модели прогноза отрицательного исхода программы выглядит следующим образом:

$$p = 1 / (1 + \exp(-(-1,31 + 0,34 * x_1 + 0,24 * x_2 + 0,31 * x_3 + 0,49 * x_4 + 0,9 * x_5 * x_6 + 0,99 * x_7 * x_8 + 1,08 * x_8 * x_9 + 0,86 * x_{10} * x_{11} + 0,67 * x_{11} * x_{12}))) * 100$$

где p – Вероятность отрицательного исхода программы

x_1 – Возраст женщины 31-35 лет ($x_1=1$, если возраст 31-35 лет; $x_1=0$, если возраст до 30 лет включительно)

x_2 – Повторная попытка ЭКО ($x_2=1$ если процедура ЭКО проводится повторно после предшествующей неудачи; $x_2=0$, если ЭКО проводится в первый раз)

x_3 – Потери беременности в анамнезе ($x_3=1$, если у женщин были в анамнезе неразвивающиеся беременности, выкидыши; $x_3=0$, если не было ничего из перечисленного).

x_4 – Наличие миомы ($x_4=1$, если у женщины есть миома; $x_4=0$, при отсутствии миомы)

x_5 – Концентрация сывороточного альбумина в день ТВП ниже 47,5 г/л ($x_5=1$, если концентрация выше либо равна 47,5 г/л; $x_5=0$, если ниже 47,5)

x_6 – Диагноз «НГЭ» ($x_6=1$, если причина бесплодия НГЭ; $x_6=0$, отсутствие НГЭ)

x_7 – Концентрация сывороточного ФНО- α в день ТВП выше 3,0 пкг/мл ($x_7=1$, если концентрация выше, либо равна 3,0 пкг/мл; $x_7=0$, ниже 3,0 пкг/мл)

x_8 – Причина бесплодия ТПФ подгруппа 2 (с повышением ФНО- α и $\alpha 1$ -АТ) ($x_8=1$, если причина бесплодия ТПФ, подгруппа 2; $x_8=0$, ТПБ подгруппа 1)

x_9 – Концентрация общего белка в ФЖ ниже 57 г/л ($x_9=1$, если концентрация ниже, либо равна 57,0 г/л; $x_9=0$, выше 57 г/л)

x_{10} – Концентрация альбумина в ФЖ ниже 38 г/л ($x_{10}=1$, если концентрация ниже, либо равна 38,0 г/л; $x_{10}=0$, выше 38,0 г/л)

x_{11} – Причина бесплодия СПЯ ($x_{11}=1$, если причина бесплодия СПЯ; $x_{11}=0$ при отсутствии СПЯ)

x_{12} – Концентрация ИЛ-8 в ФЖ ниже 130 пкг/мл ($x_{12}=1$, если концентрация ниже, либо равна 130 пкг/мл; $x_{12}=0$, если выше 130 пкг/мл)

Качество модели оценивалось с помощью ROC-кривой, оценка проводилась на обучающем и тестовом множестве (рисунок 5).

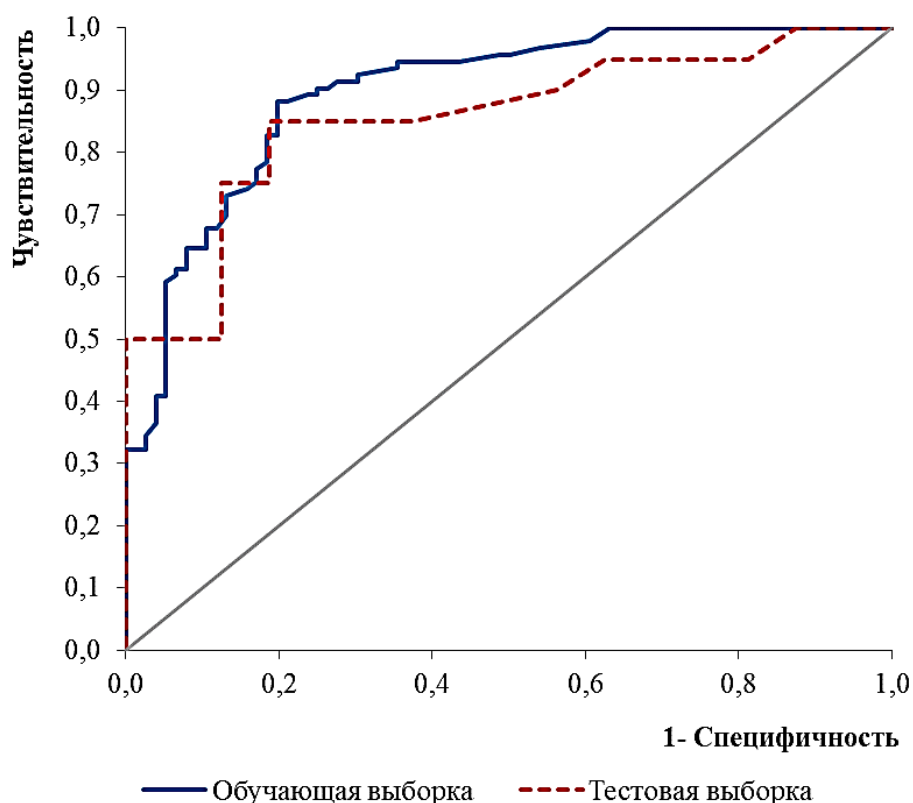


Рисунок 5 – ROC-кривые для обучающего и тестового множества модели прогноза отрицательного результата программы ЭКО

Точка отсечения определялась на основе J-статистики Юдена и в нашем случае равна 50%. Если рассчитанное по уравнению 1 значение больше либо равно 50%, то прогнозируется отрицательный результат программы ЭКО, если ниже – прогноз положительный.

Точность модели (общая доля верно выявленных случаев) составляет 85 [76–94]% (35/41). Чувствительность модели – способность модели прогнозировать отрицательный результат программы составляет 85 [72–97]% (17/20). Специфичность модели – способность прогнозировать положительный исход программы составляет 86 [74–97]% (18/21).

Таким образом, анализ клинических и лабораторных данных при использовании математической модели логит-регрессии позволил сформировать совокупность предикторов риска отрицательного исхода программы ЭКО с высоким уровнем конкордации. Это легло в основу разработки компьютерной программы расчета риска отрицательного исхода программы ЭКО.

Сравнительная частота наступления беременности в лечебном цикле при переносе нативных эмбрионов и в криоциклах

После выявления иммунологических и биохимических предикторов отрицательного исхода программ ЭКО среди пациенток с различными формами бесплодия проведена оценка ЧНБ в группах риска при переносе нативных эмбрионов в лечебном цикле и у пациенток с неудавшейся имплантацией – в последующем криоцикле (табл. 13). При ТПБ с повышением уровня ФНО- $\alpha \geq 3,0$ пкг/мл в лечебном цикле из 8 пациенток беременность не наступила ни у одной из них (0%), тогда как при последующем переносе размороженных эмбрионов 2 забеременели (25%). У 10 других пациенток этой же группы, при уровне ФНО < 3,0 пкг/мл, но сниженной концентрацией ОБ в сыворотке крови < 57 г/л, частота имплантации в «свежем» цикле составила 20% (2/10), а в криоцикле 50% (4/8). Таким образом, при ТПБ в группе риска отрицательного исхода программы ЭКО с переносом нативных эмбрионов ЧНБ составила 11% (2/18), а в криоцикле была гораздо выше – 37,5% (6/16). Группу риска неудачного исхода программы ЭКО при эндокринном бесплодии на фоне СПЯ составили 15 пациенток. Среди них у 10 женщин со сниженным уровнем ИЛ-8 в ФЖ ≤ 130 пкг/мл в лечебном цикле забеременела 1 пациентка (10%), и из 5 пациенток с уровнем ИЛ-8 в ФЖ > 130 пкг/мл, но снижением концентрации АЛБ в ФЖ < 38 г/л, беременность наступила также только у одной (20%).

Таким образом, ЧНБ в группе риска отрицательного исхода программы ЭКО при СПЯ составила 13% (2/15), а в криоцикле – 46% (6/13). В группе риска неудачного завершения программы ЭКО при НГЭ 1–2 ст. были 9 пациенток, из которых в лечебном цикле беременность наступила только у одной (11%), а после криопереноса из 8-ми женщин забеременели 3 (37,5%).

Т а б л и ц а 13 – Частота наступления беременности в группах риска отрицательного исхода программ ЭКО при различных формах бесплодия при переносе нативных и размороженных эмбрионов

Причина бесплодия	Группы риска	Положительных исходов, % (n/N)	
		В лечебном цикле (нативные эмбрионы)	При криопереносе
ТПБ	Уровень ФНО-α в сыворотке ≥ 3,0 пкг/мл.	0% (0/8)	25% (2/8)
	Уровень ФНО-α < 3,0 пкг/мл, уровень ОБ в сыворотке < 57 г/л	20% (2/10)	50% (4/8)
	Всего в группе риска	11% (2/18)	37,5 % (6/16)
СПЯ (хГЧ-триггер)	Уровень ИЛ-8 в ФЖ ≤ 130 пкг/мл	10% (1/10)	44,4% 4/9
	Уровень ИЛ-8 в ФЖ > 130 пкг/мл, уровень АЛБ в ФЖ < 38 г/л	20% (1/5)	50% (2/4)
	Всего в группе риска	13% (2/15)	46% (6/13)
НГЭ 1-2 ст.	Уровень АЛБ в сыворотке ≥ 47,5 г/л	11% (1/9)	37,5% (3/8)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данные проведенного исследования доказывают активное участие регуляторно-транспортных белков и цитокинов в патогенезе имплантации человеческого эмбриона, а также возможность их использования в качестве инструмента для выявления групп риска неудачных исходов программ ЭКО в стимулированных циклах с переносом в полость матки нативных эмбрионов. Более высокая частота наступления беременности в группах риска после переноса размороженных эмбрионов спустя 2–3 месяца после проведенной

индукции суперовуляции позволяет рекомендовать криоконсервацию и отсроченный эмбриотрансфер с целью повышения эффективности данных программ. Резюмируя полученные данные мы пришли к следующим выводам:

ВЫВОДЫ

1. Иммунологические параметры здоровых фертильных небеременных женщин в возрасте до 35 лет с сохранным овариальным резервом и пациенток с первичным и вторичным бесплодием мужского генеза сопоставимы. Динамика изученных показателей в процессе индукции суперовуляции с введением хорионического гонадотропина в качестве триггера финального созревания ооцитов у пациенток с мужским фактором бесплодия выражается в снижении сывороточных значений АЛБ, ИЛ-8 и повышении концентрации VEGF. Выявленные изменения не влияют на результат лечения, что позволяет расценивать их как нормальную иммунную реакцию в программе ЭКО, а полученные значения иммунологических показателей использовать в качестве референсных.

2. Иммунологический состав фолликулярной жидкости здоровых женщин (с бесплодием мужского генеза) не отличается в подгруппах с положительным и отрицательным результатом программ ЭКО, что позволяет использовать диапазон полученных иммунологических значений в программах ЭКО в качестве референсных.

3. Иммунологический профиль и эффективность программ ЭКО у пациенток с трубно-перитонеальным бесплодием зависит от выраженности и сохраняющейся субклинической активности перенесённого воспаления, проявлением чего являются повышенные сывороточные значения ФНО- α и α 1-АТ. При минимальном поражении маточных труб и отсутствии лабораторных признаков воспаления (подгруппа 1) динамика иммунологических показателей и частота наступления беременности (38,3%) аналогична группе контроля (38,0%). При наличии лабораторных признаков субклинического воспаления (подгруппа 2) частота наступления беременности значительно ниже (24,4%), чем в группе контроля (38%), а отрицательный

исход программ ЭКО ассоциируется с повышением концентрации ФНО- α в сыворотке крови ≥ 3 пкг/мл (с чувствительностью 100%) и снижением уровня ОБ в фолликулярной жидкости ≤ 57 г/л (с чувствительностью 80%).

4. У пациенток с СПЯ выявлены более высокие сывороточные концентрации ОБ и АЛБ, а динамика иммунологических параметров в сыворотке крови и состав фолликулярной жидкости зависит от вида используемого триггера. При применении традиционного хорионического гонадотропина человека, в отличие от группы контроля, отмечается повышение сывороточных значений $\alpha 2$ -МГ, $\alpha 1$ -АТ, ИФН- γ , ОБ, снижение сывороточного уровня ФНО- α , а также снижение концентрации АЛБ, ИЛ-8 и повышение содержания ИФН- γ в фолликулярной жидкости. При использовании а-ГН-РГ в качестве триггера отмечается повышение концентрации ИЛ-8, ЛФ, ИФН- γ в сыворотке крови, а также АЛБ и ОБ в фолликулярной жидкости.

5. Предикторная роль в отрицательном исходе программы ЭКО при СПЯ принадлежит сниженным уровням ИЛ-8 ≤ 130 пкг/мл (с чувствительностью 90%) и АЛБ ≤ 38 г/л (с чувствительностью 80%) в фолликулярной жидкости. Прогностическими критериями «поздней» формы синдрома гиперстимуляции яичников у пациенток с СПЯ являются повышенные значения $\alpha 1$ -АТ (от 4,6 г/л и выше), АБГ (от 0,020 г/л и выше) и VEGF (от 220 пкг/мл и выше) в сыворотке крови и ИФН- γ (от 8,5 пкг/мл и выше) в фолликулярной жидкости при достоверном снижении уровней АЛБ, ФНО- α , ИЛ-8 в сыворотке крови и фолликулярной жидкости.

6. Отличительной особенностью иммунологического профиля инфертильных женщин с НГЭ 1-2 ст. является повышение значений $\alpha 2$ -МГ, $\alpha 1$ -АТ, ИФН- γ , АЛБ, ОБ и снижение концентрации ИЛ-6 в сыворотке крови, а также снижение уровня ЛФ, ИЛ-8 и повышение содержания ОБ и ИФН- γ в фолликулярной жидкости. Сохраняющийся повышенный уровень сывороточного АЛБ выше 47,5 г/л в день ТВП обуславливают собой неудачу имплантации (с чувствительностью 80%).

7. Алгоритм прогноза отрицательного исхода программ ЭКО, основанный на определении клинико-иммунологического профиля пациентки, позволяет выработать тактику ведения относительно продолжения лечебного цикла или криоконсервации всех полученных эмбрионов с целью отсроченного их переноса.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. У инфертильных пациенток с трубно-перитонеальным, эндокринным на фоне СПЯ бесплодием, а также при минимальных формах наружного генитального эндометриоза для выбора тактики ведения лечебного цикла ЭКО в день ТВП целесообразно исследовать следующие иммунологические и биохимические показатели:

– ФНО- α сыворотки крови и уровень ОБ в фолликулярной жидкости при ГПБ;

– уровень АЛБ и ИЛ-8 в фолликулярной жидкости при СПЯ;

– концентрацию сывороточного АЛБ при НГЭ 1-2 ст.

2. Полученные клинические и лабораторные данные составляют основу математической модели прогноза исхода программы ЭКО для каждой конкретной пациентки. Данную модель мы рекомендуем использовать в клинической практике для принятия решения о переносе нативного эмбриона (в случае «положительного» прогноза) или его криоконсервации (в случае «отрицательного» прогноза). Целью сегментации цикла в данном случае является отсроченный эмбриотрансфер после нивелирования иммунологических сдвигов в организме женщины, вызванных индукцией суперовуляции. Данная тактика позволяет повысить частоту имплантации эмбрионов в программах ЭКО.

3. У пациенток с СПЯ при применении ХГЧ-триггера рекомендуется определение дополнительных иммунологических и биохимических показателей в день ТВП, позволяющих прогнозировать развитие «поздней» формы СГЯ при следующих значениях: $\alpha 1$ -АТ выше 4,6 г/л, АБГ выше 0,02 г/л при сниженных значениях ФНО- α менее 0,4 пкг/мл, ИЛ-8 менее 1,6 пкг/мл и АЛБ менее 41 г/л в сыворотке крови, а также повышении уровня ИФН- γ более 8,5 пкг/мл при снижении концентраций ФНО- α ниже 0,5 пкг/мл, ИЛ-8 ниже 120 пкг/мл и АЛБ ниже 38 г/л в ФЖ. При выявлении данных значений мы рекомендуем осуществлять криоконсервацию всех эмбрионов с целью профилактики опасного для жизни пациентки синдрома гиперстимуляции яичников.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Опубликованные статьи, входящие в международные реферативные базы данных

1. Лихачева, В.В. Хронический эндометрит: содержание регуляторно-транспортных белков в крови и внутриматочных смывах в прогнозе результативности программ ЭКО / В.В. Лихачева, Я.Н. Третьякова, В.Н. Зорина, Л.Г. Баженова, А.Г. Маркдорф, Л.С. Сотникова, Н.А. Зорин // **Акушерство и гинекология.** – 2017. – №2 – С.58–62.

2. Зорина, В.Н. Дисбаланс в системе «цитокиновая сеть – регуляторно-транспортные белки» при различных видах бесплодия в программах экстракорпорального оплодотворения / В.Н. Зорина, В.В. Лихачева, Р.М. Зорина, Л.Г. Баженова, Т.В. Третьякова, С.В. Архипова, Л.В. Ренге, Н.А. Зорин // **Медицинская иммунология.** – 2018. – Т. 20. – № 2. – С. 203–214.

3. Шрамко, С.В. Взаимосвязь экспрессии генов стероидных рецепторов в тканях матки и сывороточных концентраций иммунорегуляторных белков, цитокинов, половых стероидов при пролиферативных заболеваниях / С.В. Шрамко, В.Н. Зорина, Н.А. Зорин, И.А. Ботвиньева, С.В. Архипова // **Медицинская иммунология.** – 2018. – Т.20. – № 5. – С. 731–735.

4. Лихачева, В.В. Оценка влияния клинических факторов на результативность программ вспомогательных репродуктивных технологий / В.В. Лихачева, А.Г. Маркдорф, Л.Г. Баженова, А.Е. Власенко, С.В. Шрамко // **Бюллетень сибирской медицины.** – Тематический выпуск «ЗДОРОВЬЕ МАТЕРИ И РЕБЕНКА: НАУКА И ПРАКТИКА». – 2018. – Т. 17. – № 2. – С. 49–52.

Опубликованные статьи в изданиях и журналах, которые входят в перечень ВАК при Минобрнауки РФ

5. Лихачева, В.В. Современные представления о патогенезе хронического эндометрита / В.В. Лихачева, В.Н. Зорина, Я.Н. Третьякова, Л.Г. Баженова, Т.В. Третьякова, Л.В. Ренге // **Российский вестник акушера-гинеколога** – 2017. – Т.17 – №4. – С.25–32.

6. Шрамко, С.В. Проллиферативные заболевания матки: анамнестические и клиничко – морфологические параллели / С.В. Шрамко, Л.Г. Баженова, О.И. Бондарев, В.В. Лихачева // **Российский вестник акушера-гинеколога** – 2017. – Т.17. – №4. – С.78–83.

7. Лихачева, В.В. Регуляторно-транспортные белки сыворотки крови и фолликулярной жидкости в прогнозе результативности программ экстракорпорального оплодотворения у женщин с аденомиозом / В.В. Лихачева, Л.Г. Баженова, Р.М. Зорина, А.Г. Маркдорф, Т.С. Чирикова, С.В. Шрамко, С.Н. Филимонов // **Медицина в Кузбассе**. – 2017. – Т.ХVI. – №3. – С. 64–69.

8. Лихачева, В.В. Содержание и прогностическое значение некоторых цитокинов в сыворотке крови и фолликулярной жидкости у женщин с синдромом поликистозных яичников / В.В. Лихачева, Л.Г. Баженова, Р.М. Зорина, А.Г. Маркдорф, С.В. Архипова, С.Н. Филимонов // **Медицина в Кузбассе**. – 2017. – Т.16. – №4. – С. 34–38.

9. Лихачева, В.В. Регуляторно-транспортные белки сыворотки крови и фолликулярной жидкости пациенток с синдромом поликистоза яичников в прогнозе результативности программ экстракорпорального оплодотворения / В.В. Лихачева, Р.М. Зорина, Л.Г. Баженова, Л.С. Сотникова, А.Г. Маркдорф, Я.Н. Третьякова // **Российский вестник акушера-гинеколога**. – 2018. – Том 18. – №1. – С. 25–29.

10. Лихачева В.В. Регуляторно-транспортные белки и цитокины сыворотки крови в программах экстракорпорального оплодотворения у женщин с мужским фактором бесплодия / В.В. Лихачева, К.В. Краснопольская, Л.Г. Баженова, Р.М. Зорина, С.Н. Филимонов, С.В. Шрамко // **Мать и дитя в Кузбассе**. – 2019. – Т. 20. – №1. – С.54–59.

Патенты на изобретения

11. Лихачева, В.В. Способ лечения и профилактики рецидивов внутриматочных синехий: **патент** № 2525533 / В.В. Лихачева, Л.Г. Баженова, А.Г. Маркдорф, Т.В. Третьякова. – № 2013133204/14; заявл. 16.07. 2013 г.

12. Лихачева, В.В. Способ лечения и профилактики рецидивов внутриматочных синехий: **патент** №2582226 / В.В. Лихачева, Л.Г. Баженова,

Л.С. Сотникова, А.Г. Маркдорф, Я.Н. Третьякова, А.Г. Лихачев. – №2015123259/15; заявл. 16.06.2015.

13. Лихачева, В.В. Предимплантационная подготовка эндометрия пациенток при гипоплазии эндометрия и снижении овариального резерва после оперированного наружного генитального эндометриоза: **Патент** №2591086 / В.В. Лихачева, Л.Г. Баженова, Л.С. Сотникова, А.Г. Маркдорф, А.Г. Лихачев, Я.Н. Третьякова.– № 2015123260/15; заявл. 16.06.2015.

14. Третьякова, Я.Н. Способ оценки готовности женщин с хроническим эндометритом к экстракорпоральному оплодотворению: **патент** №2617061 / Я.Н. Третьякова, В.В. Лихачева, В.Н. Зорина, Т.В. Третьякова, Н.А. Зорин, А.Г. Маркдорф. – №2015154162; заявл. 16.12.2015.

15. Лихачева, В.В. Способ прогнозирования эффективности программ ЭКО при трубно-перитонеальном бесплодии, ассоциированным с хроническим эндометритом: **патент** №2677467 / В.В. Лихачева, Я.Н. Третьякова, В.Н. Зорина. – № 2017140151; заявл. 17.11.2017.

16. Шрамко, С.В. Способ прогнозирования вероятности развития пролиферирующей миомы матки: **патент** № 2676035 / С.В. Шрамко, А.Е. Власенко, Л.Г. Баженова, В.В. Лихачева. – № 2018126913; заявл. 20.07.2018.

17. Шрамко, С.В. Способ прогнозирования вероятности развития аденомиоза у женщин с миомой матки: **патент** № 2 676 050 / С.В. Шрамко, А.Е. Власенко, Л.Г. Баженова, В.В. Лихачева. – №2018123877; заявл. 29.06.2018.

Программа для ЭВМ

18. Лихачева, В.В. Программа расчета риска отрицательного исхода процедуры ЭКО: программа для ЭВМ № 2019610613 / В.В. Лихачева, С.В. Шрамко, А.Е. Власенко. – **патент** №2018665274; заявл. 26.12.2018.

Другие публикации

19. Азаров, П.А. Морфологические изменения эндометрия при применении внутриматочной спирали / П.А. Азаров, М.В. Черданцев, О.И. Бондарев, В.В. Лихачева // Сборник материалов VI научно-практической конференции молодых ученых. – Новокузнецк, 2016 г.– С. 25–27.

20. Лихачева, В.В. Анализ белкового состава внутриматочных смывов в прогнозе эффективности программ ЭКО при хроническом эндометрите / В.В. Лихачева, Я.Н. Третьякова, В.Н. Зорина, Р.М. Зорина, Л.В. Ренге, Т.В. Третьякова, А.Г. Маркдорф, Л.Г. Баженова // Проблемы репродукции. – 2017. – №4. – С. 74–80.

21. Лихачева, В.В. Цитокины и регуляторно-транспортные белки в фолликулярной жидкости и сыворотке крови женщин при маточной форме бесплодия в программах экстракорпорального оплодотворения / В.В. Лихачева, Л.В. Ренге, Л.Г. Баженова, Я.Н. Третьякова, С.В. Архипова, Р.М. Зорина // Фундаментальная и клиническая медицина. – 2017. – Т.2. – №3. – С.28–34

22. Лихачев А.Г. Оценка результатов оперативного лечения мужского бесплодия / А.Г. Лихачев, О.И. Бондарев, В.П. Рублевский, В.В. Лихачева // Электронный сборник. - VII Конгресс урологов Сибири. – Кемерово, 10-11.05.2018. — С.24–25.

23. Лихачев А.Г. Возможности оперативного лечения мужского бесплодия / А.Г. Лихачев, О.И. Бондарев, В.П. Рублевский, В.В. Лихачева // XXI Всероссийская научно-практическая конференция, посвященная 25-летию Центра Охраны Здоровья Шахтеров «Многопрофильная больница: проблемы и решения». – Ленинск-Кузнецкий, 25.05.2018. – С. 127–128.

24. Ренге, Л.В. Прогнозирование исходов программ экстракорпорального оплодотворения у женщин с хроническим эндометритом при трубно-перитонеальном бесплодии / Л.В Ренге, Я.Н. Сорокина, Т.В. Третьякова, В.Н. Зорина, В.В. Лихачева (учебное пособие для послевузовского и дополнительного профессионального образования врачей) // Новокузнецк, 2019. – 42 с.